

и то такая оценка не всегда приемлема. Как дать оценку микробных генетических ресурсов в стоимостном выражении, если они не являются предметом бухгалтерского учёта?

В качестве примера трансформации потенциальной ценности микробных ресурсов в фактическую в ходе биотехнологической разработки можно привести историю получения термостойкой полимеразы из термофильного микроорганизма *Thermus aquaticus*. Сегодня во многих областях биотехнологии, медицины, исследований окружающей среды используется полимеразная цепная реакция амплификации ДНК, ПЦР (англ. Polymerase Chain Reaction, PCR), для которой необходим высокотермостабильный фермент – ДНК-полимераза. Полимераза – фермент, катализирующий синтез новых определённых фрагментов молекулы ДНК (ампликонов). ПЦР позволяет нарабатывать в пробирке отдельные участки геномной ДНК в неограниченных количествах. Открытие ПЦР означало прорыв в современной молекулярной биологии, генной инженерии, медицине, оно способствовало развитию нового диагностического направления – ДНК-диагностики. ПЦР широко применяется, например, для идентификации микроорганизмов, диагностики наследственных и инфекционных заболеваний, установления отцовства и степени родства, выделения и клонирования новых генов и т.д., словом, везде, где требуется установить для той или иной цели уникальную последовательность ДНК, опираясь на минимальное количество исходного ДНК-материала. Поскольку ДНК сравнительно хорошо сохраняется, использование ПЦР позволяет исследовать и древние останки. В настоящее время проведен анализ ДНК неандертальцев и египетских мумий, а также насекомых, законсервированных в янтаре миллионы лет назад, и бактерий из глубоководного древнего арктического льда.

Микроорганизм *Thermus aquaticus*, в котором обнаружили термостабильную ДНК-полимеразу, был выделен профессором Томасом Броком (Brock T.D.) и его студентом Хадсоном Фризом (Freeze H.) в 1966 г. из горячего источника в Национальном Йеллоустонском парке США, знаменитом своими прекрасными гейзерами. Выделенный в чистую культуру и идентифицированный в 1969 г. штамм первооткрыватели передали в соответствии

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования

«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

И. Б. Ившина, А. В. Криворучко,
М. С. Куюкина

БИОРАЗНООБРАЗИЕ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Допущено методическим советом
Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве
учебного пособия для студентов, обучающихся
по направлению подготовки бакалавров
«Биология»



Пермь 2019

УДК 582.28:502.211(075.8)
ББК 28.4
И17

Ившина И. Б.

И17 Биоразнообразие и систематика микроорганизмов: учеб. пособие / И. Б. Ившина, А. В. Криворучко, М. С. Куюкина; Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2019. – 304 с.: ил.

ISBN 978-5-7944-3421-7

Пособие включает избранные лекции, которые авторы читают студентам биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета. В них с привлечением традиционных и современных сведений рассмотрены фенотипические и филогенетические направления систематики прокариотов, излагается история проблемы макро- и мегатаксономии, а также становления концепции вида в прокариотологии. Анализируются центральные понятия – классификация, номенклатура, идентификация, а также основные принципы и критерии классификации отдельных групп прокариотных организмов. Представлены работы исследователей, внесших вклад в разработку современной системы прокариотов.

Ил. 23. Табл. 5. Библиогр. 167 назв.

УДК 582.28:502.211(075.8)
ББК 28.4

*Печатается по решению ученого совета биологического факультета
Пермского государственного национального исследовательского университета*

Рецензенты: кафедра микробиологии и вирусологии Перм. гос. мед. ун-та им. акад. Е. А. Вагнера (зав. каф. – д-р мед. наук, профессор, засл. деят. науки РФ **Э. С. Горовиц**);

зав. лабораторией водной микробиологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, д-р биол. наук, профессор **А. И. Саралов**

ISBN 978-5-7944-3421-7
© ПГНИУ, 2019
© Ившина И. Б., Криворучко А. В.,
Куюкина М. С., 2019

(Pace N.R.) сообщила первые результаты молекулярно-биологического анализа “природной” ДНК [Pace *et al.*, 1985; Pace, 1996].

4. Криптические объекты. Их фенотипы пока можно только прогнозировать, комбинируя признаки уже описанных объектов.

Современные исследователи дают ориентировочную оценку ожидаемого числа новых генотипов на протяжении нескольких десятков последующих лет. Теоретические (“рабочие”) цифры составляют около 5×10^7 прокариотных видов (бактерий и архей), что вчетверо больше общего числа видов грибов, животных и растений [Curtis *et al.*, 2002]. Называются и более крупные цифры – до 10^9 и даже 10^{17} , хотя эти цифры, скорее всего, преувеличены.

Важность сохранения биоразнообразия культивируемых бактерий и архей

Один из эффективных способов изучения и сохранения разнообразия микроорганизмов – поддержание их в лабораторных резервуациях (микробных коллекциях). Коллекции микроорганизмов (собрание большого числа штаммов конкретной таксономической группы, выделенных из разных природно-климатических зон) и их доступность создают новые возможности для разработки качественно новой методологии и новых концепций в систематике микроорганизмов.

Если ещё до недавнего времени было распространено представление о коллекциях только лишь как о месте складирования хаотическим образом собранных штаммов, то сегодня коллекции микробных культур находятся в эпицентре научных исследований, предоставляя не только культуры, но и значительные объёмы полезной научной информации о поддерживаемых штаммах. По сути, современные микробные коллекции – это инвестиции в будущее. На фоне растущей мировой биоэкономики они приобретают всё большую ценность, появились даже тенденции оценки их в денежных знаках.

Однако определение стоимости микробных коллекций в терминах рыночной экономики оказалось более чем сложным делом. Ценность леса может быть выражена в кубометрах дров,

1975; 1982; Blakemore et al., 1979, 1980, 1984]. Магнитотактические бактерии обладают способностью к магнитотаксису и плавают вдоль силовых линий магнитного поля в водных средах обитания.

Лабораторное культивирование остаётся незаменимым подходом для более тщательного изучения физиологии и клеточной архитектуры бактерий и архей. В связи с этим современные исследования направлены на разработку высокоэффективных технологий на основе геномной информации и получение новых знаний об экологии ранее некультивируемых бактерий, обеспечивающих подходящие условия для выделения и инкубации этих привередливых представителей бактериальных и археальных филумов-кандидатов, методах их очистки и консервации в лабораторных условиях. В последние годы успешно применяется, в частности, метод фильтрации-акклиматизации для получения накопительных культур и изоляции ранее некультивируемых пресноводных олиготрофных актинобактерий. Способ включает начальную стадию фильтрации через мембранные фильтры (с диаметром пор 0,03 мкм) для отбора отдельных целевых мелких (с объёмом до 0,1 мкм³) клеток с последующей их постепенной адаптацией на питательных средах и увеличением концентрации органического углерода от 0,005 до 3 г/л [Hahn, 2009; Hahn et al., 2014].

3. Фантомные объекты. Их фенотип неизвестен, они не обнаруживаются при микроскопировании природных образцов. Такие объекты выявляются косвенно по присутствию в воде, почве или других природных субстратах уникальных последовательностей генов рРНК, которые амплифицируются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенируются и сравниваются с банком генетических данных. Для анализа нужно только 10⁻⁸ г ДНК, с помощью которой можно обнаружить фантомные бактерии. Преимущество данного метода в том, что не нужно тратить время и технические средства для накопления биомассы, очистки и комплексного анализа фенотипических свойств бактериальных культур.

О существовании огромного разнообразия фантомных форм бактерий и архей стало известно с 1985 г., когда группа американских бактериологов под руководством Нормана Пейса

ОГЛАВЛЕНИЕ

Лекция 1. ВВЕДЕНИЕ В СИСТЕМАТИКУ ПРОКАРИОТОВ. СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТОВ КАК СТРОГАЯ НАУКА И ИСКУССТВО..... 6

Важность сохранения биоразнообразия культивируемых бактерий и архей..... 15

Новая методология анализа разнообразия микроорганизмов.....21

Лекция 2. ТЕРМИНОЛОГИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ В СИСТЕМАТИКЕ ПРОКАРИОТОВ..... 28

Классификация32

Идентификация.....38

Лекция 3. ПРИНЦИПЫ НОМЕНКЛАТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ..... 38

Номенклатура как язык систематики38

Категории таксономической иерархии.....51

Лекция 4. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ СИСТЕМАТИКИ ПРОКАРИОТОВ..... 53

Морфологический этап59

Физиологический этап67

Нумерическая таксономия (фенетика) 70

Лекция 5. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СИСТЕМАТИКА НА БАЗЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА 74

Рибосомная филогенетика 79

Генотипические методы бактериальной классификации81

Нуклеотидный состав ДНК82

ДНК-ДНК гибридизация.....	83
Молекулярный фингерпринтинг	84
Анализ генов 16S рРНК	89
Парадоксы филогенетической системы прокариотов.....	104
Лекция 6. К ВОПРОСУ О СОВРЕМЕННОЙ КОНЦЕПЦИИ ПРОКАРИОТНОГО ВИДА. РОЛЬ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В ПРОЦЕССАХ ВИДООБРАЗОВАНИЯ У ПРОКАРИОТОВ.....	107
Горизонтальный перенос генов.....	108
Определение вида в прокариотологии	116
Лекция 7. ФАКТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОКАРИОТНОЙ И ЭУКАРИОТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ. ЭНДОСИМБИОТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ. ПРОБЛЕМА ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЭУКАРИОТОВ.....	134
Эволюционное происхождение митохондрий и хлоропластов.....	152
Корни эукариотов среди архей и бактерий.....	161
Лекция 8. КОНЦЕПЦИЯ АРХЕЙ. ФЕНОТИП И ГЕНОТИП АРХЕЙ: СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТ ...	164
Фенотип архей	176
Генотип архей	184
Проблема анцестора	188
Лекция 9. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.....	196
Таксономические признаки	198
Техника и методы идентификации прокариотов.....	208

2. **Некультивируемые** (пока ещё некультивируемые, не поддающиеся культивированию) **объекты** (Viable But Not Culturable, VBNC, uncultivable, unculturable и nonculturable). Это те, которые мы видим с помощью микроскопа непосредственно в природных образцах или с использованием метода окрашивания живых/мёртвых клеток, но не можем заставить развиваться в лабораторных условиях. Сведения об их фенотипе в основном ограничиваются морфологией. К сожалению, далеко не всех бактерий, которых мы наблюдаем с помощью микроскопа в природных образцах, можно изолировать из смешанной популяции. Даже после успешной изоляции субкультивирование новых, часто довольно привередливых, бактерий остаётся непредсказуемым. При переносе в сложную питательную среду (искусственную нишу) они испытывают “угнетение, ускоренное субстратом”, теряют способность к размножению и переходят в латентное состояние, что не позволяет исследовать их физиологические характеристики. В этом случае мы можем судить о фенотипе только по морфологии, а не физиологическим свойствам. Уникальным источником сведений об их метаболизме и физиолого-биохимических свойствах становятся метагеномные данные.

Опознаваемые, но некультивируемые и физиологически активные филоотипы – это чаще всего симбиотические бактерии, разделяющие с партнёрами существенную часть метаболитов. Так, анаэробные реснитчатые живут в тесном соседстве с различными эндо- и эктосимбионтами. Многие из них детектируются по характерному (голубому) свечению кофермента F₂₀ как метаногены (метанобразующие микроорганизмы). Кладовая бактериальных эндосимбионтов – рубец жвачных животных, который представляет собой большую инкубационную камеру, заполненную морфологически яркими, заметными только в микроскопе с фазовым контрастом микроорганизмами.

Известны и свободноживущие некультивируемые бактерии. Впервые они были открыты британским микробиологом Ричардом Блейкмором (Blakemore R.P.), обнаружившим в 1975 г. магнитотактические гигантские бактерии *Achromatium oxaliferum* размером до 100 мкм с массивными включениями в магнитосомах кристаллов магнетита (накапливают до 4 % оксида железа, Fe₃O₄, играют важную роль в круговороте железа) [Blakemore,

любые сочетания. Запрещённые комбинации очень редки, например, плавание при помощи жгутиков несовместимо со скользкой подвижностью или кислородная фототрофия – со способностью образовывать эндоспоры.

Биоразнообразие прокариотов выражается, в первую очередь, в разных типах питания, цитоморфологических различиях, а также в разнообразии форм поведения. У прокариотов нередко наблюдается переход от одного типа метаболизма к другому. Например, от аэробноз к анаэробнозу, от автотрофии к гетеротрофии, от фототрофии к хемотрофии. Среди ядерных химер на это способны только некоторые одноклеточные грибы (*Saccharomyces*) и водоросли (*Euglena*). Что касается высших организмов, то их метаболизм крайне однообразен: абсолютное большинство высших растений – фотолитоавтотрофы, большинство грибов и животных – хемоорганогетеротрофы с дыханием аэробного типа.

Биоразнообразие прокариотов состоит из 4 качественно и количественно неравноценных пулов [Пиневиц, 2007]:

1. **Культивируемые объекты.** Есть одна проблема, связанная с культивированием, – это использование чистых культур, постоянных физико-химических условий и относительно богатых питательных сред. За возможность быстро и без помех изучать свойства отдельных микроорганизмов в лабораторных условиях современный исследователь платит тем, что анализирует практически монстрозные (от слова “монстры”) – перерожденные фенотипы, адаптированные к искусственному гомеостазу. Лабораторные исследования не эквивалентны исследованиям в природе, условия в “тепличной” нише резко отличаются от естественных условий. В отсутствие межвидовой конкуренции и при заданном режиме питания усиливается дрейф генов, что приводит к накоплению геномных различий между коллекционными штаммами и природными популяциями. Поэтому будущее экспериментальной микробиологии – за смешанными культурами и моделированием природной среды, где существует трофическая сеть, устанавливаются градиенты питательных субстратов и продуктов микробного метаболизма. Пока мы можем детально изучать только культивируемые в лабораторных условиях формы микроорганизмов.

Лекция 10. ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ..... 219

Структура пептидогликана.....220

Тейхоевые кислоты222

Хемотип клеточной стенки.....227

Хиноны и терминальные оксидазы дыхательной цепи229

Состав жирных кислот232

Полярные липиды.....237

Состав полиаминов.....240

МАЛДИ масс-спектрометрия.....240

Иммунологические методы, используемые в диагностической микробиологии.....243

Основные правила и этапы работы по установлению систематической принадлежности микробных изолятов247

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... 255

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ К ЛЕКЦИОННОМУ КУРСУ “БИОРАЗНООБРАЗИЕ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ” 270

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ 272

СЛОВАРЬ НЕКОТОРЫХ ТЕРМИНОВ 274

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ ТАКСОНОВ 298

Лекция 1. ВВЕДЕНИЕ В СИСТЕМАТИКУ ПРОКАРИОТОВ. СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТОВ КАК СТРОГАЯ НАУКА И ИСКУССТВО

Микробиология по праву может считаться одной из основных дисциплин биологии, поскольку без знания особенностей микроорганизмов нельзя понять всего многообразия жизни на Земле, условий ее появления, эволюции. Данный лекционный курс касается одного из наиболее сложных разделов общей микробиологии – систематики прокариотов.

Задачи лекционного курса:

1. Познакомиться с фенотипическими и филогенетическими направлениями систематики прокариотов, историей проблемы макро- и мегатаксономии, а также становления концепции вида в прокариотологии.

2. Изучить центральные понятия – классификация, номенклатура, идентификация, а также основные принципы и критерии классификации отдельных групп прокариотных организмов.

3. Освоить и закрепить навыки по технике идентификации прокариотов.

4. Ознакомиться с работами исследователей, внесших вклад в разработку современной системы прокариотов.

Современная систематика по характеру решаемых задач включает три раздела: теоретический, практический и прикладной. В рамках теоретического раздела рассматриваются цели, общие принципы и конкретные методы. Практический раздел систематики предусматривает таксономический анализ конкретных групп живых организмов, выяснение таксономических отношений между ними и построение частных таксономических систем. Важная сфера практической систематики – определение правил, регламентирующих классификацию, так называемый кодекс номенклатуры. Прикладной раздел систематики выражается в составлении идентификационных таблиц, в работе по таксономической идентификации исследуемых биообъектов и направлен на облегчение таксономической идентификации живых организмов.

Систематика микроорганизмов – *“самая субъективная отрасль любой биологической дисциплины, и, во многих отношениях, это больше искусство, чем наука”*. Этими словами Самуил

циатив обозначено интенсивное изучение микроорганизмов, связанных с деятельностью человека и участвующих в восстановлении затронутых этой деятельностью экосистем.

В настоящий момент описано менее 5 % всего разнообразия микроорганизмов, обитающих в природе, в том числе $5,2-8,0 \times 10^3$ валидных (законных) видов прокариотных организмов (бактерий и архей), введенных в чистую культуру, что составляет не более 0,3 % видового разнообразия ядерных химер (эукариотных организмов) [<https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>]. Причиной малого количества охарактеризованных видов является трудность описания видов у прокариотов. Большинство представителей наблюдаемых в природе видов прокариотов не удаётся культивировать (ввести в лабораторную культуру), а значит, невозможно сделать полноценное описание. Эта проблема сегодня стоит особенно остро, потому что существуют миллионы микробных видов, которые пока ещё не культивированы [Curtis et al., 2002; Huber et al., 2007; Amann, Rosselló-Móra, 2016]. Если в 1990 г. с использованием молекулярных инструментов микробной экологии было обнаружено свыше 100 новых видов прокариотов, то в 2016 г. эта цифра составила уже более 1000. Однако для большинства из них всё ещё не введено в культуру ни одного репрезентативного изолята, ничего неизвестно о структуре популяций и частоте рекомбинаций.

Современные описанные (более 10 000) законные виды прокариотов – лишь вершина огромной *“подводной неизвестной части айсберга”* мира микробов. По оценкам специалистов, общее число видов прокариотов составляет около 10 млн [Konstantinidis, Rosselló-Móra, 2015]. Действительно, большой разрыв. Биоразнообразие микроорганизмов может быть охарактеризовано в числе видов, физиологических групп, таксонов, генотипов и даже генов. Биоразнообразие прокариотов представляет собой, прежде всего, набор фенотипов. Академик Георгий Александрович Заварзин (1933–2011) – один из классиков российской микробиологии, много лет проработавший в области микробного разнообразия, назвал это *“пространством логических возможностей”* [Заварзин, 1974, 2018]. Структурные и функциональные признаки прокариотов могут образовывать почти

(от 10 до 42 °C) температур, выдерживают нагревание при 70 °C в течение 30 мин, обладают способностью выживать в экстремально бедных по источникам питания условиях. Растут в безазотистых средах (что свидетельствует об их способности фиксировать молекулярный азот), в микроаэрофильных условиях, при недостатке влаги.

Уникальная биологическая пластичность этих актинобактерий обусловлена широким кругом их приспособительных свойств. Родоккокки синтезируют характерную липофильную клеточную стенку, поэтому имеют большое сродство с гидрофобными субстратами и выделяются среди других микроорганизмов наибольшим разнообразием деградируемых ксенобиотиков. Они обладают способностью к формированию в цикле развития особых покоящихся форм клеток (цист), имеющих цитологические признаки, присущие спорам, и обеспечивающих выживание родоккокков в условиях длительного голодания; к синтезу и аккумуляции эндогенных резервных метаболитов в качестве дополнительных энергетических субстратов, проявляют диауксотрофные свойства – способны переходить с использования одного углеродного субстрата на другой (в частности, с углеводного на углеводородный субстрат). Благодаря этим и многим другим биологическим особенностям актинобактерии рода *Rhodococcus* представляют собой одну из наиболее разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов.

Учитывая удельный вес и незаменимую роль микроорганизмов в природных экосистемах, в обеспечении самой возможности существования всех высших форм флоры и фауны, большое значение придаётся изучению и сохранению микробного разнообразия (генетического пула микроорганизмов). По оценкам специалистов, прекращение деятельности микроорганизмов означает гибель всей жизни на нашей планете в 4-дневный срок. Микроорганизмы, прежде всего стенобионтные виды, нуждаются в охране, ибо с исчезновением их местообитаний (например, при вырубке деревьев-хозяев) их гены становятся недоступными.

Микроорганизмы – предмет широких международных инициатив (рис. 1). В качестве приоритетных направлений этих иници-

Коуэн (Cowan S.T.) предварил своё блистательное эссе о смысле (объективном) и бессмыслице (необъективном) в бактериальной таксономии в 1971 г. Его труды о практике бактериальной таксономии, изданные в 1960-х и 1970-х гг. [Cowan, 1965, 1970, 1971], должны быть прочитаны каждым, кто проявляет интерес к этой области науки, и особенно сейчас, когда благодаря геномике концепция вида перестала быть чем-то неопределённым и является центром внимания научных журналов по микробиологии с самыми высокими импакт-факторами [Rosselló-Móra, Amann, 2001; Gevers et al., 2005; Konstantinidis, Tiedje, 2005; Konstantinidis et al., 2006a,б; Fraser et al., 2009].

Систематика микроорганизмов принадлежит к числу бурно развивающихся биологических наук благодаря формированию качественно новой методологии исследования биоразнообразия микроорганизмов, появлению всё новых и новых методов: это методы математического моделирования, компьютерный анализ данных, сравнительный анализ ДНК и РНК, анализ ультраструктуры клетки, наконец, секвенирование геномов и белков. С развитием молекулярных методов исследования микроорганизмов стало очевидно, что более 99 % микроорганизмов из природных экосистем невозможно культивировать в лабораторных условиях. В чистых культурах известна лишь небольшая часть микроорганизмов, существующих в природе, свыше трети охарактеризованных на сегодняшний день филумов прокариотов не имеют культивируемых представителей [Overmann et al., 2017].

В основе новой методологии лежат методы, позволяющие проводить анализ микробного разнообразия непосредственно в среде обитания (от лат. “*in situ*” – на месте), т.е. без необходимости выделения микроорганизмов в лабораторную культуру. Одним из таких современных революционных методов является метод обнаружения микроорганизмов на основе нуклеиновых кислот, экстрагируемых непосредственно из природных образцов. С помощью этих новых методологических возможностей с огромной интенсивностью обнаруживаются новые бактерии в таких средах, как активный ил, кишечник человека, глубоководные отложения. Анализ ДНК, экстрагированной из природных образцов, показал, что микробное разнообразие в природных средах обитания гораздо выше того, что признавалось ранее.

В течение последних десятилетий описано огромное количество новых видов прокариотов. При этом установлено, что общее биоразнообразие бактерий и архей в океанах превышает 37000 видов [Sunagawa et al., 2015], отдельные почвы содержат до 54000 видов [Roesch et al., 2007].

Мы являемся свидетелями открытий новых форм микроорганизмов, таких как экстремофилы, развивающиеся в необычных местах обитания. В настоящее время экстремофилы – предмет интенсивного изучения многих лабораторий мира. Это связано с тем, что данная группа микроорганизмов приобретает всё большую экологическую значимость, так как на фоне кризисного состояния окружающей среды всё более увеличивается число местообитаний, в которых организмы находятся в экстремальных условиях загрязнения среды высокотоксичными поллютантами.

Сегодня открыты гипертермофильные бактерии с оптимумом роста 96–100 °С (термоустойчивость этих гипертермофилов настолько высока, что они выдерживают автоклавирование при 120 °С). Наиболее маловероятные места, где можно обнаружить бактерии, – вулканические жерла и кислотные источники, в основном представителей *Archaea* и *Beggiatoa*, которые могут пышно расцветать в вулканической грязи. Эти среды, высокотоксичные почти для всех животных и растений, обеспечивают местообитания для бактерий, которые не имеют традиционных потребностей в углероде и даже солнечном свете; они могут выживать в присутствии серы и водорода. Представители *Sulfolobus solfataricus* могут активно расти при температуре 88 °С в суперкислых средах. Сегодня открыты суперпсихрофильные (криофильные) бактерии с оптимумом роста от -7 до -14 °С. Их обнаруживают в Арктике и Антарктике в образцах льда и пород. Около 7 % поверхности Земли покрыто морским льдом, при этом бактерии способны не только персистировать, но и метаболизировать в таких условиях.

Многие полярные бактерии обнаруживаются в виде спор, которые способны выживать до миллиона лет, дольше, чем большинство ледниковых периодов. Изучение образцов льда шельфовых ледников острова Элсмир (самого северного острова Канады) выявило большое количество бактерий, некоторым из них

было, по крайней мере, 2000 лет. Многие из этих бактерий пребывали в “анабиозе”, ожидая изменения климата. Инновации последних лет позволяют проникать вглубь антарктического льда. В полярном леднике “Тейлор Глейсер” на глубине 500 м обнаружен бассейн с незамерзающей при -10 °С водой с высокой концентрацией соли. В водных образцах, отобранных из этого бассейна, обнаружены 17 новых видов бактерий (в том числе *Thiomicrospira arctica*). Несмотря на своё сходство с некоторыми морскими бактериями, они сумели выжить без кислорода и солнечного света, могли дышать, используя железо, которое присутствует в горной породе под бассейном, и выживают, по-видимому, за счёт других живых организмов, обитающих вместе с ними в данной эконше. Эти сведения дают понимание того, как бактерии пережили ледниковые периоды, они, очевидно, могли бы выжить и на других планетах и спутниках солнечной системы.

Другой замечательный пример – бактерия *Halomonas titanicae*, обнаруженная в ржавчине на обломках британского пассажирского лайнера “Титаник” на глубине 3800 м ниже поверхности Атлантического океана.

В Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН) – филиале Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (Пермь, Россия) на протяжении многих лет занимаются исследованием чрезвычайно интересной группы микроорганизмов, входящих в новый класс *Actinobacteria* и относящихся к роду *Rhodococcus*. Родоккокки успешно метаболизируют в экстремальных условиях обитания, устойчивы к действию различных повреждающих факторов (резкое изменение температуры, УФ-облучение и др.), имеют большую солеустойчивость, выделяются из пластовых вод с высокой соленостью – до 25 % (250 г/л) хлорида натрия. Способны расти на средах, содержащих 7 % (70 г/л) хлорида натрия (рост большинства микроорганизмов, как правило, ингибируется в присутствии 5 % (50 г/л) NaCl). Родоккокки выделяются из арктической и таёжно-лесной почвы, растут в средах с высокими концентрациями (от 5 до 35 %, т.е. 50–350 г/л) нефтепродуктов, выживают в кислой и щелочной средах, способны к росту при pH 5 и 8, в широком интервале

быть точен, однозначен, особенно сегодня, когда изучение и инвентаризация, ревизия разнообразия микроорганизмов является предметом интереса специалистов многих стран мира.

Диагностика – это способ отыскания заданного таксона и определение принадлежности объекта таксону.

Идентификация – это сравнение неизвестных организмов с уже классифицированными бактериями с целью установления их идентичности или наименования неизвестных организмов. Это определение систематической принадлежности неизвестного организма к тому или иному таксону.

Из вышесказанного следует, что систематика включает в себя классификацию, таксономию, номенклатуру и идентификацию. Классификация, таксономия и номенклатура тесно связаны друг с другом, но отражают разные аспекты одной и той же операции, которая приводит к построению единой системы.

Таксономия обычно принимается как синоним систематики и традиционно подразделяется на три составляющие: (1) классификацию – ранжированное расположение организмов в таксономических группах на основании сходства; (2) номенклатуру – наименование таксонов, определённых в пункте 1; (3) идентификацию – процесс определения, относится ли неизвестный организм к одному из таксонов, охарактеризованных в пункте 1 и поименованных в пункте 2. В таксономии прокариотов общая система классификации представляет собой иерархическую группировку.

Классификация

Классификация (ранжированное расположение организмов в таксономических группах на основании сходства) служит вполне определённым целям, т.е. распознаванию организмов, которые были обнаружены ранее, и категоризации новых организмов в логическую и легко управляемую систему. Все предложенные классификационные системы микроорганизмов являются результатом применения не только разных методов, но и прежде всего различной методологии [Заварзин, 2011а].

Существуют несколько вариантов классификации: филогенетическая, генотипическая, естественная, фенотипическая или

с международными правилами в американскую микробную коллекцию [Brock, Freeze, 1969].

Затем его приобретает за чисто символическую плату (35 амер. долл.) американская биотехнологическая компания “Cetus Corporation”. 39-летний сотрудник этой компании биохимик д-р Кэри Муллис (Mullis K.B., 1944–2019) в 1984 г. изобретает процедуру использования термостабильного фермента (Taq-ДНК-полимеразы) из *Thermus aquaticus* для постановки ПЦР. В 1992 г. он признан учёным года штата Калифорния и награждён премией имени Роберта Коха, а в 1993 г. получает Нобелевскую премию по химии за результаты своих исследований [Mullis, 1993]. Справедливости ради, стоит отметить, что основные принципы ПЦР и состав реакционной смеси для получения копий ДНК (искусственный синтез ДНК с использованием праймеров) впервые были описаны норвежским учёным Хьеллю Клеппе (Kleppe K.) с соавторами ещё в 1971 г. [Kleppe et al., 1971]. Им впервые была высказана идея о возможности амплификации ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК – синтетических праймеров. Однако в то время эта идея осталась неустраиваемой.

Между тем постановка ПЦР сравнительно проста: в пробирку объёмом 0,1–0,5 мл помещают 0,1–0,01 мкг геномной ДНК, затем добавляют пару олигонуклеотидных праймеров – химически синтезированных фрагментов ДНК длиной 20–30 нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов в них подбирают так, чтобы они были комплементарны участкам ДНК по краям амплифицируемого фрагмента длиной обычно в несколько сотен нуклеотидов. Своими 3'-концами праймеры направлены друг к другу, т.е. внутрь амплифицируемого фрагмента ДНК. Важнейший компонент реакции – термостабильная ДНК-полимераза, которая катализирует реакцию синтеза ДНК. Она использует олигонуклеотидные праймеры как затравку, а исходную молекулу ДНК – в качестве матрицы для синтеза. В реакционную смесь добавляют также дезоксинуклеотиды: аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г), цитозин (Ц). Пробирку с такой смесью нагревают почти до точки кипения воды, чтобы благодаря тепловой денатурации цепи геномной двуспиральной ДНК разошлись в стороны, освободив места для посадки синтетических олигонуклеотидных

праймеров (начало первого цикла). Затем пробирку охлаждают до температуры, оптимальной для направления олигонуклеотидных праймеров на соответствующие им места в геномной ДНК. Олигонуклеотидные праймеры находят комплементарные им последовательности и “прилипают” к ним. После этого начинается синтез новой цепи ДНК по правилу Уотсона–Крика (А соответствует Т, а Г – Ц). При этом воспроизводится точная копия прежней нити геномной ДНК. ДНК-полимераза синтезирует новую нить всегда в направлении 5’–3’, т.е. “подшивая” дезоксинуклеотиды только к одному из концов олигонуклеотидных праймеров, а именно к 3’-концу. Таким образом, синтез ДНК начинается только с одного конца каждого из двух праймеров, а поскольку праймеры направлены этими концами друг к другу, получается, что ДНК-полимераза синтезирует двуспиральный фрагмент ДНК, ограниченный с каждой стороны олигонуклеотидными праймерами (окончание первого цикла). Для прохождения реакции достаточно 1–3 мин. Затем цикл нагревания и охлаждения содержимого пробирки многократно повторяют. Делают это на специальном приборе – термоциклере, и вся последовательность событий (денатурация дуплексов ДНК – наплавление праймеров на ДНК – удлинение ДНК) повторяется. Во время каждого цикла (продолжительностью 1–3 мин) количество фрагмента ДНК, ограниченного с обоих концов положением олигонуклеотидных праймеров, удваивается. После 25–30 температурных циклов этого специфического фрагмента ДНК оказывается в миллионы раз больше, чем в начале реакции. К тому же он получается абсолютно чистым. Этого количества ДНК уже достаточно для дальнейшего анализа амплифицированного фрагмента, например, с помощью электрофореза, или даже для определения его структуры путём секвенирования.

ПЦР во многие тысячи раз упростила, ускорила и удешевила процесс выделения специфического фрагмента ДНК, например, какого-то гена. Если для клонирования участка ДНК классическими генно-инженерными методами требовалось в среднем 0,5–2,0 года и огромное количество трудоёмких генно-инженерных действий высококвалифицированного персонала, то с помощью ПЦР фрагмент ДНК можно выделить всего за один рабочий день. В этом состоит основная ценность метода.

По Шлегелю, классификация – это распределение систематических единиц по группам более крупного порядка, образующим иерархическую систему. Предпосылкой классификации является адекватное описание штаммов, на основе которого проводят сравнение и разграничение рассматриваемых систематических единиц. Классификация – это, по сути, рабочий алгоритм, позволяющий распределить организмы, обладающие определённой степенью однородности, по таксонам.

По Заварзину, таксономия – это наименование классов организмов (таксонов), установление их границ и отношения их подчинения. По сути, таксономия представляет собой теорию и практику классификации. Само название (от греч. “taxis” – расположение, порядок) впервые было предложено швейцарским учёным Огюстеном Декандоллем (de Candolle A.P., 1778–1841) в 1813 г. Основной задачей таксономии является описание таксономических единиц, разработка удобного способа их расположения.

Систематика – наиболее объемлющий термин, систематику можно рассматривать как научное исследование разнообразия организмов, включающее их описание, их историю и филогению (если таковые известны), изучение эволюционных механизмов, приводящих к такому разнообразию. Систематика в наиболее сжатой форме содержит максимальную информацию и этим отличается от таксономии и классификации.

Таким образом, систематика обозначает область знания, имеющую единую цель – строгое классифицирование организмов с помощью разнообразных методов и принципов. В задачу систематики входит нахождение названий единиц классификации (таксонов), а также изучение эволюционных взаимоотношений между всеми единицами классификации. Основная цель систематики – построение естественной системы на основе филогенетического родства (то есть общности происхождения, близости и дальности родственных отношений между разными видами) классифицируемых организмов.

Язык систематики – номенклатура. Это сборник правил наименования таксонов, дополненный списком (перечнем) этих наименований. Номенклатура микроорганизмов – важнейший элемент языка общения между специалистами. Язык этот должен

таксономические концепции и направления в систематике прокариотов, остановимся на необходимом этапе систематики – дефиниции таких понятий, как “систематика”, “классификация”, “таксономия”.

Эти термины по-разному истолковываются отдельными исследователями и часто применяются чрезвычайно произвольно. В большинстве случаев такие понятия, как “систематика”, “классификация” и “таксономия” используются как синонимы. В научной литературе опубликовано большое число работ, авторы которых уточняют их смысл и содержание. Это известные работы Александра Александровича Любищева (1890–1972) “Проблемы формы, систематики и эволюции организмов” [Любищев, 1982]; Георгия Александровича Заварзина (1933–2011) “Фенотипическая систематика бактерий” [Заварзин, 1974]; “Прокариотные системы в связи с филогенией бактерий” [Заварзин, 1979], а также Ганса Шлегеля (Schlegel H.G., 1924–2013), Джорджа Симпсона (Simpson G.G., 1902–1984) и др.

Здесь приводятся в основном понятия, сформулированные Г.А. Заварзиным, который разделял идею дифференцирования понятий “систематика”, “классификация” и “таксономия”. По Заварзину, систематика (от греч. “systematikos” – упорядоченный, относящийся к системе) – это теория многообразия организмов, изучающая отношения между их группами.

Другими словами, систематика – наука о многообразии и взаимосвязях между организмами. Предметом изучения систематики является биоразнообразие микроорганизмов. Цель систематики – создание естественной системы, отражающей филогенетические (эволюционные) взаимоотношения микроорганизмов.

Понимание биоразнообразия (множество распознаваемых живых объектов) основывается на классификации. По Заварзину, классификация – это разбиение множества организмов (объектов) на классы эквивалентности (таксоны). Под классом эквивалентности (таксоном) понимается подмножество однородных объектов, объединяемых на основании общих свойств и признаков. Таксон – это таксономическая категория в систематике, объединяющая группу организмов, обладающих определённой степенью однородности.

Далее патентные права на технологию ПЦР приобретает уже за 300 млн амер. долл. швейцарская корпорация “F. Hoffman-La Roche”. Промышленность, построенная на использовании конкретного фермента из конкретного штамма, получает сегодня миллиардные прибыли. При этом труд предшественников не был учтён в их распределении. Ни первооткрыватели бактерии-продуцента, ни коллекция, ни Йеллоустонский парк, на территории которого был выделен штамм, не получили никаких дивидендов от продаж коммерческого продукта. Тогда менеджеры парка Йеллоустон судились с промышленной компанией за долю прибыли для парка и американских налогоплательщиков, на чьи деньги содержался парк. Парку в результате судебного процесса удалось отсудить солидные денежные компенсации.

Этот простой пример показывает остроту битвы, которая разворачивается в мировом масштабе вокруг прав интеллектуальной собственности и справедливого распределения прибылей от использования микробных генетических ресурсов.

Это событие имело одно предисловие. Оказывается, ещё задолго до него, в 30-х гг., подобный термофильный микроорганизм был выделен советским микробиологом Борисом Васильевичем Перфильевым из горячего источника вблизи пос. Курортное на Керченском п-ве. Он назвал его *Thiodendron lateens*. Однако культура не была сдана в коллекцию на хранение и потеряна. В 80-х гг., когда разворачиваются интенсивные исследования термостабильных ферментов, сотрудники института, где работал Перфильев, попытались повторно выделить тиодендрон, но на месте горячего источника нашли только вкопанные местными жителями цементные ванны. Место обитания термофила и биоценоз были непоправимо нарушены, выделить культуру уже было невозможно, а вместе с культурой были потеряны и уникальные гены, и ферменты. В истории науки немало таких примеров упущенных возможностей.

В настоящее время в научной гонке за конкурентными преимуществами для своих национальных экономик многие страны мира переживают период ренессанса коллекционного дела. При этом предпочтение отдаётся специализированным собраниям микробных культур. Развитие многопрофильных сервисных кол-

лекций-гигантов во всём мире затормозилось, массовое развитие получает сеть специализированных коллекций микробных культур.

Коллекции микробных культур подразделяются на три категории: (1) комплексные (общие, сервисные, общественные), где коллекционируются эталонные культуры известных к данному времени видов микроорганизмов с целью систематики и разработки классификационных схем и методов их идентификации; (2) специализированные (коллекции при учреждениях), предназначенные для сохранения микроорганизмов профильных групп и их ценных биотехнологических свойств; (3) частные (исследовательские), держатели которых заинтересованы в сохранении определённых штаммов для использования их в научно-поисковых проектах.

Одной из таких специализированных ячеек развивающейся сети микробных коллекций является созданная в ИЭГМ УрО РАН (Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН) Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов. Коллекция специализируется на поддержании микроорганизмов, ведущих окисление природных и антропогенных углеводородов.

Объём генофонда коллекции составляет около 3 тыс. чистых (аксеничных) идентифицированных непатогенных штаммов, выделенных из образцов почв, поверхностных и пластовых вод, снега, воздуха, керна, отобранных из контрастных эколого-географических регионов (например, Пермского Предуралья и Западной Сибири, Ульяновского Поволжья и Красноярского края и т.д.). Это особенно важно, ибо экологическое положение и источник выделения микробных культур определяют, во-первых, разнообразие их фенотипов, а, во-вторых, наличие таких форм изменчивости, которые могут указывать на различие в генотипах.

Ценность коллекции в том, что многие виды бактерий представлены в ней не единичными штаммами (зачастую только типовыми), а многочисленными природными изолятами из различных ареалов, что позволяет изучать экологическую пластичность видов, вопросы внутривидовой изменчивости, вести целенаправленный отбор активных биопродуцентов ценных веществ и биотрансформаторов органических соединений. В коллекции

анализ микробного разнообразия непосредственно в среде обитания (*in situ*), без необходимости выделения микроорганизмов в лабораторную культуру; метод определения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК; о том, что с помощью появившихся новых методологических возможностей сегодня с огромной интенсивностью обнаруживаются микроорганизмы ещё вчера неизвестных родов и видов с самими разными “дикушинными” комбинациями свойств, новых форм микроорганизмов, таких как экстремофилы, развивающихся в необычных местах обитания; о том, что микроорганизмам теперь всё чаще отводится место в широких международных инициативах, в качестве приоритетных направлений которых обозначено интенсивное изучение микроорганизмов, связанных с деятельностью человека и участвующих в восстановлении затронутых этой деятельностью экосистем; одними из таких представителей являются актинобактерии (бывшие актиномицеты); о том, что сегодня предпринимаются попытки определить стоимость микробных ресурсов в терминах рыночной экономики; о том, что истинное разнообразие микроорганизмов изучено ещё очень слабо – лишь около 1 % для бактерий, основная доля находится в пока недоступном для нас некультивируемом состоянии; о роли коллекций микробных культур, которую они играют в период стремительного развития биотехнологии – отрасли, отражающей уровень научно-технического и социально-экономического прогресса любой страны; об одном из наиболее важных достижений новой систематики XX в. – открытии нового первичного царства живых существ, новой группы микроорганизмов – архей и построении тритомиического филогенетического древа микроорганизмов; о предложенных Вёзе и его коллегами 3 доменах: *Eucarya* (эукарии, бывшие эукариоты), *Bacteria* (бактерии, относившиеся к эубактериям, и цианобактерии) и *Archaea* (археи, ранее относившиеся к экстремальным бактериям, затем к архебактериям); о том, что прокариотный тип организации живых существ представлен двумя стволами глобального древа.

Прежде чем анализировать возможность построения единой устойчивой естественной системы бактерий, современные

(“the uncultivated majority – microbial dark matter”) [Hug et al., 2016; Hugenholtz et al., 2016; Overmann et al., 2017].

Дерево жизни значительно расширилось благодаря возможности получения новой геномной информации о ранее неизвестных микроорганизмах. Всеобъемлющее изображение современного филогенетического дерева иллюстрирует прогресс, достигнутый за последние два десятилетия после первого опубликованного генома, и выявляет глубину эволюционной истории исследованных объектов в пределах *Prokaryotes*. Существенным дополнением на рис. 4 являются обозначенные стрелками эффекты горизонтального переноса генов. Долгое время горизонтальная передача генетической информации между членами ветвей канонического древа считалась невозможной. С середины прошлого столетия в многочисленных экспериментах было показано, что горизонтальный перенос генов является неотъемлемым феноменом в эволюции и нынешнем существовании прокариотов (см. лекцию 6).

Лекция 2. ТЕРМИНОЛОГИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ В СИСТЕМАТИКЕ ПРОКАРИОТОВ

На предыдущей лекции мы говорили о степени изученности микробного биоразнообразия на настоящий момент, основных составляющих его – культивируемые-монстрозные, фенотипически детально охарактеризованные; опознаваемые, но некультивируемые; фантомные с неизвестным фенотипом и которые выявляются косвенно, по присутствию в природных эконизах последовательностей генов 16S рРНК, которые амплифицируются с помощью ПЦР, секвенируются и сравниваются с банком данных; и, наконец, криптические, т.е. только прогнозируемые, объекты; о том, что систематика микроорганизмов переживает период перестройки сложившихся десятилетиями представлений в связи с появившимися новыми методологическими и технологическими возможностями исследования разнообразия микроорганизмов, такими как методы обнаружения микроорганизмов на основе нуклеиновых кислот, экстрагируемых непосредственно из природных образцов и позволяющих проводить

алканотрофов широко представлены штаммы-биопродуценты промышленно ценных метаболитов (аминокислот, витаминов, ферментов, биосурфактантов) и штаммы-биодеструкторы различных загрязнителей, в том числе нефти и нефтепродуктов.

При разработке концепции профиля коллекции учитывался тот факт, что Пермский край – лидер по добыче горючих ископаемых – один из перспективных нефтегазопромысловых районов Европейской части Российской Федерации. При этом надо заметить, что в Уральском регионе и на протяжении 8 тыс. км к востоку от него отсутствуют коллекции микробных ресурсов. В Сибирском регионе действует коллекция светящихся бактерий Института биофизики СО РАН, Красноярск, в Дальневосточном отделении РАН – коллекция морских микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии, Владивосток.

Все коллекционные микробные ресурсы уникальны, и в случае утраты восстановление их посредством повторного выделения из природных популяций сопряжено с большими трудностями или вовсе невозможно.

Новая методология анализа разнообразия микроорганизмов

В самом начале формирования новой методологии анализа разнообразия микроорганизмов *in situ* в природных местообитаниях (без выделения микроорганизмов в чистую культуру) использовали анализ нуклеотидных последовательностей рибосомной 5S рРНК. Этим методом были исследованы образцы поверхностных вод, а также бактериальные эндосимбионты хемоавтотрофных беспозвоночных, обитающих в горячих источниках с температурой до 95 °С. В наиболее сложных богатых экосистемах, таких как почва, биоразнообразие в сообществе, как правило, анализируется по характерным нуклеотидным последовательностям генов 16S рРНК. Постепенно анализ гомологии рибосомной РНК из разных организмов становится инструментом новой систематики микроорганизмов. Она часто называется молекулярной систематикой или геносистематикой.

С помощью 16S рРНК начинают интенсивно исследовать почвы с целью выявления реальной картины биоразнообразия

прокариотов в природе. Однако вскоре возникли серьёзные методические трудности. Во-первых, при экстрагировании нуклеиновых кислот из почвы оказалось, что их сложно очистить от гумусовых соединений, во-вторых, при этом не всегда обеспечивается полная последовательность фрагментов генов 16S рРНК и, в-третьих, утрачивается связь биологических и эколого-трофических особенностей прокариотов.

Тем не менее благодаря сравнительному анализу последовательностей генов 16S рРНК в руках микробиологов оказался мощный инструмент и надёжный метод идентификации положения микроорганизма в филогенетической системе. В результате последние несколько десятилетий прошли под знаком ревизии системы микроорганизмов, её принципов и описания новых таксонов в масштабах, не имеющих исторических прецедентов.

Одним из наиболее важных достижений новой систематики, достижений XX в. явилось открытие новой группы микроорганизмов – архей (архебактерий по-старому). Это было сделано американским учёным Карлом Ричардом Вёзе (Woese C.R., 1928–2012) и его коллегами в 80-х гг. XX в., которые по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК построили филогенетическое (глобальное) древо микроорганизмов. Это древо оказалось не дихотомическим, соответствующим, согласно концепции Роджера Стениера (Stanier R.Y., 1916–1982) и Корнелиса ван Ниля (van Niel C.B., 1897–1985) 1962 г., двум первичным царствам: прокариотов и эукариотов, а тритомическим, состоящим из трёх основных стволов эволюции: прокариоты-бактерии, прокариоты-археи, эукариоты.

Вначале Вёзе дал этим “первичным царствам” квазитахсономические названия – два латинских и одно английское: *Eubacteria*, *Archaeobacteria*, *Eukaryotes*. Позднее он предложил рассматривать их в качестве доменов, имеющих ранг выше традиционных царств, и переименовал таким образом:

Домен первый – *Eucarya* (эукарии, бывшие эукариоты, к ним относятся простейшие, грибы, растения, животные, включая человека), два других домена – *Bacteria* (бактерии, относившиеся к эубактериям, и цианобактерии) и *Archaea* (археи, ранее относившиеся к экстремальным бактериям, затем к архебактериям). Оба домена – прокариоты.

значительное место принадлежит некультивируемым членам (линии, не имеющие изолированного представителя, обозначены некурсивленными названиями и красными точками на рис. 4). Для обработки полученной молекулярной информации с использованием методов одноклеточной геномики и метагеномики потребовалось около 4000 часов работы суперкомпьютера CIPRES (www.phylo.org/sub_sections/portal). Оказалось, что древо на рис. 4 повторяет ожидаемые группирования организмов на большинстве таксономических уровней, и общий вид последнего изображения трёхдоменного древа жизни в значительной степени совпадает с каноническим древом, построенным на основании традиционного анализа последовательности генов 16S/18S рРНК (см. рис. 2). Так, размещение на древе *Eukarya* и *Archaea* подтверждает большую близость архей к эукариотам, чем к бактериям.

Отличительной чертой сконструированного “единого древа жизни” является большое количество основных линий без изолированных представителей. Многие из этих линий собраны в дискретные участки древа. Особого внимания заслуживает эволюционная радиация филумов-кандидатов (Candidate Phyla Radiation, CPR), выделенная фиолетовым цветом на рис. 4. Согласно полученной с помощью метагеномных методов информации, члены этой группы имеют относительно небольшие геномы и ограниченные метаболические возможности. Многие из них являются симбионтами, у которых отсутствуют, например, полные циклы лимонной кислоты и дыхательные цепи, способность синтезировать аминокислоты. Не ясно, являются ли эти сниженные метаболические процессы следствием потери способностей во всём суперфилуме или это наследованные признаки, наличие которых может свидетельствовать о ранней метаболической платформе для жизни. Если они наследованные, то принятие симбиотического образа жизни могло быть более поздним нововведением у этих организмов, когда появились более сложные организмы. Другими словами, выявленное разнообразие в группе CPR может быть результатом раннего появления этой группы и/или следствием быстрой эволюции, связанной с симбиотическим образом жизни. Ясно одно, что члены этой группы явно составляют большую часть нынешнего разнообразия жизни: “некультивируемое большинство – микробная тёмная материя”

пользованием множественных выравниваний последовательностей нуклеотидов РНК малой субъединицы рибосомы (16S рРНК). Эта макромолекула принята в качестве одного из наиболее стабильных филогенетических маркеров для всех известных организмов. Авторы старались включить в эту диаграмму большинство главных групп организмов, отобранных в пропорции, учитывающей число известных видов для каждой группы. Это составило около 0,2 % от 1,7 млн описанных на то время (2003 г.) видов. В биологической систематике организмов таксономического высокого уровня до недавних пор считалось царство. Приведённый здесь список основных царств включает бактерии, археи, протисты (простейшие), грибы, растения, животные и вирусы. На диаграмме отмечено их систематическое положение. Кроме вирусов, чьё причисление к категории живых существ является предметом дискуссии.

Если ещё недавно исследователи использовали один или нескольких генов для сравнения организмов, то сегодня появились обширные возможности сравнения последовательности сотен генов и даже целых геномов у разных видов. Достижения в технологии расшифровки ДНК и биоинформатике активировали глобальные проекты по реконструкции филогенетических деревьев с большей детализацией (<http://tolweb.org/tree/>).

Недавно в журнале *Nature Microbiology* была опубликована статья под названием “Новый взгляд на древо жизни” [Hug et al., 2016]. Авторами был проведён крупномасштабный анализ результатов реконструированных ими геномов более 1000 малоизвестных и некультивируемых организмов из различных природных субстратов, а также более 300 ранее опубликованных геномов представителей всех трёх доменов (*Bacteria*, *Archaea* и *Eukarya*), отобранных из общедоступных международных баз данных. Реконструкция филогении выявила впечатляющую картину нынешнего разнообразия жизни, в которой доминируют прокариоты (дерево включает 92 валидных бактериальных и 26 архейных филумов) по сравнению с эукариотами, занимающими на древе небольшое ответвление в зоне *Archaea*, представленное 5 супергруппами (рис. 4). Такое низкое видимое филогенетическое разнообразие *Eukarya* вполне ожидаемо, исходя из сравнительно недавней эволюции эукариотов. Среди бактерий и архей

Термин “надцарство” или “домен” (самое высокое филогенетическое группирование) был введён в систематику Вёзе. Выдающийся микробиолог и эволюционист, физик по образованию и изначальным научным интересам, который работал в старейшем Иллинойском университете в Урбане-Шампейне (University of Illinois at Urbana-Champaign, UIUC), предложил разделить все живые организмы на три домена: бактерии, археи и эукариоты. Указанная транскрипция его имени, отражающая немецкое происхождение, часто встречается в русскоязычной литературе. Хотя, учитывая, что он родился в 1928 г. (скончался в 2012 г.) и вырос в США, следует, возможно, транскрибировать его имя на американский лад как Воуз.

Работы Вёзе с его учениками положили начало широкому внедрению в филогению технологии 16S рРНК как универсального молекулярного филогенетического маркера и послужили обоснованием отнесения архей к самостоятельному домену на предложенном исследователями универсальном филогенетическом древе. Развитие и внедрение в исследовательскую практику технологии 16S рРНК стало одним из наиболее существенных факторов, стимулирующих резкий рост числа работ, посвящённых обнаружению и идентификации новых видов прокариотов. Это привело к расширению метагеномных и биомедицинских исследований с извлечением и разделением суммарного генетического материала из различных природных объектов, где число анализируемых генетических последовательностей достигает десятков и сотен тысяч. Вторым стимулирующим фактором послужило появление на рынке оборудования нового поколения для секвенирования и амплификации ДНК.

Упрощённая (традиционная) версия филогенетического древа, принятая в качестве исходного стандарта, приведена на рис. 2. На нём отмечены три таксономические единицы наиболее высокого уровня, то есть надцарства или домены. Согласно результатам последних десятилетий это построение следует рассматривать лишь как первое приближение, отражающее соотношение между таксономическими группами без учёта межвидового (горизонтального) обмена генетическим материалом – процесса, в котором организм передает генетический материал другому организму, не являющемуся его потомком.

В соответствии с комментарием самого профессора Вёзе к этому рисунку, данное построение справедливо для тех стадий эволюционного развития жизни, на которых “клетка становится достаточно целостной и устойчивой к “эрозивным” (как считал Вёзе ещё в 2000 г.) эффектам горизонтального переноса генов, чтобы могли существовать истинные клеточные линии организмов” [Woese, 2000]. Позднее, однако, всё более очевидной становится преимущественно конструктивная эволюционная роль этого явления, особенно актуального именно для прокариотов.

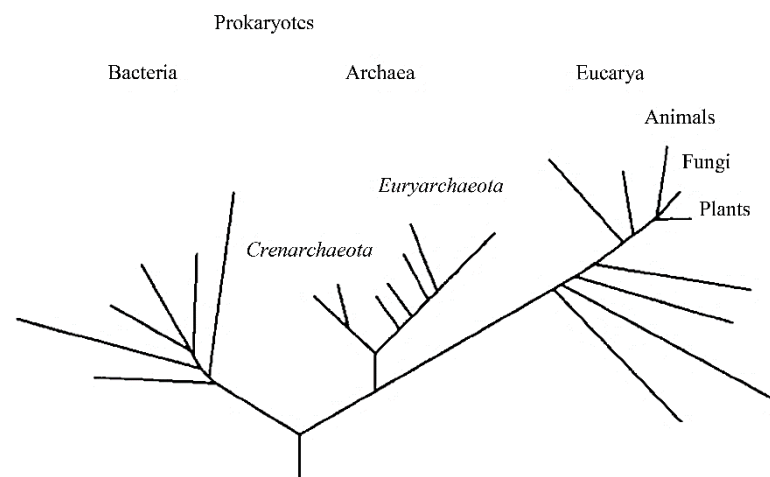


Рис. 2. Универсальное филогенетическое дерево, построенное по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16/18S рРНК [по Woese, 2000]

Сегодня прокариотный тип организации живых существ представлен двумя стволами глобального древа. По инициативе Вёзе с 1990 г. вместо термина “архебактерии” используется термин “археи” и этим подчёркивается, что архебактерии-археи необходимо рассматривать не как других бактерий, а как других прокариотов. Поэтому термины прокариоты и бактерии не могут быть употреблены как синонимы. К началу 1990-х гг. тритомическая структура древа жизни, реконструированная на основе анализа структуры рРНК, стала “тотемным столбом” биологии и уже больше не вызывала сомнений в своей объективности.

Ниже на рис. 3 представлена традиционная версия древа жизни в более детальном представлении сотрудниками университета штата Техаса (США) D.M. Hillis, D.J. Zwickl и R.R. Gutell в 2003 г. [URL: <http://www.zo.utexas.edu/faculty/antisense/downloadfilestol.html>].

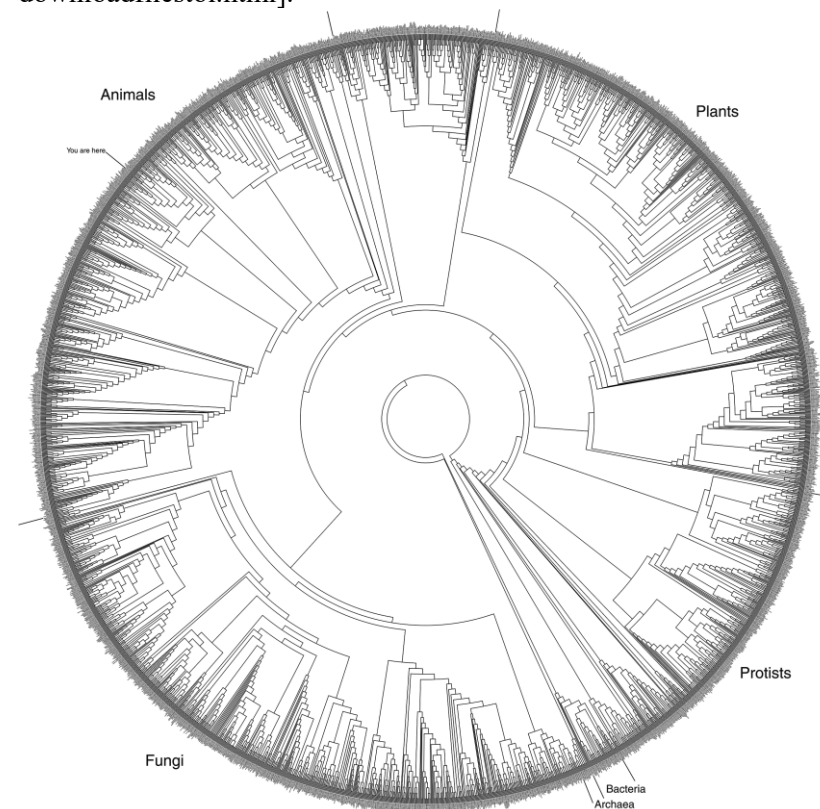


Рис. 3. Древо жизни в виде молекулярно-генетического эволюционного кругового графика [по Hillis D.M., Zwickl D., Gutell R., <http://www.zo.utexas.edu/faculty/antisense/downloadfilestol.html>; Pennisi, 2003]

Оно впервые приведено в статье [Pennisi, 2003] и построено по результатам филогенетического анализа более 3000 видов живых организмов из всего многообразия древа жизни (названия живых организмов приведены с внешней стороны круга) с ис-

Коллекционный штамм – это популяция микроорганизмов, ставшая объектом хранения или исследования в результате однократного выделения из природного материала [Пиневич, 2007]. По сути, это потомки отдельной колонии, выделенной из той или другой пробы. Следует понимать, что различия между штаммами не выходят за пределы вида. Разные штаммы одного вида обладают всеми признаками, характеризующими их как вид. Штаммы сохраняются в коллекциях в виде пересеваемых (развивающихся или покоящихся) культур, а также в анабиотическом состоянии.

Штаммы могут отличаться отдельными признаками, например, устойчивостью к антибиотикам, способностью вызывать неодинаковое по тяжести инфекционное заболевание или способностью синтезировать некоторые продукты метаболизма и т.д., но эти различия меньше, чем видовые.

Для каждого штамма обязательно указывают аббревиатуру названия коллекции культур микроорганизмов, в которой он хранится, и номер, под которым он там значится. Например, *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 333 означает, что штамм хранится в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ) под номером 333.

Список микробных коллекций, пользующихся мировой известностью, приводится во Всемирном справочнике коллекций культур (World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms, <http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/home/content>).

В лаборатории часто применяется процедура клонирования с целью получения изолированных клонов, причём в качестве исходного материала может использоваться чистая или смешанная культура. Клон (от греч. “klon” – отводок) у прокариотов – это потомство индивидуальной клетки при размножении в природе или лаборатории.

Клон – более узкое понятие, это популяция генетически родственных клеток, полученная неполовым путём из одной родительской клетки, потомки отдельной (индивидуальной) клетки. Другими словами, это культура, полученная при размножении одной клетки данного штамма.

функциональная, искусственная, формальная и т.д. Это обусловлено целями и задачами, которые положены в основу системы. Филогенетические (естественные) классификации отражают эволюционные связи и родство между разными группами организмов. Фенотипические (искусственные, традиционные) классификации преследуют практическую цель – установление принадлежности микроорганизма к определённому таксону.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в создании филогенетической системы классификации, но сохраняют своё значение фенотипические классификации, более удобные для идентификации микроорганизмов. При классификации прокариотов учитывается большое количество различных признаков (критериев систематики): чем больше сходных признаков имеют сравниваемые микроорганизмы, тем больше оснований для включения их в одну группу.

Весьма необоснованно длительное время современные классификации бактерий считались филогенетическими. Авторы предложенных схем классификации предполагали, что об общности происхождения бактерий могут свидетельствовать, например, общие метаболические пути, так как предполагается, что каждый фермент возник лишь единожды во время эволюции, или одинаковый химический состав структурных компонентов клетки, так как каждый такой компонент отражает определённый биосинтетический путь.

К таким классификациям долгое время относилась “естественная” систематика спорообразующих дрожжей, разработанная Владимиром Ильичом Кудрявцевым (1900–1999), и систематика истинных бактерий и актиномицетов, принадлежащая крупнейшему отечественному микробиологу-флористу Николаю Александровичу Красильникову (1896–1973). Ещё до недавнего времени этими системами широко пользовались. Однако в действительности эти классификации были фенотипическими, поскольку основывались на сходстве морфолого-физиологических свойств организмов, филогенетические связи которых только предположительны.

Организмы в этих системах группируются в один таксон на основании следующих типов информации: (1) значительного фенотипического сходства; (2) наличия признаков, позволяющих

предполагать общее происхождение; (3) действительного родства. Однако заключение о родстве бактерий делалось обычно в результате анализа пунктов 1 и 2, а информация 2 пункта вытекала из информации, представленной в пункте 3. Такие рассуждения, которые не подкрепляются независимыми доказательствами, встречаются в систематике микроорганизмов очень часто.

Фенотипические (фенетические) связи (близость) организмов определяются на основании общего сходства, установленного при анализе всех доступных признаков без какой-либо их оценки, безотносительно к их происхождению. При этом следует отметить, что случаи фенотипического сходства подразделяются на связанные с общностью происхождения и на вызванные конвергенцией.

Подходы филогенетической и фенотипической классификаций различны. Преимущество фенотипической классификации в том, что для неё необходимы только описания произвольно выбранных признаков, и поэтому она возможна для всех групп организмов, особенно на первых этапах таксономического описания. В то время как филогенетическая классификация требует более глубоких сведений об эволюционных связях между организмами. Это оказалось возможным благодаря внедрению в таксономию бактерий молекулярно-биологических методов.

Построение естественной (филогенетической) классификации – конечная цель систематики бактерий. Эта цель состоит в том, чтобы объединить родственные формы, связанные общностью происхождения, и на этой основе создать филогенетическое древо бактерий. *“Время придёт..., когда у нас будут истинные генеалогические деревья каждого великого царства природы”*, – сказал ещё 160 лет назад (в 1859 г.) Ч. Дарвин (Darwin C.R., 1809–1882).

Классификация бактерий должна отражать точно (насколько это возможно) их естественные связи, которые считаются филогенетическими связями, закодированными в высококонсервативных макромолекулах, таких как гены 16S или 23S рРНК.

Классификация может быть представлена деревом, состоящим из узлов и соединяющих узлы линий (рис. 5).

Культуры типовых штаммов хранятся в коллекциях мирового уровня. Наиболее представительными официальными коллекциями являются Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC, Роквилл, штат Мэриленд, США, свыше 45 тыс. культур), Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Германия, свыше 31 тыс. культур), Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ, Пущино–Москва, Россия, около 20 тыс. культур), Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва, Россия, свыше 20 тыс. культур, в 2014 г. была преобразована в Национальный биоресурсный центр, БРЦ ВКПМ) и др.

В случае утери типового штамма возможна его замена на так называемый неотиповой штамм. При этом должно быть подтверждено, что свойства нового штамма хорошо совпадают с описанием утерянного.

Чтобы показать, что таксон предлагается впервые, после названия нового рода добавляется сокращённая комбинация “gen. nov.”, а для нового вида – “sp. nov.”.

Следует отметить, что целесообразность типового подхода к классификации микроорганизмов может оспариваться, ибо согласно принципу “приоритет” типовым видом предлагается считать вид, который при начальной публикации рода был его единственным представителем. Наиболее уязвимым моментом применения номенклатурных типов является то, что эти типы необязательно являются наиболее типичными элементами таксона. Например, типовым видом рода *Rhodococcus* считается *Rhodococcus rhodochrous*, предложенный и описанный Фридриком Цопфом (Zopf F.W.) ещё в 1891 г.

Такие термины, как “штамм” и “клон”, не относятся к таксономическим категориям. Под штаммом (от нем. “stamen” – происходить, “stamm” – племя) понимают чистую культуру микроорганизмов одного вида, выделенную из конкретного места обитания (почвы, воды, снега, воздуха, какого-либо организма, пищевых продуктов). Штамм – более узкое понятие, чем вид или подвида.

В 1989 г. были опубликованы обновления всех названий таксонов за период с 1 января 1980 по 1 января 1989 г. [Moore, 1989]. В настоящее время полный обзор валидно опубликованных названий доступен через интернет-сайты: www.bacterio.cict.fr/ или www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php. Все законные названия таксонов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Firmicutes* приведены в современной базе данных номенклатуры прокариотов (The Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date database, <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>).

Предложения о новых таксонах можно делать в любых журналах, но законными они будут только с момента их включения в Списки подтверждения достоверности (Validation Lists), регулярно публикуемые в Международном журнале систематической и эволюционной микробиологии. Основное условие для валидной публикации названий заключается в требовании, чтобы типовой штамм нового вида был депонирован в две общепризнанные общественные (сервисные) коллекции культур микроорганизмов в разных странах. В случае если для одного организма валидно опубликованы два разных названия, номенклатурный приоритет остаётся за названием, которое первым получило законную силу. В результате применения такой практики можно легко отследить все валидные виды любой группы и при этом всегда доступны референс-штаммы.

Таксоны, эффективно опубликованные, приводятся в научной литературе не в кавычках, например, *Pseudomonas putida*, если таксон не утверждён, то название его приводится в кавычках, например, "*Rhodococcus luteus*".

Другим важным условием официального признания нового названия прокариотного таксона является типификация – указание типа таксона, т.е. носителя наименования. Типом таксона высокого ранга является входящий в него таксон более низкого ранга: номенклатурный тип рода – это типовой вид; номенклатурный тип для вида – типовой штамм, т.е. штамм, выбранный в качестве постоянного образца вида, живая чистая культура организма. Все остальные штаммы, которые можно отнести к этому виду, следует сравнивать с типовым штаммом данного вида.

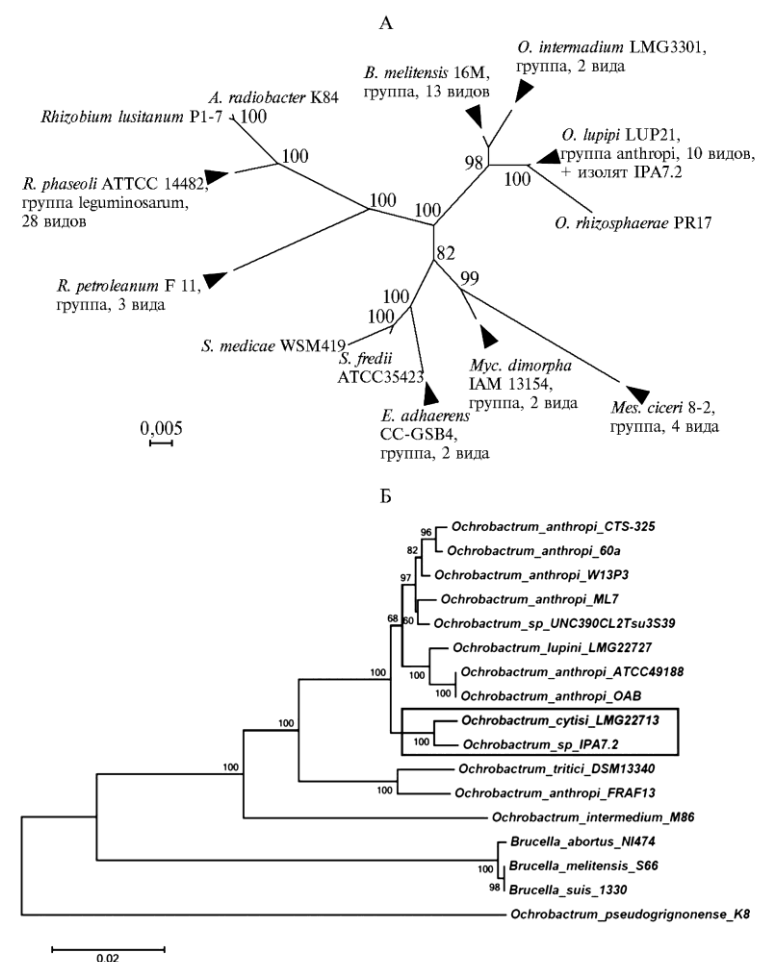


Рис. 5. Примеры изображения филогенетических деревьев. А – филограмма, построенная по методу MrBayes с множественным выравниванием последовательностей методом Clustal Omega. Указаны сокращенные родовые названия *Agrobacterium*, *Brucella*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*. Цифрами показана статистическая поддержка узлов (байесовская апостериорная вероятность, %) [по Бурыгину и др., 2017]. Б – филогенетическое древо (NJ) по результатам мультилокусного анализа нуклеотидных последовательностей (MLSA). Цифры около узлов – значения их статистической поддержки в циклах бутстрепинга [по Щеголеву, Бурыгину, 2018]

Каждый узел соответствует определённому признаку. Ярусы дерева составлены из признаков, образующих разбиение признаков на классы. По сути, классификационное дерево – это диагностический ключ: каждому таксону соответствует маршрут, соединяющий узлы, расположенные в разных ярусах. Несмотря на внешнее сходство классификационного и филогенетического деревьев, отличие их в том, что в филогенетическом дереве таксонам соответствуют узлы, а в классификационном – маршруты. Концы ветвей классификационного дерева – окончания маршрутов, обозначающих таксоны низшего ранга. Общим является то, что филогенетическое и классификационное деревья отражают увеличение числа признаков в одном случае в процессе исторического развития, в другом – при переходе от общего к частному, подобно тому, как в эволюции возрастает объём генома, в классификации увеличивается число признаков.

По Вёзе, исходя из таких признаков, как последовательность нуклеотидов в консервативных нуклеиновых кислотах или последовательность аминокислот в функционально сходных ферментных белках, можно создать филогенетическую систематику прокариотных организмов [Woese, 1987, 1994]. Вёзе была предложена в своё время и разработана ныне общепотребительная система классификации по одному консервативному внутреннему признаку – рибосоме. Эта система оказалась наиболее подходящей для целей идентификации, она полностью подменила классификации по функциональным свойствам [Заварзин, 2011б].

Итак, филогенетическая классификация учитывает родственные (генетические, эволюционные) связи между прокариотами. Для установления степени родства используются сравнительный генетический анализ и анализ строения рибосомальной 16S РНК у прокариотов и 18S у эукариотов. Преимущества использования рибосомной РНК как объекта для анализа следующие: широкая распространённость, изофункциональность, консервативность первичной структуры. На основании строения рРНК организмы были разделены на царства *Eucaryotae* – эукариоты; *Eubacteria* – эубактерии (истинные бактерии), митохондрии и хлоропласты; *Archaeobacteria* – архебактерии.

этому вопросу. Характерная особенность действующего Списка состоит в том, что сюда включены только достаточно описанные, валидные, т.е. законные, официально зарегистрированные виды, типовые штаммы которых хранятся в официально признанных микробных коллекциях.

Поскольку в настоящее время лавинообразно описываются всё новые виды прокариотных организмов, в Международном журнале систематической и эволюционной микробиологии ежегодно публикуются дополнения к списку. Отныне могут использоваться в научной печати только приведённые в этом списке таксоны. Прочих названий для профессионалов не существует.

В 1992 г. в Вашингтоне с учётом нового стартового документа – Одобрённых списков наименований бактерий и новой стартовой даты в микробиологии (1 января 1980 г.) выходит в свет новое издание Международного кодекса номенклатуры бактерий [Lapage et al., 1992; <http://www.bacterio.net/code.html>].

Итак, введение Одобрённых списков названий бактерий имело целью исключить употребление многочисленных синонимов в названиях бактерий, вводящих в заблуждение специалистов. Международный кодекс номенклатуры бактерий отличается от Ботанического кодекса тем, что типом вида в нём служит штамм, т.е. живая чистая эталонная культура организма. Сегодня все таксоны должны быть валидно описаны в полном соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры прокариотов. Настоящие правила вытекают из действующих принципов (применение принципов регулируется правилами). К наиболее важным принципам относятся принцип “опубликование”, принцип “типификация” и принцип “приоритет”.

Согласно действующему принципу кодекса “опубликование”, названия новых (вновь предлагаемых) таксонов должны быть действительно (эффективно) опубликованными в Международном журнале систематической и эволюционной микробиологии в виде отдельной статьи или в другом журнале с последующим направлением оттиска статьи с описанием таксона в Международный журнал систематической и эволюционной микробиологии для эффективного опубликования в “Листах валидации” (“Validation Lists”).

работу по пересмотру существующих наименований бактерий с целью упорядочения номенклатуры и сохранения названий только тех таксонов, которые адекватно описаны и для которых доступен типовой штамм. Было решено свести все эти названия воедино в списки научных наименований бактерий. Специалистами разных стран, привлечёнными комитетом, была проделана титаническая работа по ревизии огромного количества описанных таксонов, пересмотрено много устаревших и бесполезных названий.

Через семь долгих лет, в 1980 г., итоговые материалы были опубликованы в Международном журнале систематической бактериологии (International Journal of Systematic Bacteriology, Int. J. Syst. Bacteriol., IJSB) под названием Одобренные списки наименований бактерий (в другом переводе Список признанных названий бактерий) (Approved Lists of Bacterial Names). С января 2000 г. Международный журнал систематической бактериологии называется Международным журналом систематической и эволюционной микробиологии (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., IJSEM).

Экспертами-микробиологами-таксономистами были пересмотрены диагнозы бактерий и после публикации в 1980 г. Одобренных списков наименований бактерий было решено ввести новую дату рождения номенклатуры бактерий – 1 января 1980 г. вместо 1 мая 1753 г.

Дата 1 января 1980 г. – новый рубеж в развитии систематики прокариотов, новая точка отсчёта в их номенклатуре. Более двух с половиной веков отделяют его от 1 мая 1753 г. – даты появления работы Карла Линнея “Species plantarum”, положившей начало Международному кодексу ботанической номенклатуры, регламентирующему образование и применение научных названий растений.

В современное время используется Список наименований прокариотов с постоянной номенклатурой (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, LPSN), созданный Жаном Юзеби (Euzéby J.P.) [Euzéby, 1997; <http://www.bacterio.net>] и теперь поддерживаемый Эйданом Парте (Parte A.), который сводит воедино накопленные за двести лет знания о прокариотических таксонах и представляет собой исчерпывающий справочник по

В отличие от естественной искусственная классификация служит лишь для решения практических задач – идентификации организмов – и носит ограниченный характер, ибо чаще всего основывается на признаках, удобных с точки зрения практики. Любая искусственная система предназначается для практического использования – быстрой идентификации бактерий и установления принадлежности их к определённым таксонам. Для идентификации исследуются разные свойства микроорганизма.

Достаточно полным и удачным представляется определение термина “таксономический признак”, данное Карлом-Гансом Шлейфером (Sleifer K.-H.) и Отто Кандлером (Kandler O.) [Schleifer, Kandler, 1972]. Признак должен быть: (а) широко распространён среди представителей классифицируемого таксона; (б) детерминирован многими генами, это обеспечит его стабильность и сократит возможность проявления сходства, обусловленного конвергенцией; (в) не зависимым от стадии роста организма и факторов внешней среды. При этом устанавливаться простыми рутинными методами. Другими словами, под признаком, имеющим таксономическое значение, понимается такая устойчивая наследственная комбинация качеств организма, которая не подвержена случайным изменениям и не может рассматриваться как нечто неделимое, не являясь таковым по существу.

В последние годы плодотворно исследуются филогенетические отношения прокариотов благодаря прогрессу в областях генетики, биохимии и молекулярной биологии, который сделал возможным расшифровку и использование памяти макромолекул в целях воссоздания эволюционной истории организмов. Успехи этого сравнительно молодого направления таксономических исследований привели к пересмотру многих сложившихся представлений и норм. В 70-е гг. прошлого столетия многие систематики пришли к выводу о том, что классификации не обязательно должны быть иерархическими, а “ветви” иерархического древа могут частично совпадать или пересекаться. В конце XX в. благодаря прогрессу в областях генетики, биохимии и молекулярной биологии концепция об иерархических непересекающихся классификациях, которая так долго привлекала человеческие умы, была пересмотрена.

Идентификация

Идентификация – часть таксономии – процесс, в котором организм принимается (узнаётся) как принадлежащий к известному таксону (виду, роду) и обозначается соответственно. Она опирается на сравнение признаков неизвестного объекта с уже установленными объектами, чтобы дать ему соответственное научное название. Это означает, что идентификация зависит от адекватной характеристики исследуемого объекта.

Как часть стратегий идентификации, дихотомические ключи на основе морфологических и биохимических признаков были лишь частично заменены другими методами. Таксономические исследования обеспечивают впечатляющий диапазон альтернативных методов, полученных из аналитической биохимии и молекулярной биологии для исследования многочисленных клеточных веществ [Goodfellow, O'Donnell, 1993, 1994]. Методы молекулярной диагностики и иммунохимического анализа обсуждаются в лекциях 5 и 9 соответственно. Каждая из рассматриваемых методик пригодна для характеристики и, следовательно, идентификации бактерий. Базы данных аннотированных последовательностей ДНК и РНК, жирно-кислотных компонентов целых клеток, масс-спектры MALDI-TOF и инфракрасные спектры преобразований Фурье (FTIR) или мини-комплекты фенотипических характеристик могут обеспечить идентификацию новых изолятов. Успех таксономических исследований зависит от точности используемых методов и от того, как тщательно были очерчены отдельные объекты.

Лекция 3. ПРИНЦИПЫ НОМЕНКЛАТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Мы говорили о дифференцировании понятий “систематика”, “классификация” и “таксономия”, сейчас остановимся на таком специальном разделе систематики, как “номенклатура”.

Номенклатура как язык систематики

Номенклатура микроорганизмов – всеобщая речь, важнейший элемент языка общения между специалистами. Язык этот

фикации научных названий и разработки точной системы номенклатуры прокариотов. Все бактерии и археи (прокариотные организмы) получают имена (научные названия) согласно правилам Международного кодекса номенклатуры прокариотов.

Номенклатура мицелиальных грибов и водорослей регламентируется Международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (до 2011 г. Международным кодексом ботанической номенклатуры), номенклатура вирусов – Вирусологическим кодексом (Международным кодексом классификации и номенклатуры вирусов, International Code of Virus Classification and Nomenclature). Для дрожжевых грибов основным руководством является сериальное издание “The Yeasts. A Taxonomic Study” [Kurtzman et al., 2011].

Издание и изменение кодекса осуществляется под контролем Международного комитета по систематике прокариотов (International Committee on Systematics of Prokaryotes, ICSP) (до 1999 г. Международного комитета по систематике бактерий, International Committee on Systematic Bacteriology, ICSB), входящего в Международный союз микробиологических обществ (International Union of Microbiological Societies, IUMS). Все решения об изменении научных названий микроорганизмов и изданиях кодекса принимаются на пленарных заседаниях международных микробиологических конгрессов.

Особо следует подчеркнуть, что компетенция Международного кодекса номенклатуры прокариотов распространяется только на правила присвоения и использования научных названий бактерий, и архей, а также на определение адекватных типовых штаммов. Вопросы классификации той или иной группы прокариотов решаются вне зависимости от кодекса на базе проводимых таксономических исследований. Кодекс не указывает, какие методы следует использовать для описания микроорганизма, т.е. не касается теории классификации.

В микробиологии долгое время наблюдалась довольно досадная путаница в названиях бактерий, иногда бактерии получали по несколько названий или одним и тем же именем назывались разные бактерии. В связи с этим на заседании Юридической комиссии Международного комитета по систематике бактерий, состоявшемся в Иерусалиме в 1973 г., было решено организовать

(аббревиатуры) subsp. или ssp. (subspecies) и подвидового эпитета, например, *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*. Подвид – таксономический ранг ниже ранга вида. При этом подвиды не могут быть определены изолированно: вид определяется либо как совсем не имеющий подвидов, либо как имеющий два подвида или более, но у него не может быть одного подвида. Как правило, характеристики, отнесённые к подвиду, развиваются в результате географического распространения и географической изоляции организма.

Микробиологи длительное время (до середины XX в.) использовали правила, восходящие к “Species plantarum” Карла Линнея 1753 г., т.е. ботаническую номенклатуру. Только в 1930 г. на I Международном микробиологическом конгрессе в Париже была организована Комиссия по номенклатуре и таксономии бактерий, которая начала подготовительную работу по созданию первого Международного кодекса номенклатуры бактерий и вирусов, который вышел в свет в 1958 г.

Затем для вирусов была введена новая отличающаяся система номенклатуры. Поэтому на I Конгрессе по бактериологии в 1973 г. в Иерусалиме была принята новая редакция Международного кодекса номенклатуры бактерий (International Code of Nomenclature of Bacteria, ICNB) или Бактериологический кодекс (Bacteriological Code, BC). Он был издан в Вашингтоне в 1975 г. (на русском языке вышел в 1978 г.).

Этот Кодекс повторял правила бинарной ботанической номенклатуры, но в отличие от Ботанического кодекса содержал важное положение, согласно которому при описании нового таксона образец чистой культуры в жизнеспособном состоянии (а не гербарный образец) должен быть сдан в официально признанную коллекцию культур в качестве типового штамма, т.е. штамма для сравнения (эталонного и референс-штамма). Типовой штамм – штамм, выбранный в качестве постоянного образца вида.

Таким образом, Международный кодекс номенклатуры бактерий (с 2008 г. название изменено на Международный кодекс номенклатуры прокариотов, International Code of Nomenclature of Prokaryotes, ICNP или Prokaryotic Code) – это собрание принципов, правил и рекомендаций, предназначенных для уни-

должен быть точен, однозначен, особенно сегодня, когда изучение и инвентаризация (ревизия) разнообразия микроорганизмов является предметом интереса специалистов многих стран мира. По сути, это присвоение названий соответствующего таксономического ранга классифицируемым организмам.

Номенклатура представляет собой свод правил наименования таксонов. В отличие от многообразия классификаций микроорганизмов, номенклатура бактерий менее подвержена изменениям, так как она подчиняется международным правилам.

В середине XVIII столетия (1753 г.) знаменитый шведский натуралист Карл Линней (Carl Linne, 1707–1778) предложил двойную (бинарную, биномиальную, от лат. “bis” – дважды) номенклатуру для обозначения каждого вида живых существ. 1 мая 1753 г. – дата появления на свет работы Карла Линнея “Виды растений” (“Species plantarum”), в которой он предложил каждое растение, животное или микроорганизм обозначать двумя латинскими словами.

Согласно предложенному номенклатурному принципу в название каждого вида входит наименование рода, т.е. родовое имя сопровождается видовым эпитетом. При этом род – обычно существительное, вид – прилагательное. Первое слово означает род, второе – конкретный вид этого рода и называется видовым эпитетом.

В номенклатуре прокариотных организмов используют разные смысловые элементы, чаще всего произвольного характера. В наименование вида или рода бактерий и архей вводится в первую очередь физиологический или любой общебиологический признак, личное имя, форма клетки, географический ареал, первоначальное место обнаружения, размеры клетки, это может быть участие в симбиозе или особенность поведения (в частности способность к быстрому росту или магнитной ориентации) и т.д. Например, вид *Sarcina lutea*. *Sarcina* – (от лат. “sarcina” – пакет, связка, тюк) – скопление шарообразных бактерий в виде пакета, *lutea* – от лат. “luteus” – жёлтый; *Vibrio cholerae* – вибрион, вызывающий холеру.

Все названия таксонов подчиняются грамматике классической латыни: *Rhodococcus luteus*, но *Mycobacterium luteum*. Ла-

тинские названия рода и вида всегда пишутся курсивом. Латинские названия приняты во всем мире. Это даёт возможность избежать путаницы, вызываемой существованием различных вариантов общепринятых названий.

В микробиологии принято роды бактерий часто называть именами крупных микробиологов, имеющих приоритет в исследовании данного организма. Например, род условно-патогенных энтеробактерий *Klebsiella* назван в честь немецкого бактериолога Эдвина Клебса (Klebs E., 1834–1913). Кишечная палочка *Escherichia coli* – бактерия, которую принято считать показателем санитарного состояния воды, – названа в честь немецкого микробиолога Теодора Эшериха. В честь американского микробиолога Даниела Сэлмона (Salmon D.E., 1850–1914) назван род энтеробактерий *Salmonella*. Представители данного таксона являются возбудителями наиболее распространённых инфекций – сальмонеллёза и брюшного тифа. Недавно описанному новому виду архей *Pyrococcus woesei* присвоено имя Карла Вёзе.

В родовых названиях прокариотов нередко отражают также важные биохимические функции организма, например, *Lactobacterium* – молочно-кислые бактерии, *Sulfolobus* – организмы, окисляющие сернистые соединения, *Methanobacterium* – бактерии, превращающие органические кислоты и спирты в метан, *Methylococcus* – бактерии, окисляющие метан и др.

Родовое имя и видовой эпитет могут содержать по одному смысловому элементу, например, *Bacillus subtilis* – “палочка, тонкая” или по 2–4 смысловых элемента, например, *Ectothiorhodospira halochloris* – “окружённая серой пурпурная спирилла, имеет отношение к поваренной соли”, род архей *Desulfurococcus* (от лат. “de” – уничтожение, “sulfur” – сера и греч. “coccus” – зерно) – “кокк, уничтожающий серу”, т.е. в качестве акцептора электронов данным организмом используется сера.

В последние годы в связи с тем, что археи, как правило, занимают экстремальные ниши, сложилась традиция давать им названия в терминах потустороннего мира. Например, выделенные из гидротермных экосистем археи называли *Acidianus infernus* (от лат. “infernum” – ад) или экстремофильно-галофильные археи – *Pyrococcus occultus* (от лат. “occultus” – потаённый) и др.

Не рекомендуется увековечивать персон, не имеющих отношения к микробиологии, неэтично называть объекты в честь самого себя, своих партнеров и прочих заинтересованных лиц.

В случае опознаваемых, но некультивируемых форм часто отсутствует информация о фенотипических признаках, ибо сведения об их фенотипе в основном ограничиваются только морфологией, или (в случае фантомных объектов) родство которых установлено на основании амплификации и сиквенс-анализа генов РНК с использованием прокариотных праймеров. Для некультивируемых организмов, не имеющих родового имени и видового эпитета, предложена таксономическая категория *Candidatus* с добавлением предварительного (временного) родового и видового названия (до выделения их в чистую культуру), например, “*Candidatus Scalindua sorokinii*” или “*Candidatus Scalindua brodae*”, обнаруженные в очистных сооружениях, окисляющие в анаэробных условиях аммоний и играющие, очевидно, значительную роль в очистке сточных вод от соединений азота ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$).

Следует помнить: родовое название всегда пишется с заглавной буквы, видовое – со строчной даже в том случае, если видовой эпитет присвоен в честь учёного, например *Clostridium pasteurianum*. В тексте всё словосочетание (название *рода* и *вида*) выделяют курсивом. При повторном упоминании названия микроорганизма родовое название надо сокращать до одной или нескольких начальных букв, например *C. pasteurianum*. Если в тексте встречаются названия двух микроорганизмов, которые начинаются с одной и той же буквы (например, *Clostridium pasteurianum* и *Citrobacter freundii*), то сокращения должны быть разными (например, *C. pasteurianum* и *Ct. freundii*).

Если организм идентифицирован только до рода, вместо видового эпитета пишут сокращённое слово sp. (species – вид), например, *Pseudomonas* sp. (при этом sp. не выделяют курсивом). В случае повторного упоминания названия микроорганизма в тексте родовое название следует всегда писать полностью *Pseudomonas* sp.

Название подвида (лат. subspecies) состоит из трех слов: обозначения рода, видового эпитета, общепринятого сокращения

R., 1843–1910) в 1881 г. В 1882 г. его сотрудники супруги Вальтер и Фанни Гессе (Hesse F., 1850–1934, Hesse W., 1846–1911) предложили использовать для уплотнения среды вместо желатина агар-агар – водорастворимый полисахарид, который образует красная водоросль *Gelidium corneum* (2–40 см в диаметре) и который не метаболизируется большинством бактерий.

Следует особо отметить, что микробиология XX в. была построена на исследовании чистых культур, что дало представление о разнообразии метаболических путей микроорганизмов, осуществляемых ими биохимических процессах и их роли в биосфере.

В 1887 г. Юлиус Рихард Петри (Petri J.R., 1852–1921) придумал гениально простое приспособление – ёмкость для культивирования бактерий на плотной питательной среде в отсутствие воздушного загрязнения, под защитой от внешних воздействий – “чашку Петри”. Будучи изобретённой в 1887 г., чашка Петри до сегодняшнего дня не потеряла свою актуальность. Она является незаменимой лабораторной посудой в микробиологии. Достоинство такой чашки – способность выдерживать воздействие химических и термических режимов стерилизации. Она изготавливается из стекла, современные чашки Петри бывают ещё из пластических материалов и служат для одноразового использования. Основной минус такой чашки – недолговечность, тогда как стеклянная чашка Петри многоразовая, её можно использовать повторно. Размеры стандартной чашки – диаметр порядка 100 мм, высота – около 15 мм.

После введения чистых культур в повседневную практику микробиологических исследований было разработано множество тестов отличия одних бактерий от других и описано большое число новых видов бактерий. Этот процесс и сегодня продолжает “приносить” от 600 до 800 новых видов бактерий в год [Overmann *et al.*, 2017].

В 1884 г. датский врач Ганс Христиан Грам (Gram H.C.J., 1853–1938) предложил способ дифференциального окрашивания бактерий, позднее названный “окрашиванием по Граму” (от англ. Gram staining). Доктор Грам был очень скромным человеком и в своей первой публикации отметил: “... я публикую метод не смотря на то, что знаю, что сейчас он имеет недостатки

Под термином “генетически модифицированные” или “рекомбинантные” штаммы понимают штаммы микроорганизмов, полученные в результате генно-инженерных манипуляций. Часто новые штаммы микроорганизмов получают с помощью мутагенов.

Кроме понятия “штамм” ранее применяли термины “вариант”, “тип”, “форма”. Они обычно использовались для обозначения штаммов микроорганизмов, отличающихся по некоторым признакам от типового штамма. Для обозначения этих штаммов применяли суффикс “var” или “type” (разновидность). Штамм, отличающийся от типового по морфологическим особенностям, называют морфовар или морфотип; физиологическим свойствам – биовар или биотип, или физиологический тип; способности синтезировать определённые химические соединения – хемовар или хемоформа, или хемотип; условиям культивирования – культивар; экологическим нишам – эковар; антигенным характеристикам – серовар или серотип; устойчивости к антибиотикам – резистенс-вар; чувствительности к бактериофагам – фаговар и т.д.

Одним из важнейших понятий в микробиологии является понятие “культура”. Под лабораторной или производственной культурой понимают популяцию микроорганизмов, помещённую в питательную среду в замкнутое пространство или культиватор. Различают развивающиеся культуры и неразвивающиеся или покоящиеся культуры, а также культуры, пребывающие в состоянии анабиоза.

Чистая (аксеничная, от греч. “а” – не, “хенос” – чужой, без посторонних) культура – это культура, состоящая из клеток только одного организма. Другими словами – это популяция выделенных однородных микроорганизмов, состоящая из особей одного вида. Смешанная (не аксеничная, ксеничная, от греч. “хенос” – чужой, с посторонними) культура – это совокупность микроорганизмов, состоящая из особей разных видов.

Определение вида – один из самых трудных вопросов в теории систематики прокариотов. Согласно известному определению американского зоолога Эрнста Майра (Mayr E., 1944–2019), у высших эукариотов виды представляют собой группы скрещи-

вающихся естественных популяций, которые репродуктивно изолированы от других таких же групп. Иными словами, “*вид есть защищённый генофонд*” [Майр, 1971; Мауг, 1942].

Прокариоты размножаются исключительно вегетативным способом, только агамно (посредством клонирования, в природных популяциях или лабораторных культурах клонирование происходит спонтанно, в итоге образуется смесь клонов) и их популяции не разделены географическими барьерами. Кроме того, прокариотам свойственен промискуитет (от англ. “promiscuity” – неразборчивые связи), что выражается в горизонтальном перемещении генов между неродственными объектами при помощи молекулярных векторов (плазмид и вирусов). Поэтому в определение вида у прокариотов не входит критерий репродуктивной изоляции. Взамен него ведущим критерием становится комплекс фенотипических признаков и инфраструктурных особенностей генома, на основе которых совокупность родственных особей распознаётся отдельно от эквивалентной ей совокупности [Пиневиц, 2007].

В разное время предлагались различные концепции вида прокариотов, полное обсуждение которых можно найти в обзорной статье [Achtman, Wagner, 2008]. По Н.А. Красильникову [1949], вид у прокариотов – это совокупность близких между собой организмов (особей), имеющих общий корень происхождения, характеризующихся (на данном этапе эволюции) рядом общих морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических признаков и приспособленных к определённой среде обитания. Другими словами, вид – совокупность генетически родственных клональных популяций из разных местообитаний или группа генетически родственных коллекционных штаммов [Пиневиц, 2007].

Более современное определение: вид – таксономическая категория, ограничивающая генотипически объединённую группу индивидуальных организмов из разных местообитаний или группу генетически родственных коллекционных штаммов, имеющих высокую степень сходства разнообразных независимых признаков, определяемых экспериментально в строго стандартизированных условиях [Rosselló-Móra, Amann, 2001; Stackebrandt et al., 2002].

Тем не менее из-за того, что у бактерий есть клеточная стенка, их отнесли в группу низших растений (*Thallophyta*) и стали рассматривать как примитивную группу “бесхлорофильных грибов-дробянок”.

Выдающаяся заслуга в разработке классификации бактерий в 1870-е гг. принадлежала немецкому ботанику Фердинанду Кону, ученику Христиана Эренберга. В 1872 г. он проводит классификацию бактерий с использованием морфологических признаков и высказывает мысль о том, что форма бактерий не зависит от условий окружающей среды, признаёт существование большого морфологического разнообразия бактерий и вводит для бактерий бинарную номенклатуру К. Линнея.

Фердинанд Кон (Cohn F.J., 1828–1898) в 1875 г. назвал бактериями одноклеточные микроорганизмы, размножающиеся бинарным делением и не имеющие ядра. Он рассматривал бактерии как растения, находящиеся в близком родстве с сине-зелёными водорослями, и разбил бактерии по форме клеток на группы, располагая их по мере усложнения морфологии: кокки, короткие палочки, удлинённые палочки, спирали. По сути, он обосновал ботаническое направление в микробиологии, рассматривая микробиологические объекты как часть ботаники.

Кон предложил 4 трибы с шестью формами – родами: *Sphaerobacteria* (шаровидные бактерии, род *Micrococcus*); *Microbacteria* (палочковидные бактерии, род *Bacterium*); *Desmobacteria* (нитевидные бактерии, рода *Bacillus* и *Vibrio*); *Spirobacteria* (спиралевидные бактерии, рода *Spirillum* и *Spirochaeta*). При этом сделал уточнение, что микроорганизмы со сходной формой клеток могут значительно отличаться в физиологии, составе конечных продуктов метаболизма и способности вызывать болезни. Кон все ещё поддерживал идею о том, что форма бактерий остаётся неизменной независимо от условий окружающей среды, но уже признавал существование широкого разнообразия бактерий.

В то время ещё не было разработано надёжных методов получения и лабораторного культивирования чистых культур, поэтому говорить о разграничении отдельных видов было просто невозможно. Огромное влияние на развитие бактериологии оказал метод получения чистых культур путём посева колоний на твёрдых желатиновых средах, который изобрёл Роберт Кох (Koch

“Анималкулы в настояях, реках и морях” (“Animalcula infusoria fluviatilia et marina”). В своём труде все известные на то время “инфузории” он подразделил на 18 родов по таким признакам, как форма, подвижность, способность к образованию клеточных агрегатов, среда обитания. Среди описанных им родов были *Monas* и *Vibrio* – первые идентифицированные бактерии сферической и эллипсоидной формы, хотя туда попали и протисты со сходной морфологией.

В начале XIX в. эту систему расширил немецкий натуралист Христиан Готфрид Эренберг (Ehrenberg C.G., 1795–1876). Он использовал для анатомического исследования одноклеточных микроорганизмов усовершенствованную модель микроскопа и в 1838 г. опубликовал работу “Анималкулы из настоев как самостоятельные организмы”, в которой все бактерии разделил по внешнему признаку на роды *Bacterium*, *Monas*, *Spirillum*, *Spirochaeta* и *Vibrio*, т.е. добавил в мюллеровскую классификацию спиральные (“извитые”) бактерии. Он описал некоторые фототрофные бактерии, ввёл видовые обозначения бактерий, например *Spirillum volutans* и *Spirochaeta plicatilis*, которые до сих пор находятся в употреблении, в 1828 г. ввёл в употребление термин “бактерия”.

Итак, до последней четверти XIX в. бактерии считали низшими животными. Однако в 1878 г. швейцарский и немецкий ботаник Карл Вильгельм фон Негели (von Nägeli C.W., 1817–1891) обнаружил, что представители *Acetobacter xylinum* и *Sarcina ventriculi* содержат целлюлозу, что позволило ему сделать вывод о кардинальном отличии бактерий от животных и их сходстве с растениями, у которых этот полимер уникален и входит в состав клеточных стенок. Негели пересмотрел господствовавшее представление о таксономическом положении бактерий и переподчинил их растительному царству как класс *Schizomyceae* (от греч. “schizo” – раскалывать пополам и лат. “mycelium” – грибница, “грибы, размножающиеся бинарным делением”). Но вскоре выяснилось, что Негели столкнулся с редким случаем синтеза бактериальной целлюлозы (которая к тому же откладывается снаружи, а не в составе стенок). Позже выяснилось, что бактерии действительно имеют клеточную стенку, однако она содержит не целлюлозу, а азотсодержащий полимер – муреин.

Как провести границу между видами прокариотов? Объективные единые критерии вида у бактерий и архей отсутствуют, они в значительной степени условны. В настоящее время границы вида устанавливаются путём консенсуса. По рекомендации Международного комитета по систематике бактерий, разными видами являются штаммы, у которых содержание ГЦ-пар в ДНК различается больше, чем на 5 %; степень ДНК-ДНК гибридизации меньше, чем 30 % и различие нуклеотидных последовательностей 16S рРНК больше 2 %. Более подробная информация о современной концепции прокариотного вида представлена в лекции 6.

Категории таксономической иерархии

В систематике прокариотов приняты следующие ранги таксонов (категории таксономической иерархии как аналоги тех, что имеются в схеме классификации эукариотов), которые соподчинены друг другу (латинские суффиксы и эквиваленты приводятся в скобках курсивом). Вид (Species) – род (Genus) – семейство (-aceae, Familia) – порядок (-ales, Ordo) – класс (-ia, -bacteria, -ae, -etes, -i, es, Classis) – царство (Regnum), отдел, тип или филум (-archaeota (для архей), -bacteria, -a, ae-, -i, -es, -ia, -microbia, -etes, Phylum) – домен или империя (-a, Domain). Эти категории называют обязательными.

Для прокариотных организмов предусмотрены также не обязательные категории (необязательные ранги) таксонов: подтип (Subphylum), подкласс (-idae, Subclassis), подпорядок (-inae, Subordo), подсемейство (Subfamilia), подрод (Subgenus), подви́д (Subspecies). Однако они используются в последнее время в систематике прокариотов довольно редко.

Названия таксонов, имеющих ранг рода и выше, униномиальны (унитарны), т.е. обозначаются одним словом, тогда как названия видов биномиальны (бинарны), т.е. обозначаются двумя словами – название рода и вида. Например, *Rhodococcus ruber* или *Mycobacterium tuberculosis*. Второе слово бинарного названия вида, взятое отдельно, не имеет статуса в номенклатуре и не может быть использовано для научного обозначения микроорганизма.

Ниже на примере рода *Legionella* приводится иерархия таксонов: домен *Bacteria* – филум *Proteobacteria* – класс *Alphaproteobacteria* – порядок *Legionellales* – семейство *Legionellaceae* – род *Legionella* – вид *Legionella pneumophila* – подвида *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*.

Старшие таксоны (надцарства или домены) насчитывают 3 операционные таксономические единицы (ОТЕ): бактерии, археи и эукариоты. На уровне царств их число равно 8: эукариоты – протисты, хромисты, растения, грибы и животные; прокариоты – бактерии и археи; вирусы, занимающие особое место, и чья принадлежность к живым организмам является предметом острой дискуссии. По мере углубления в филогенетические конструкции (от старших рангов к младшим) число ОТЕ растёт и на уровне видов достигает порядка нескольких миллионов.

Расположение таксонов в восходящий ряд соподчинённых форм известно, как иерархическая система классификации. Иерархическая система расположения таксонов предназначена, главным образом для того, чтобы помочь запоминанию. При этом число иерархических уровней, необходимых для удобного распределения среди них всего многообразия микробного мира, установлено совершенно произвольно, этим уровням иерархии даны традиционные наименования и расположены они в общепринятом порядке, которого следует придерживаться. Задаёт отношения соответствующего строгого порядка между таксонами разного ранга Номенклатурный кодекс, что приводит к построению иерархического древа.

В заключение следует подчеркнуть, что всякая классификация строится для достижения определённой цели. Одно и то же множество объектов может быть классифицировано разными способами. В этом отношении для познания роли бактерий в природе их классификация на основе морфофизиологических родов оказалась чрезвычайно удобной, потому что она соответствовала их функциональной роли в природных процессах. Искусственные классификации предназначены для сферы прикладной микробиологии. Примерами их могут быть попытки группирования продуцентов антибиотиков или других веществ, при котором в одну группу попадают представители различных физиологических групп, например, автотрофы, нитрификаторы, метаногены,

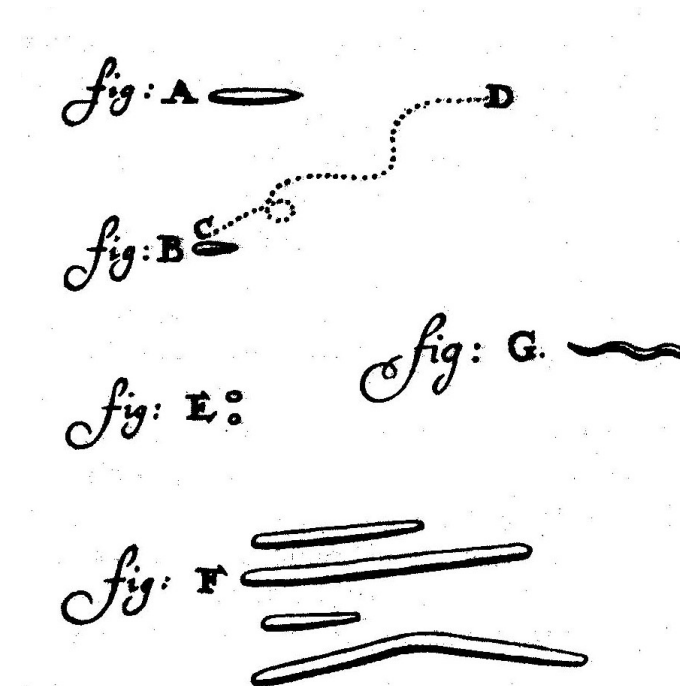


Рис. 6. Первые рисунки бактерий, взятых из налёта зубов людей 17 сентября 1683 г. Антони ван Левенгуком, посланные в письме № 39 в Королевское общество в Лондоне

Левенгук назвал бактерий ещё “наливочными” животными или “инфузориями” (от лат. “*infusion*” – увлажнение), поскольку они накапливались в замоченном сене или других растительных настоях. Линней был знаком с работами Левенгука, однако не нашёл у “инфузорий” морфологических признаков, достаточных для того, чтобы их классифицировать как самостоятельную группу животных. Поэтому он назвал бактерии “сомнительными” видами (от лат. “*specia dubia*”) и поместил их в “непознаваемый” род *Chaos*, где рядом с ними также очутились протисты (одноклеточные эукариоты, простейшие) и плоские черви.

Первая попытка научной классификации бактерий принадлежит немецкому исследователю Отто Фредерику Мюллеру (Müller O.F., 1730–1784), который в 1786 г. опубликовал труд

увеличением размеров. Левенгук, наблюдая, как плавают ани-малёчки, не сомневался, что у них есть конечности. Левенгук не был учёным, он был торговцем тканей. Чтобы выбирать лучшие ткани, нужны были увеличительные стёкла. Ему приходилось из-готовлять двояковыпуклые линзы вручную.

История удивительного открытия бактерий Левенгуком, обессмертившего его имя, началась в конце XVII в., точнее в 1676 г. с помощью элементарной короткофокусной лупы, уникальность которой заключалась в её разрешающей силе (в 1,5 мкм), превосходившей в несколько раз имевшиеся в то время микроскопы (они давали увеличение в лучшем случае в 100 раз, а лупы Левенгука давали линейное увеличение в 300 раз). Современный оптический микроскоп даёт увеличение в 1300 раз. До наших дней не раскрыта тайна изготовления главной детали лупы Левенгука, которую он получал путём обтачивания и шлифовки стеклянного шарика. Кроме того, эта лупа была крайне неудобна для наблюдателя с нормальным зрением, поскольку её приходилось подносить вплотную к глазу. Сам Левенгук был близоруким, однако это не мешало ему не только увидеть бактерий, но и в общих чертах описать их морфологию (рис. 6). При этом он был настолько точен и объективен, что мы догадываемся, о каких бактериях идёт речь. Левенгука по праву можно считать основоположником не только цитологии, но и физиологии прокариотов, так как в числе прочего он выяснил, например, что бактерии при нагревании или после обработки ук-сусом теряют подвижность.

метилотрофы. Подобные классификации не следует рассматри-вать как неправомерные или неадекватные, поскольку они по-лезны для определённых целей. Искусственная классификация может не отражать действительное разнообразие внутри выде-ленных групп. Организмы могут быть распределены по таксоно-мическим рангам (вид, род, семейство), однако в этих рангах не следует искать какого-либо эволюционного содержания.

В идеале предковые таксоны должны позволять выявлять филогенетическая классификация и указывать продолжитель-ность их эволюционирования до новых таксонов. Для использо-вания знаний о биоразнообразии микроорганизмов необходимо усвоение разных классификаций, которые позволяют описать су-щественные свойства объектов исследования. Применительно к задачам исследования приходится опираться на ту или иную классификацию.

Лекция 4. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ СИСТЕМАТИКИ ПРОКАРИОТОВ

На предыдущих лекциях говорили о том, что в настоящее время описано около 5×10^3 законных видов бактерий и архей, это не более 0,3 % видового разнообразия ядерных химер, о том, что истинное биоразнообразие прокариотов состоит из 4 каче-ственно и количественно неравноценных пулов: культивируемые объекты, некультивируемые, фантомные и криптические объ-екты, о содержании терминов, принятых в систематике, принци-пах номенклатуры бактерий. Обсуждали схему глобального фи-логенетического древа, стволы которого соответствуют предло-женным Карлом Вёзе мегатаксонам *Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*. Домены *Bacteria* и *Archaea* состоят из ветвей, соответствующих филогенетическим таксонам (филам). Среди прокариотных фил есть не только фенотипически охарактеризованные, но и фантом-ные филы. Термин “домен” не устраивает тех, кто привык к тер-мину “царство”. Тем не менее термин “домен” прочно обосно-вался в биологическом словаре и официально введён с 2001 г. во 2-е издание Руководства Берджи по систематике бактерий.

Систематика прокариотов является сравнительно молодой и самой динамичной из всех биосистематик. В отличие от систематики растений и животных, она не пользовалась палеонтологической летописью. Считалось, что поскольку бактерии имеют микроскопический размер и простую морфологию, то их окаменелости невозможно отличить от похожих абиотических структур – псевдофоссилий (от англ. или нем. “ложная окаменелость”, понимается природный объект, который, обладая структурой или составом неорганических минералов, может быть принятым по ошибке за ископаемый органический остаток). Поэтому тема палеомикробиологии не обсуждалась, практические задачи, связанные с разработкой методов для изучения древних микроорганизмов, не ставились.

В связи с этим в разработку системы бактерий в разное время закладывались различные принципы и закономерности, обусловленные определённым уровнем знаний о биологии бактерий в каждый конкретный отрезок времени.

Сомнения в том, что существуют достоверные ископаемые остатки бактерий, развеялись только в середине 1970-х гг. в результате исследований, проведённых микробиологами совместно с геологами и геохимиками, ископаемых строматолитов и микрофоссилий.

Ископаемые строматолиты (от греч. “stroma” – ложа, “lithos” – камень) представляют собой продукты жизнедеятельности прокариотов, обнаруженные в породах, образованных 3,5 млрд лет назад. Это слоистые окаменелости, сформировавшиеся в прошедшие геологические периоды в результате прижизненной минерализации микробных матов. Микробные маты – высокоструктурированные смешанные микробные сообщества, обитающие на дне морских и континентальных водоёмов и состоящие из цианобактерий, пурпурных и зелёных аноксигенных фототрофных бактерий, хемоорганогетеротрофных бактерий. Строматолиты образуются и в современный геологический период, морфологически они сходны со строматолитами, которые широко распространены в морских и наземных докембрийских биотах.

степени сходства, как и степени родства между этими организмами, то попытка создания на этой же основе систематики прокариотов не была успешной.

Изначально микробная систематика опиралась на видимые (наблюдаемые) базовые фенотипические характеристики, такие как морфология, ростовые характеристики или патогенность. Затем стали использовать физиологические и биохимические свойства бактерий. В период 1960–1980 гг. развиваются хемотаксономия и нумерическая таксономия. Позже систематика обратилась к молекулярным анализам для установления эволюции микробного мира.

История развития бактериальной систематики представлена несколькими этапами. Их развитие связано с использованием определённых групп признаков. Критерии, применяемые для очерчивания видов, разрабатывались параллельно с развитием и усовершенствованием микробиологических методов исследования.

Морфологический этап

Первый этап в развитии бактериальной систематики – морфологический. В исследованиях господствует описательный характер, микробы изучаются исключительно с помощью микроскопа и без учёта их эволюции. Считалось, что все бактерии представляют собой всего лишь один вид с большим разнообразием форм (теория плеоморфизма).

Мы уже знаем, что значение бактерий в общем строе биоты и место их в биологической мегасистеме окончательно определились только в конце 1970-х гг. XX в., тогда как для растений и животных аналогичную задачу решил шведский ботаник Карл Линней (Linnaeus C., 1707–1778) ещё в первой половине XVIII в.

Исследователи XVIII в. не пытались классифицировать бактерии, а первоначально место для бактерий искали в царстве животных или растений. Неудивительно, что первооткрыватель бактерий Антони ван Левенгук (van Leewenhoek A., 1632–1723) считал их “живыми зверьками” (от лат. “*vivi animalcule*”), ибо главным признаком животных – представителей царства *Animalia* – считали подвижную жизнь с относительно медленным

На метеорите Шерготти, тоже появившемся с Марса и обнаруженном в Индии почти сразу после того, как он упал, найдены признаки микробных биоплёнок. В настоящее время нет твёрдых доказательств наличия бактерий на поверхности самого Марса. Известно, что бактерии с Земли выживали в течение нескольких лет на поверхности Луны, но аборигенные бактерии на поверхности Луны не были выявлены. Таким образом, есть возможность, что бактерии выживут за пределами Земли, и весьма вероятно, что они существуют где-то ещё.

Мир прокариотов (включающий бактерии, цианобактерии и археи) существует на Земле не менее 4 млрд лет. Этому периоду предшествовал этап её интенсивной метеоритной бомбардировки между 4,6 и 4,0 млрд лет тому назад. По-видимому, примитивные формы жизни могли быть занесены на Землю из ближнего или далёкого космоса. В дальнейшем на Земле происходила лишь их эволюция в высокоразвитые многоклеточные организмы. В последние годы эта точка зрения завоевывает всё больше сторонников. Здесь уместны слова академика Алексея Юрьевича Розанова [2000]: *“Принципиальное морфологическое единство земных микробных организмов – как современных, так и древних – с псевдоморфозами по микроорганизмам из углистых хондритов даёт основание для утверждения о единстве микробиологического мира Земли и космических объектов”*.

В систематике прокариотных организмов существуют два направления. Первое – это каталогизация форм – производится на основе не связанных между собой признаков. Второе – это построение системы на основе филогенетических данных, полученных путём комплексного всестороннего изучения организмов. Развитие этих направлений связано с использованием определённых групп признаков. Существуют 2 типа систематики биологических объектов: филогенетическая или естественная, в основе которой лежит установление родственных (эволюционных) связей между организмами, и практическая или искусственная, цель которой в выявлении степени сходства между организмами для быстрой идентификации и установлении принадлежности к определённым таксонам. Если существующая систематика высших организмов отражает в определённой мере эволюционные связи между ними, т.е. признаки, используемые для выявления

Микрофоссилии – это окаменевшие или мумифицированные остатки оболочек, чехлов, отдельных структур и компонентов клеток древних форм цианобактерий. В начале 1980-х гг. палеобиологи Джеймс Шопф (Schopf J.W.) и Эндрю Кнолль (Knoll A.H.) провели анализ древнейших микрофоссилий на шлифах докембрийских осадочных пород возрастом 1,5–3,5 млрд лет и при микроскопировании отдельных окаменевших микроорганизмов и тончайших распилов микрофоссилий получили представление о форме, размере клетки, организации микроколоний ископаемых бактерий и даже их ультраструктуре. Оказалось, что микроископаемые (большинство микрофоссилий, относящиеся к раннему докембрию) почти не отличаются от современных цианобактерий. При сравнении ископаемых одноклеточных и нитчатых цианобактерий (650 образцов из более 200 геологических формаций) с 600 образцами современных цианобактерий выяснилось, что микрофоссилии можно идентифицировать с точностью до рода. Поэтому им присваиваются названия современных цианобактерий с добавлением приставки *palaeo-* (например, *Palaeolyngbya*). На основании геологических и геохимических данных, результатов радиоуглеродного анализа сделан вывод о том, что цианобактерии были широко распространены более 2 млрд лет назад.

Наряду со строматолитами и микрофоссилиями палеомикробиологическими документами служат некоторые типы биомолекул, которые сохраняются после прекращения жизнедеятельности клетки почти без изменений на протяжении геологических периодов. Это происходит потому, что они, в отличие от белков и углеводов, имеют жёсткий каркас, нечувствительный к ферментативному или абиотическому воздействию. Они (в переносном смысле) являются “молекулярными ископаемыми” (англ. *molecular fossil*).

Особое место среди таких биомолекул занимают некоторые типы липидов, представляющих собой углеводороды с разветвленным и/или циклическим скелетом. Они называются рекальцитрантными биомолекулами (от лат. *“re-calcitro”* – не поддающийся разрушению). Для каждого из трёх филогенетических доменов можно назвать специфические рекальцитрантные ли-

пиды: фитаны – для домена *Archaea*, стероиды – для *Eucarya* и го-паноиды (пентациклические тритерпены) – для *Bacteria*. В осадочных породах, возраст которых насчитывает 2,5 млрд лет, обнаружены гомологи го-паноидов, входящих в состав современных цианобактерий.

“Молекулярными ископаемыми” признано считать и макромолекулы, первичная структура которых несёт в себе наследственную информацию – геномные нуклеиновые кислоты – ДНК у клеточных организмов, ибо в структуре этих макромолекул имеются консервативные участки, сохраняющиеся на протяжении сотен миллионов и даже миллиардов лет. Поэтому, определяя и сравнивая последовательности нуклеотидов в составе ДНК или РНК, можно нарисовать филогенетическое древо, дающее представление об эволюции.

Сравнительно недавно начались исследования (благодаря разработке методов выведения клеток из глубокого анабиоза) реанимированных древних бактерий: некоторые прокариоты сохраняют жизнеспособность на протяжении геологических периодов при условии полного анабиоза. После реанимации древние бактерии можно изучать с помощью традиционных цитологических и физиологических методов. В 1998 г. появилось сообщение о выделении живой культуры *Staphylococcus succinus* – бактерии, вегетативные клетки которой в течение 25–35 млн лет хранились в куске янтаря из Доминиканской Республики (Южная Америка). В 2000 г. были обнаружены вегетативные клетки *Bacillus* sp., сохранившие жизнеспособность в результате анабиоза продолжительностью в 250 млн лет и благополучно реанимированные из кристаллов поваренной соли (штат Нью-Мехико, США).

Большой интерес представляют работы американских учёных, проводимые под руководством Ричарда Гувера (Hoover R.V.), главы группы астробиологии НАСА. Морфологические исследования сколов метеоритов, проведённые с использованием полевой эмиссионной сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, показали, что обнаруженные в каменных углеродсодержащих метеоритах (их называют хондрами) структуры аналогичны остаткам прокариотов (“бактериоморфам”). Интерпретация их как микрофосси-

лий вызвала бурную дискуссию в основном критического характера (как это было и при находках первых микрофоссилий в отложениях докембрия). Безусловно, возможность имитации минералами, например железа, морфологии микробных и, точнее, цианобактериальных форм может иметь место. При этом многие исследователи предполагают, что все “биоморфные структуры” скорее являются аборигенными окаменелостями, а не результатом свежего “биологического загрязнения” при падении метеоритов на Землю. Одновременное присутствие органических веществ вместе с “биоморфами” в метеоритах ставит под сомнение их интерпретацию как свидетельство абиотической предэволюции [Заварзин, 2015].

Сравнение с использованием полевой эмиссионной сканирующей электронной микроскопии нитчатых микрофоссилий, обнаруженных в углистом метеорите Оргейл (Orgueil), возраст которого 4,5 млрд лет близок к возрасту Земли, с представителями современных цианобактерий *Calothrix* выявило большое сходство их формы. В сочетании с палеонтологическими данными значительно увеличивается вероятность того, что микробная жизнь может существовать в ледяных полярных шапках и вечной мерзлоте Марса, водосодержащих астероидах, ядрах комет, в поверхностных льдах таких ледяных спутников, как Европа (Юпитер) и Энцелад (Сатурн).

Возможно ли присутствие представителей прокариотных видов на других планетах? Ответить на этот вопрос сейчас пока не представляется возможным. Поиск древних водных путей и сбор образцов грунта на поверхности планеты Марс привели к предположению о том, что планета, возможно, имела достаточно воды (необходимое условие жизни, как мы понимаем) в какой-то момент. Более того, обнаружение в отобранных образцах бактериоморфных структур, которым было дано название *Gillevinia straata*, подтверждает эту точку зрения. Метеорит ALH84001 откололся от Марса 17 млн лет назад и упал на Антарктику 11000 лет назад. Электронная микроскопия метеорита выявила образования, подобные бактериям, но непонятно, были ли они сформированы атмосферными явлениями или возникли в результате длительного воздействия антарктической среды.

Выбору рибосомных генов в качестве молекулярных хронометров способствовал и тот факт, что для них давление естественного отбора осуществляется не на белок, ими кодируемый, а непосредственно на первичную структуру самого гена, поскольку его конечным продуктом является РНК-копия. Кроме того, преимущественное использование рибосомных генов в качестве филогенетических маркеров обусловлено их универсальностью, высокой степенью консервативности первичной структуры, функциональной стабильностью, сравнительной лёгкостью определения их последовательности (секвенирования) и, наконец, особенностями первичной и вторичной структур, связанными с присутствием в их нуклеотидных последовательностях участков с различной степенью вариабельности (что даёт возможность оценивать отдалённые и близкие родственные отношения между сравниваемыми организмами). Гены рРНК не участвуют в горизонтальном переносе и находятся в клетке в достаточном количестве. Размер генов 16S рРНК не слишком велик (у прокариотов он составляет 1540–1640 п.н.) и вполне достаточен для обеспечения статистически достоверной точности анализа, нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК широко представлены в постоянно пополняющихся общедоступных базах данных: EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net>), Silva (<https://www.arb-silva.de/>) и др.

Таким образом, у микробиологов появилась удобная экспериментальная возможность с помощью единой (универсальной) методологии осуществлять построение всеобъемлющих филогенетических схем, что, несомненно, приближает исследователей к созданию наиболее естественной системы живых организмов, т.е. опирающейся на их филогенетические взаимоотношения, возникшие в процессе эволюции.

Развитие молекулярной систематики в микробиологии оказалось особенно успешным в силу ряда особенностей прокариотных организмов. С одной стороны, по сравнению с систематикой эукариотов успехи микробиологов в филогенетике нельзя было назвать значительными. Последовательное введение в систематику эукариотов эволюционных принципов позволило создать стройные непротиворечивые системы, опирающиеся на реальные

и несовершенен; но я также надеюсь, что в руках других исследователей он превратится во что-то полезное". С той поры прошло 135 лет, но до настоящего времени на этом методе окрашивания клеток основывается начальная диагностика (первичная идентификация) бактерий. Сейчас используют следующую процедуру: клетки окрашивают кристаллическим фиолетовым, затем обрабатывают разбавленным раствором йода, который образует с красителем нерастворимый комплекс, далее промывают спиртом. Спирт удаляет краситель из оболочек Грам (-) (грамотрицательных) бактерий, Грам (+) (грамположительные) бактерии, наоборот, удерживают краситель.

Далее в 1890–1900-е гг. с использованием принципов Коха и новых методов предпринимаются дальнейшие новые попытки детализировать систематику бактерий. В это время возникает идея создания бактериологических музеев. Первая коллекция микробных культур была основана в 1890 г. в Праге Франтишком Кралем (Kral F., 1846–1911). Она стала всемирно известной как "Коллекция микроорганизмов Кральшека" ("Kralsche Sammlung von Mikroorganismen"). В 1904 г. была создана коллекция микроорганизмов (Das Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS) в Баарне (Голландия); в 1920 г. – Национальная коллекция типовых культур (National Collection of Type Cultures, NCTC) в Лондоне (Англия), первая в мире коллекция, которая предлагала услуги по поставке бактериальных культур; в 1925 г. – Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC) в Вашингтоне, поддерживающая большое разнообразие микроорганизмов. Были созданы коллекции во Франции в институте Пастера и Парижском университете, в Германии в институте Роберта Коха в биологическом центра Reichsanstalt. Первые коллекции служили для обучения микробиологов и демонстрации бактерий. Только после 30-х гг. прошлого века было оценено значение коллекций для сохранения эталонных культур и развития таксономии бактерий. Коллекционное дело получает развитие на основе Всемирной федерации коллекций культур (The World Federation for Culture Collections, WFCC, <http://www.wfcc.info>), основанной в Копенгагене (Дания) в 1947 г. Эта организация сегодня успешно осуществляет координацию сотрудничества коллекций из разных стран.

В конце XIX и первых двух декадах XX в. происходило лавинообразное накопление информации о свойствах уже известных бактерий и описание новых видов бактерий. Так, в 1896 г. немецкие исследователи Карл Леман (Lehmann K.B.) и Рудольф Ньюман (Neumann R.O.) в своём труде “Атлас и описание бактерий” (нем. “Atlas and Grundriss der Bacterien”) все известные бактерии подразделяют по внешнему виду, числу и расположению жгутиков на 3 семейства: *Coccaceae*, *Bacteriaceae*, *Spirillaceae*. При этом главное внимание уделяют диагностике бактерий, интересных для медицины и микробиологического производства. Эти авторы описали несколько новых родов бактерий *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*.

Классификаций предложено было много, в их основе лежали принципы морфологической классификации, заложенные Коном ещё в 1870-е гг. Например, в 1897 г. немецкий ботаник и художник Вальтер Мигула (Migula W., 1863–1938) разработал систему, объединяющую все виды бактерий, известные к концу XIX в. Его называют пионером систематики бактерий, первооткрывателем важного в биотехнологическом отношении рода *Pseudomonas* в 1894 г., для которого Мигула описал экологические и клинические характеристики. В его честь назван в 1999 г. вид бактерий *P. migula*. Доминирующая роль в представленной им классификации отводилась уже физиологическим характеристикам. Значительное количество новых бактериальных родов было описано также отечественным микробиологом Сергеем Николаевичем Виноградским (1856–1953) и нидерландским биологом Мартином Бейеринком (Beijerinck M.W., 1851–1931).

Со временем стало ясно, что простые организмы сложно определять на основе видимой под микроскопом морфологии и одни морфологические признаки недостаточны для удовлетворительного распределения микроорганизмов по таксономическим группам. Простота строения бактерий, отсутствие типичного ядра и других органоидов в их клетках, а также полового процесса исключали возможность использования морфологического метода в той степени, как это имело место в фенотипической систематике растений. Исключался и исторический метод,

в энергетическом метаболизме. Надо заметить, что сравнительные результаты, полученные при секвенировании белков (сиквенс-анализе белков или определении аминокислотных последовательностей), нашли применение в частной классификации бактерий, однако не оказали заметного влияния на мегасистематику прокариотов.

По мере развития молекулярной биологии нуклеиновых кислот полипептиды стали всё реже использовать в качестве семантид, а всё чаще для изучения филогенетического взаимоотношения бактерий (в начале 1960-х гг.) применять методы тотальной характеристики ДНК, как то: метод определения молекулярного содержания ГЦ пар в ДНК, методы ДНК-ДНК и ДНК-рРНК-гибридизации, метод ДНК-зондов. В середине 1970-х гг. К. Вёзе предлагает новый метод для анализа молекулярной филогении живых организмов, основанный на секвенировании не белков, а нуклеиновых кислот. Показателем дивергенции служили не аминокислотные последовательности, а нуклеотидные последовательности универсально распространённых генов. В качестве семантид были выбраны рРНК, т.е. полинуклеотиды, входящие в состав рибосом. Парно сравнивались рРНК малой или большой субъединиц. В случае прокариотов это 16S рРНК и 23S рРНК, а в случае эукариотов – 18S рРНК и 28S рРНК.

Рибосомная филогенетика

В конце 70 – начале 80-х гг. работы учёных группы К. Вёзе дали начало направлению, которое получило название “рибосомной” филогенетики и сыграло особую роль в систематике микроорганизмов. Идеология “рибосомной” филогенетики – признание рибосомных РНК в качестве идеального молекулярного хронометра для реконструкции эволюционной истории и построения “универсального дерева” живых организмов [Woese, 1987].

Принципиальное преимущество применения молекулярно-биологического подхода для изучения эволюции живых организмов по сравнению с традиционным фенотипическим подходом – возможность сравнения отдалённых организмов, которые могут совсем не иметь общих фенотипических признаков, оценки ранга таксона (например, семейство, порядок, класс) и времени их дивергенции от общего предка.

Учёные считали, что “сравнительное изучение последовательности мономеров макромолекул ДНК, РНК и белков позволит установить филогенетические отношения между микроорганизмами”. Они отталкивались от идеи, что филогению можно изучать не только путём сравнения фенотипов, но и путём сравнения физической структуры геномов. Выполнить такую задачу в 1965 г. было практически невозможно, поэтому в качестве индикаторов филогении, указывающих на последовательность происхождения организмов, было решено использовать наиболее консервативные гены или закодированные в них белки.

Поскольку молекулярная биология в 1960-е гг. опиралась главным образом на достижения химии белка, то первоначально в качестве семантид анализировали продукты отдельных генов: белки (ферродоксины, цитохромы, перекисная дисмутаза и др.) и полипептиды. Считается, что сравнение аминокислотной последовательности белков основано на отражении первичной последовательности генов организма и может служить показателем родственности (близости) штаммов. Собственно аминокислотная последовательность белков – это, по сути, “отпечатки пальцев” ДНК бактерий. Считается, что большинство существующих белков эволюционировало, по-видимому, из очень небольшого количества архетиповых белков посредством генетического удвоения и последующей дивергенции (расхождения). При сравнении белков одной группы (например, цитохрома *c*, участвующего в переносе электронов, или ферродоксина) считается, что чем больше различие аминокислотных последовательностей белков у двух штаммов, тем более далеки они эволюционно. На основании изучения аминокислотных последовательностей была предложена филогенетическая структура как для прокариотов, так и для эукариотов [Schwartz, Dayhoff, 1978]. Для сравнительного анализа белков используется электрофорез. Электрофоретическое определение профилей белков базируется на предположении, что близкородственные организмы характеризуются идентичными клеточными белками.

В первую очередь секвенировали (т.е. анализировали аминокислотные последовательности) цитохромы – практически универсальные редокс-ферменты, играющие ключевую роль

ибо палеонтологические свидетельства о предковых формах бактерий отсутствовали или были ничтожны и недостаточны для воссоздания эволюционной истории бактерий.

Физиологический этап

По мере дальнейшего углублённого изучения биологии бактерий и развития цитофизиологических и биохимических методов их исследования было выявлено значительное физиологическое разнообразие микробных форм, в руках бактериологов оказалось оружие, которое пускали в ход только при изучении высших организмов.

В противоположность ботанической системе возникает физиологическая система. Наступает физиологический (физиолого-биохимический) период в развитии систематики бактерий. Хотя деление на физиологические и биохимические признаки весьма условно, более того, даже в основе морфологических признаков лежат определённые биохимические свойства организмов.

С этого момента для классификации бактерий стали использовать не только морфологические, но и функциональные признаки (т.е. наличие или отсутствие определённых типов ферментов). Чтобы определить генеалогические связи между группами бактерий и в конечном итоге воссоздать (реконструировать) филогенетическое древо, предстояло ранжировать признаки по степени архаичности, т.е. определить, какие из них были приобретены в процессе эволюции раньше, какие – позже. При решении этой задачи ведущая роль сначала отводилась общей физиологии.

В 1909 г. датский микробиолог Сигурд Орла-Йенсен (Orla-Jensen S., 1870–1949) делает первую попытку построить естественную классификацию бактерий на основе родственных связей между ними и известных к тому времени физиологических признаков. В 1909 г. выходит в свет его труд “Основные направления естественной бактериальной систематики” (нем. “Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems”). Этот труд оценивается как исходная точка к началу применения физиологических признаков в систематике микроорганизмов. Орла-Йенсен пишет:

“Разделение живых существ должно проводиться главным образом в соответствии с их внутренними свойствами, а не внешней формой”.

Система Орла-Йенсена строилась на основе таких физиологических характеристик, как потребность в кислороде и различных питательных веществах, определяемая способностью к продуцированию различных энзимов. В качестве главных групп, отражающих ход эволюции, Орла-Йенсен называет следующие: (1) бактерии, не использующие органические вещества ни в качестве углерода, ни в качестве источника азота, – это так называемые автотрофные бактерии, строящие свои углеводы и белки из CO_2 и неорганических солей; (2) бактерии, которые требуют органических источников углерода, но обходятся в отсутствие органических источников азота – такие бактерии строят свои белки из органических кислот, аммиака, азота или нитритов; (3) бактерии, которые подобно животным требуют органических источников углерода и азота. Орла-Йенсен высказывает предположение о том, что к примитивным физиологическим признакам относится автотрофия, и поэтому самыми архаичными среди бактерий должны быть автотрофы.

Как отмечает представитель голландской школы микробиологов Корнелис ван Ниль (van Niel C.B.), главное достоинство систематики Орла-Йенсена в *“отходе от утвердившейся номенклатурной процедуры и приближении к объяснению постепенной эволюции жизни”*.

Классификация бактерий Орла-Йенсена на отдельные физиологические группы была первой попыткой осуществить филогенетическую классификацию бактерий. Орла-Йенсен, руководствуясь гипотезой первичности автотрофии, предположил: так как на первобытной Земле (4 млрд лет назад) не было органического вещества, то самые примитивные бактерии должны быть литоавтотрофными, т.е. экстремофильными организмами, использующими для питания неорганические субстраты в качестве доноров электронов и способными синтезировать все компоненты своей клетки из углекислоты или других неорганических соединений (в частности, это могли быть метанокисляющие бактерии).

белков. Они называются семантидами (от греч. “semaine” – печатать, “eidos” – подобие) и являются носителями генетической информации: ДНК – первичные семантиды, РНК – вторичные семантиды и белки – третичные семантиды. Считается, что эти консервативные макромолекулы (“молекулярные ансамбли”) могут быть использованы в качестве хронометров, в качестве объективной меры филогенетической дистанции между видами и таксонами более высокого ранга, т.е. эволюционная дистанция (расстояние) между организмами может оцениваться по гомологии семантид.

О возможности использования анализа последовательностей, т.е. первичной структуры клеточных макромолекул–носителей информации, для филогенетической классификации живых организмов впервые заявили в начале 60-х гг. американские биохимики Лайнус Полинг (Pauling L., 1901–1994, Нобелевская премия по химии, 1954 г.) и Эмиль Цукеркандл (Zuckerlandl E., 1922–2013). В своей известной работе “Молекулы как документы эволюционной истории” они выдвинули гипотезу “молекулярных часов”, согласно которой скорость накопления мутационных замен приблизительно постоянна и не зависит от темпов фенотипической эволюции [Zuckerlandl, Pauling, 1965].

Они полагали, что информационные макромолекулы (нуклеиновые кислоты и белки) несут следы эволюционной истории в своей первичной структуре и могут служить эволюционными хронометрами. Эволюционное расстояние между видами можно измерить путём определения различий в первичной последовательности нуклеотидов нуклеиновых кислот или аминокислот в белках в гомологичных молекулах, поскольку степень гетерогенности макромолекул пропорциональна числу стабильных мутационных изменений, фиксированных в ДНК двух организмов после их дивергенции от общего предка. Белки подобны часам (“эволюционные часы”). Изменение последовательности аминокислот в белке происходит почти с постоянной скоростью и отражает постоянную скорость эволюции ДНК. Такие независимые часы, погружённые в генотип, дают возможность судить об эволюционной истории и родстве организмов.

Таким образом, с одной стороны, в 70–80-е гг. были накоплены уже значительные данные о новых физиологических группах микроорганизмов и расширены сведения о ранее известных, а с другой – использованы (в результате успешного развития биохимии и молекулярной биологии) новые подходы и новые методы в систематике бактерий.

В середине 1970-х гг. появилась первая возможность создать естественную систему бактерий. Принципиально новым подходом, отличающимся от морфофизиологического (когда сходство между сопоставляемыми организмами оценивается по фенотипическим свойствам клетки, так называемым сигнатурам), явилась генетическая систематика бактерий – геносистематика бактерий.

Основы молекулярной систематики были заложены в конце 50-х гг. XX в. двумя независимыми группами исследователей – российскими под руководством известного биохимика Андрея Николаевича Белозерского (1905–1972) и зарубежными учёными К. Ионг Ли, К. Валь, Е. Барбю, обнаружившими корреляцию нуклеотидного состава ДНК с положением организмов в системе сначала у бактерий, а затем и у эукариотов. Учёные пришли к заключению, что у микроорганизмов (бактерий, водорослей, грибов, некоторых простейших) нуклеотидный состав ДНК действительно связан с видовой принадлежностью и сильно варьирует от вида к виду.

Наука о разнообразии генотипов организмов (геносистематика) в отличие от традиционной систематики (феносистематики) оценивает родство организмов исходя из сходства или различия их геномов. Геносистематика изучает физико-химические свойства ДНК с целью создания естественной (филогенетической) системы микроорганизмов (геносистематики изучают нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК, например генов, и на этой основе судят о родстве организмов).

Чаще всего её называют молекулярной систематикой, основанной на генетических методах, а именно на изучении сходства строения молекулы универсальных для всех сравниваемых объектов биополимеров (макромолекул, первичная структура которых несёт в себе наследственную информацию) – ДНК, РНК,

Позднее попытки создания первых филогенетических систем, построенных на использовании морфологических, а также комбинации морфологических и физиологических свойств, предпринимались в 1936 г. Альбертом Клейвером (Kluyver A., 1888–1956) и Корнелисом ван Нилем (van Niel C.B., 1897–1985), в 1941 г. – Роджером Стениером (Stanier R., 1916–1982) и К. Ван Нилем, в 1955 г. – К. Биссетом (Bisset K.A.). Эти исследователи придерживались противоположной точки зрения, свою позицию сформулировали так: “*Морфология главенствует над физиологией*”. Они разработали свою гипотетическую схему эволюции бактерий, где кокки рассматривались как первичный морфотип (являются самыми примитивными и древними бактериями, ибо имеют наиболее простую морфологическую форму); из вытянутых кокков развились палочковидные бактерии; извитых бактерий – вибрионы (тело не превышает ¼ оборота спирали, грамотрицательные, жгутиковые), вибрионов – спироиллы и т.д.

Такая классификация включала последовательность из 5 групп: (1) кокки; (2) фотосинтезирующие бактерии, занимающие промежуточное положение между кокками и группой 3; (3) формы с полярными жгутиками; (4) неподвижные грамположительные палочки; (5) палочки с перитрихальным жгутикованием. По замыслу авторов, эта последовательность символизировала собой 5 линий развития от “примитивных кокков”. Согласно этой схеме, “вершиной” их эволюции были миксобактерии (аэробные скользкие бактерии, образующие плодовые тела), возникшие от цианобактерий путём утраты хлорофилла, или бесцветные нефотосинтезирующие нитчатые серные бактерии (окисляющие сероводород) *Beggiatoa*.

Классификация К. Биссета (Bisset K.A.) была построена в соответствии с характером жгутикования и типом метаболизма. Согласно схеме Биссета, все анаэробные формы с полярным жгутиком – это наиболее древние и примитивные, основным представителем которых Биссет считал грамположительные палочки с облигатным анаэробным метаболизмом, – клостридии (*Clostridium*). Далее в процессе эволюции происходила замена полярного жгутика на перитрихальное (по всей поверхности)

жгутикование и анаэробного энергетического обмена на аэробный. Основной представитель этой группы – спорообразующие бациллы (*Bacillus*).

Следует отметить, что последующее углублённое изучение процесса спорообразования, нуклеотидных последовательностей рРНК подтверждает мнение о том, что именно клостридиальные грамположительные формы филогенетически более древние. Фенотипическое сходство чаще всего (хотя и не всегда) определяется близким происхождением.

Несмотря на то, что все эти узкоспециальные классификационные схемы и системы идентификации видов были чисто умозрительными, они в своё время обеспечили логический каркас, на котором можно было расположить известные бактерии.

Первые системы бактерий были крайне субъективны. В основу их создания была положена традиция выделения и идентификации таксона по одиночным или серии одиночных субъективно выбранных признаков – особенностей морфологии. При этом все исследованные признаки мысленно распределяли по степени их важности, результатом чего являлось субъективное (т.е. основанное только на опыте и интуиции исследователя) создание иерархической системы признаков. В зависимости от “веса” признаков объекты разбивали на таксономические группы. Другими словами, в зависимости от степени важности признака микроорганизмы разделяли на таксономические группы. Такие таксономические построения на основе иерархического принципа в расположении таксонов имели низкую информативность (так как основывались на одиночных признаках), приводящую к тому, что близкородственные организмы попадали в различные таксономические группы, а далеко отстоящие друг от друга сводились в одну. Примером многократного описания может служить вид *Pseudomonas stutzeri*, который в первой половине XX в. появлялся в периодической научной литературе одновременно, по меньшей мере, под семью разными названиями.

Нумерическая таксономия (фенетика)

С увеличением числа методов, используемых в описании бактерий, систематики затруднялись выбрать наиболее объективный метод для разграничения таксонов, в том числе и видов.

признаётся несостоятельность иерархического принципа в расположении таксонов.

1975 г. – издан Международный кодекс номенклатуры бактерий (International Code of Nomenclature of Bacteria, ICNB). На русском языке вышел в 1978 г.

1977 г. – описано новое царство живых существ “Архебактерии” (“Археи”) учёными отдела микробиологии и отдела генетики и развития Иллинойского университета (Чикаго, США), возглавляемого специалистом по генетике микроорганизмов, профессором микробиологии Карлом Ричардом Вёзе (Woese K.R., 1928–2012). Благодаря использованию молекулярно-биологических методов исследования, а точнее сравнению наборов олигонуклеотидов, полученных из 16S рРНК прокариотных и 18S рРНК эукариотных организмов, они пришли к неожиданным результатам. На основании секвенс-анализа рРНК были выявлены не две группы организмов, различающихся прокариотным и эукариотным типом организации, а три группы, имеющие различное эволюционное происхождение.

1980 г. – опубликованы Одобрённые списки наименований бактерий (Перечень узаконенных научных названий бактерий), Список признанных названий бактерий (Approved List of Bacterial Names). После их публикации экспертами-микробиологами-таксономистами было решено перенести дату рождения номенклатуры бактерий с 1 мая 1753 г. – даты появления работы Карла Линнея “Species plantarum”, положившей начало системе номенклатуры, Международному кодексу ботанической номенклатуры, регламентирующему образование и применение научных названий растений, на 1 января 1980 г. – дату рождения номенклатуры бактерий, новый рубеж в развитии систематики бактерий.

1986 г. – Международный комитет по систематике бактерий (International Committee on Systematics Bacteriology, ICSB) принимает важное решение, публикует заключение и рекомендации по согласованию подходов к бактериальной систематике. Основное положение звучит так: “*Филогения должна определять таксономию, а номенклатура должна быть согласована с геномной информацией*”.

В результате таких нумерических (численных) анализов фенотипических признаков были получены классификации лучшего качества с точки зрения объективности и стабильности. При использовании этого метода во второй половине XX в. были построены дендрограммы родства по фенетическим признакам для представителей многих таксономических групп. С помощью методов нумерической таксономии была усовершенствована таксономия многих родов бактерий, принятая до 1960 г., в том числе родов *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Vibrio*; были составлены базы данных, представляющие ценность как богатые источники информации по фенотипическим признакам таксонов и полезные для специалистов разных профилей.

Период развития нумерической таксономии совпал с появлением хемотаксономии и внедрением большого числа аналитических биохимических тестов, преимущественно методов хроматографии и электрофореза. Данные методы позволили изучать такие специфические химические компоненты клетки, как аминокислоты, белки, сахара и липиды. Они представлены в лекции 10.

Лекция 5. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СИСТЕМАТИКА НА БАЗЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Стремительное развитие систематики бактерий приходится на 70-е гг. В это время постепенно накапливаются знания о свойствах ДНК, интенсивно развиваются методы молекулярной биологии, что способствует упрочению гипотезы о классификации бактерий путём сравнения их геномов.

В систематике начинают широко использоваться молекулярно-генетические подходы и возникают предпосылки для создания филогенетической (естественной) классификации бактерий. На фоне успешного развития молекулярной биологии систематика становится одной из бурно развивающихся отраслей биологии. Наступает “золотой век” микробной таксономии. Это хорошо иллюстрируется следующей хронологией:

1974 г. – издан Определитель бактерий Берджи (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, в 1977 г. – краткий вариант восьмого издания, русский перевод в 1980 г.), в котором впервые

Это привело к поиску иного подхода для определения степени сходства между бактериями. Со второй половины 1950-х гг. параллельно с развитием компьютерных технологий и появлением возможности использования анализа множества переменных в систематику бактерий проник “нумерический” метод. Появилась числовая таксономия (нумерическая систематика), т.е. использование математических методов для классификации организмов на основе сходства их друг с другом.

Стимулом для разработки цифровой таксономии в бактериологии стали трудности в управлении большими таблицами сведений о морфологических, физиологических и других свойствах многочисленных штаммов. Появилась необходимость в объективном методе таксономического анализа, цель которого – распределение отдельных штаммов по однородным группам, видам, оформление видов в рода и высшие группирования.

Впервые для бактерий нумерическая таксономия применена была Питером Снитом (Sneath P.H.A., 1923–2011). В 1957 г. он предложил для анализа большого количества признаков использовать метод нумерической таксономии Адансона. При этом были использованы принципы, предложенные французским ботаником Мишелем Адансоном (Adanson M., 1727–1806) для классификации объектов.

Во второй половине XVIII в. (1763 г.) Адансон впервые высказал мысль о возможности классифицировать животных и растений по совершенно иному признаку. Идея заключалась в том, что все признаки считаются равноценными, при описании исследуемого объекта используется максимальное количество (не менее 50) признаков, мера сходства устанавливается на основании количества совпадающих признаков и выражается в виде коэффициента сходства. Главная идея: все признаки считаются равноценными, и мера их родства определяется числом их совпадений. Коэффициент сходства для двух сравниваемых штаммов получают путём определения отношения числа одинаковых признаков к общему числу изученных признаков. Значение коэффициента сходства меняется в диапазоне от 1 (полная идентичность) до 0 (несовпадение ни по одному изученному признаку).

Классификация, построенная на принципах М. Адансона, – трудоёмкий процесс, своё развитие и практическое применение

она получила в связи с успехами в области вычислительной техники. Её преимущества заключаются в формальном устранении элемента субъективности, поскольку все признаки объекта принимаются равноценными. Её слабые стороны: для оценки сходства бактерий обычно используют порядка 100 (самое большее 200) признаков, что составляет приблизительно лишь 10% от количества признаков, определяющих бактериальный фенотип. Следовательно, учитывается только незначительная часть признаков классифицируемого объекта. Нумерическая таксономия может быть полезна при оценке степени сходства между таксонами низкого ранга (виды, роды), но прямого отношения к созданию филогенетической системы прокариотов не имеет.

Итак, Адансон предложил все признаки организмов считать равноценными. Мера их родства определяется числом их совпадений. Дело в том, что используемые для классификации организмов признаки неравноценны по характеру содержащейся в них информации. Например, форма клетки, которая рассматривается как единичный признак, значительно различается (по затраченному на её организацию генофонда клетки) от такого признака, как наличие определённого фермента, например, каталазы. Поэтому при классификации с использованием традиционных методов первостепенное значение имеют диагностические признаки, т.е. признаки, отличающие таксон от таксона.

При нумерическом анализе признаки, существенные для классификации всех организмов в целом или существенные для определённой группы организмов (например, характеризующие их метаболизм), и признаки, несущие незначительную информацию (например, форма колоний), вносят равный вклад в классификацию. При этом организмы должны группироваться на основе максимального количества совпадающих признаков.

При изучении большого числа штаммов, как это бывает необходимо в крупномасштабных микробиологических исследованиях, нумерическая таксономия очень трудоёмка. Поэтому идея Адансона не только в XVIII, но и в XIX, и в первой половине XX в. не нашла широкой поддержки. Лишь с появлением ЭВМ, в 1957 г. числовая систематика была предложена для использования в микробиологии.

Для сравнения, например, 2 штаммов А и В пользуются коэффициентом сходства (величиной S). Он определяется уравнением $S = a+d/a+b+c+d$, где a и d – суммы признаков, по которым штаммы А и В совпадают: a – количество положительных совпадающих результатов (оба положительные); d – количество отрицательных совпадающих результатов (оба отрицательные); b – сумма признаков, по которым штамм А положителен, а штамм В отрицателен; c – сумма признаков, по которым штамм А отрицателен, а штамм В положителен. Таким образом, коэффициент сходства S – это отношение числа одинаковых признаков к общему числу изученных признаков.

В результате расчётов получаются величины от 0 до 1. Коэффициент сходства S , равный единице, означает 100 %-ное сходство сравниваемых организмов, т.е. идентичность, а S меньше 0,02 – абсолютное несходство. Полученные величины вносятся в матрицу сходства и могут быть представлены в виде дендрограммы степени сходства (подобной филогенетическому дереву), на которой штаммы по степени их сходства объединены в кластеры.

Считается, что нумерическая систематика не внесла чего-то нового в систематику бактерий, что позволило бы поставить её достоинства выше традиционных систематик. Конечно, если сравнивать нумерическую систематику с генетической, основанной на изучении нуклеотидного состава, то приходится признать, что детальное биохимическое изучение состава клеток, таких информационных макромолекул, как ДНК, РНК, белки, формирует новый фундамент для систематики бактерий, чего нельзя сказать о цифровой систематике. Однако в отсутствие надёжной филогенетической системы организмов, когда невозможно чётко определить границы отдельных таксонов и “вес” таксономических признаков, числовая таксономия позволяет выявлять сходство организмов и группировать их на основании анализа большого количества фенотипических признаков, а фенотипическое сходство чаще всего (хотя и не всегда) определяется близким происхождением.

Внедрение компьютерных технологий позволило сравнивать большие наборы характеристик для большого количества штаммов, формирующих базу для фенетической таксономии.

Такие свежие примеры множатся. С учётом появляющихся новых данных можно сделать вывод о том, что секвенирование гена 16S рРНК/18S не может являться единственным методом идентификации микроорганизмов до видов. Филогенетическое дерево прокариотов, построенное по единственному гену, относящемуся к внутренней сфере организма, не даёт представления о его функции в природных экосистемах.

В отличие от этого, исследования с использованием методов ДНК-ДНК гибридизации, молекулярного фингерпринтинга в сочетании с фенотипическими характеристиками изолятов обеспечивают возможность дифференцирования их на видовом и подвидовом (infraspecies, выявление малозаметных различий между штаммами одного вида) уровнях.

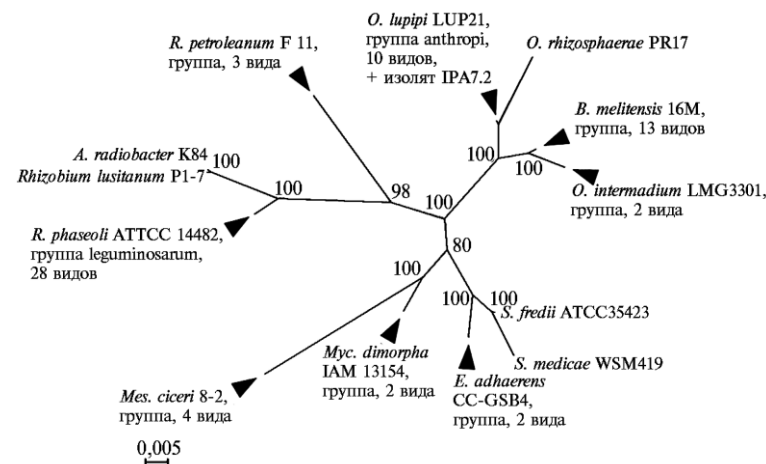


Рис. 7. Филограмма штаммов, иллюстрирующая неоднозначность видовой идентификации бактериальных изолятов по последовательностям гена 16S рРНК на примере бактерий рода *Ochrobactrum* [по Бурыгину и др., 2017]

Как альтернатива анализу последовательностей генов 16S рРНК сегодня ведётся интенсивный поиск многих других макромолекул на их потенциальное применение в качестве молекуляр-

филогенетические взаимоотношения организмов и в этом смысле являющиеся естественными. Вместе с тем все попытки конструирования сколько-нибудь детализованной эволюционной схемы прокариотов, исходя из которой можно было бы приблизиться к созданию их естественной системы, в рамках традиционной фенотипической систематики оставались безуспешными, в результате чего даже была поставлена под сомнение сама такая возможность. Это заставляло микробиологов стремиться воспользоваться теми принципиально новыми возможностями решения таксономических проблем, которые предоставляла молекулярная систематика. С другой стороны, менее сложная по сравнению с эукариотами организация генома прокариотов позволяла использовать их в качестве преимущественных объектов геносистематики.

Применение молекулярно-биологических методов помогло решить многие спорные вопросы систематики конкретных групп микроорганизмов. С расширением круга используемых методов оценки сходства генетического материала организмов и накоплением экспериментальных данных, касающихся различных таксономических групп бактерий, вклад молекулярной филогенетики в решение общих кардинальных проблем эволюции и систематики прокариотов начал быстро возрастать.

Генотипические методы бактериальной классификации

Методы генетической дифференциации микроорганизмов заключаются в исследовании свойств нуклеиновых кислот. Их преимуществами являются независимость от возраста и условий культивирования микроорганизмов, а также возможность изучения некультивируемых микроорганизмов.

Данные методы (генетические критерии) включают определение относительного молярного содержания Г+Ц пар в ДНК, гибридизацию нуклеиновых кислот, изучение переноса генов, генетических скрещиваний, картирование, рестрикционный анализ ДНК, применение генетических зондов (ДНК зондов), определение нуклеотидных последовательностей в ДНК и РНК (секвенирование).

Нуклеотидный состав ДНК

Первоначально для сравнения бактериальных геномов использовался только общий состав оснований ДНК – критерий, который не несёт информации относительно её первичной структуры. При этом исходили из того, что каждый вид бактерий имеет ДНК с характерным содержанием ГЦ-пар и эту величину можно рассматривать как один из важных критериев вида.

К началу 1950-х гг. в лаборатории Эрвина Чаргаффа (Chargaff E., 1905–2002) была установлена видовая специфичность состава ДНК и выявлены определённые закономерности нуклеотидных отношений, названные “правилами Чаргаффа”. Оказалось, что соотношения четырёх сортов мономеров ДНК – гуанилового (Г), аденилового (А), цитидилового (С) и тимидилового (Т) – различаются у разных видов организмов. При этом независимо от видовых различий во всех ДНК аденин присутствует в том же количестве, что и тимин, а гуанин – в том же количестве, что и цитозин: А=Т, Г=Ц. Сумма пуриновых (А+Г) оснований равна сумме пиримидиновых (Т=Ц).

Генотипическая характеристика в бактериальной таксономии включает анализ молярного содержания гуанина и цитозина в процентах от общего содержания оснований в ДНК, мол. %: $(Г+Ц)/(А+Т+Г+Ц) \times 100$, где Г+Ц – суммарное количество гуанинов и цитозинов; А+Г+Т+Ц – суммарное количество аденинов, тиминов, гуанинов и цитозинов. Другими словами, количественный показатель соотношения нуклеотидов ДНК бактериального генома имеет таксономическое значение.

Обычно диапазон содержания Г+Ц пар, наблюдаемый среди штаммов одного вида, не должен превышать 3–5 мол. %, а среди видов одного рода – не более 10 мол. %. Исключением являются представители класса *Actinobacteria*, характеризующиеся высоким содержанием ГЦ пар в ДНК – более 50 мол. %, пороговое значение Г+Ц пар для этой группы бактерий составляет лишь 2 мол. %.

У бактерий молярное содержание Г+Ц пар колеблется от 24 до 76 мол. %. Это значение постоянно у одного организма. Каждый вид бактерий имеет ДНК с характерным средним содер-

дереве или демонстрирует 97 % сходства последовательности генов 16S рРНК со своим ближайшим соседом. Недавние исследования свидетельствуют о том, что сравнение последовательности гена 16S рРНК в сочетании с биохимической характеристикой не обеспечивает решающего доказательства для идентификации на уровне вида (разделения близкородственных видов) и может оказаться весьма обманчивым.

Так, потенциальные подводные камни чрезмерного доверия единственному филогенетическому маркеру проиллюстрированы в таксономических исследованиях видов группы *Streptococcus bovis*. *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* был реклассифицирован в новый вид *Streptococcus lutetiensis*, а другая группа стрептококков предложена в качестве нового вида *Streptococcus pasteurianus* [Poyart et al., 2002]. В последующем было показано, что ни *S. lutetiensis*, ни *S. pasteurianus* не являлись новыми видами [Schlegel et al., 2003]. Известны примеры, когда виды с идентичными или практически идентичными последовательностями гена 16S рРНК обладали низким сходством между последовательностями ДНК.

Неоднозначность видовой идентификации бактериальных изолятов по последовательностям гена 16S рРНК вследствие их высокой консервативности продемонстрирована недавно на примере бактерий рода *Ochrobactrum* [Бурыгин и др., 2017; Щёголев, Бурыгин, 2018]. Исследованный изолят оказался в таксономической группе со штаммами с идентичностью гена 16S рРНК, существенно превосходящей традиционный “золотой стандарт” 97%. Данные “родственники” были выделены из резко контрастных экологических ниш: корней бобовых растений, ризосферы пшеницы, биологических жидкостей человека и т.д. Как видно из рис. 7, в дополнение к 13 “корневым” штаммам на данной филограмме в состав 8 таких групп (треугольники) вошли от 2 до 28 разных видов, общим числом 64. Данную филограмму можно рассматривать как вариант “сечения” древа жизни с переплетающимися ветвями, где треугольниками обозначены места “сгущения” поперечных связей. На данном примере продемонстрирована условность оценки систематического положения изолятов при отсутствии единой генетической системы их видовой идентификации.

например, молекул 5S рРНК (120 нуклеотидов, слишком мала). 23S рРНК имеет 3300 нуклеотидов и труднее анализируется.

Таким образом, рРНК отвечает практически всем требованиям, которые можно предъявить всеобщему филогенетическому маркеру. Сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов гена 16S рРНК, дополненный фенотипическими признаками, стал инструментом новой систематики бактерий.

Этот метод нередко рассматривается многими бактериологами-таксономистами как абсолютный метод идентификации положения организма на филогенетическом древе. Для проведения исследований доступны промышленные системы идентификации на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК (MicroSeq 500 и набор для секвенирования генов 16S рРНК у бактерий; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). Источниками базы данных последовательностей рРНК являются Ribosomal Database Project, GenBank и European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

При описании новых таксонов необходимо определять не менее 1300–1400 нуклеотидов в гене 16S рРНК с менее чем 4 % двусмысленных позиций и менее чем 10 пропущенными нуклеотидами. Как правило, если штамм имеет менее чем 97 % сходства по гену 16S рРНК с ближайшим филогенетическим соседом, то уровень ДНК-ДНК гибридизации между штаммами не будет превышать 70 %. В ряде случаев штаммы разных видов одного рода с уровнем ДНК сходства при гибридизации ниже 70 % имели полностью идентичные гены 16S рРНК. Такая закономерность наблюдается обычно среди штаммов, изолированных из схожих экологических ниш.

Тем не менее исследования последних лет всё чаще свидетельствуют об ошибочности поспешного вывода, что секвенирование генов 16S рРНК представляет собой “золотой стандарт” для идентификации новых изолятов. В отсутствие дополнительных фено- и генотипических сведений преждевременно делать вывод о том, что неидентифицированный изолят принадлежит к определённому виду на основании того, что он имеет высокий уровень сходства последовательности генов 16S рРНК с определённым видом либо что он представляет новый (неизвестный) вид, так как занимает уникальную позицию на филогенетическом

жанием Г+Ц пар. В процессе накопления фактического материала было установлено, что процентное содержание оснований в ДНК (Г+Ц или А+Т) хотя и важный, но недостаточный признак, который мог бы чётко указывать степень родства сравниваемых организмов.

Поскольку генетическое кодирование основано не только на содержании нуклеотидных оснований в единицах кодирования (триплетах), но и взаимном расположении, то одинаковое среднее содержание Г+Ц пар в ДНК двух видов бактерий может сопровождаться их значительным генотипическим разделением. Если два организма очень близки по нуклеотидному составу, то это может являться свидетельством их эволюционного родства только при условии, что они обладают большим числом общих фенотипических признаков или генетическим сходством, подтверждённым другими методами. В то же время расхождение (более 10–15 мол. %) в нуклеотидном составе ДНК двух штаммов бактерий с общими фенотипическими свойствами показывает, что они относятся, по крайней мере, к разным видам.

ДНК-ДНК гибридизация

“Золотым стандартом” при определении видовой принадлежности штаммов бактерий и архей остаётся уровень ДНК-ДНК гибридизации, который свидетельствует о степени реассоциации одноцепочечных молекул ДНК различного происхождения, выраженной в процентах сходства. Проведение ДНК-ДНК гибридизации необходимо, если штаммы имеют более чем 97 % сходства по последовательности гена 16S рРНК. Внутри одного вида бактерий уровень гомологии ДНК штаммов достигает 70–100 %. Данные, накопленные в течение многих лет, показали высокую корреляцию между группировками штаммов по данным ДНК-ДНК гибридизации и их фенотипическими характеристиками.

Значение гомологии по данному методу ниже 70 % означает, что исследуемые бактерии принадлежат к разным видам. Считается, что уровень ДНК-ДНК гибридизации около 70 % и выше характеризует организмы внутри одного вида, 10–60 % – одного рода, менее 10 % – разных родов [Tidall et al., 20106]. Данные значения могут варьировать в зависимости от сравниваемых геномных групп.

В настоящее время предложен новый способ расчёта уровня сходства ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (digital DNA-DNA Hybridization, dDDH) по полным геномным последовательностям. Данный метод реализован в виде веб-сервиса Genome-To-Genome Distance Calculator (GGDC) на сайте Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных линий (DSMZ). Полученные значения хорошо согласуются с экспериментальными данными и могут быть использованы при описании новых таксонов.

Молекулярный фингерпринтинг

Сегодня разработано огромное количество диагностических методов на основе молекулярного фингерпринтинга и использования ПЦР. Один из таких методов – анализ полиморфизма длины амплифицированных рестрикционных фрагментов геномной ДНК (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) – пригоден для классификации штаммов на уровне вида и рода.

Основной принцип метода AFLP – анализ полиморфизма длины фрагментов рестрикции, модифицированный с использованием амплификации посредством ПЦР с целью отбора определённых ДНК-фрагментов из всего пула рестрикционных фрагментов. Анализ AFLP проводит скрининг посредством селективной амплификации рестрикционных фрагментов. Рестрикция осуществляется с помощью двух ферментов рестрикции, продуцирующих ДНК-фрагменты с двумя разными типами “липких” концов, которые комбинируются беспорядочно. К этим концам “пришиваются” короткие олигонуклеотиды (адаптеры) для получения матриц, используемых в ПЦР. Реакция селективной амплификации осуществляется с помощью двух разных праймеров, которые содержат ту же последовательность, что и адаптеры, но чьи последовательности расширены так, чтобы включать одно и более селективных оснований, граничащих с участком рестрикции праймера. Амплифицируют лишь те фрагменты, которые полностью совпадают с последовательностью праймера. В результате амплификации получают комплект из 30–40 фрагментов ДНК, некоторые из них специфичны для вида (или даже рода), тогда как другие – для штамма.

Для характеристики штаммов бактерий широко используются также методы генотипирования на основе ПЦР, в которых

Действительно, дальнейшее углублённое изучение биохимии, физиологии, экологии, молекулярной биологии архей подтвердило существование новой формы жизни и убедительно очертило контуры нового домена.

Преимуществом использования методов молекулярной биологии для реконструкции филогенеза является то, что получаемая с их помощью информация легче поддаётся количественной оценке, и эта информация позволяет сравнивать организмы, резко отличающиеся друг от друга.

Аргументы за использование рибосомных РНК при решении проблем эволюционной систематики бактерий сводятся к следующему: рибосомы – консервативный элемент клетки на протяжении эволюции, очень древнего происхождения, рибосомные РНК распространены у всех клеточных форм жизни, генетически стабильны, они функционально постоянны [Stackebrandt, Woese, 1981]. По Штакебранду и Вёзе, основной довод в пользу выбора именно рибосомных РНК на роль всеобщего филогенетического маркера состоит в следующем: *“Возникновение рибосом одновременно с клеткой и их безальтернативная роль в биосинтезе белка, следствием чего является их универсальность”*.

1. Первичная структура гена 16S рРНК достаточно выражена и изменяется слабо, слабее, чем большинство белков со временем в ходе биологической эволюции, т.е. в целом она характеризуется ультраконсервативностью.

2. Молекула 16S рРНК имеет как экстремально консервативные, так и относительно более переменные участки (длиной 20–30 пар оснований) в полинуклеотидной цепи рРНК, что даёт возможность на основании анализа этих областей устанавливать как далёкие (архаические), так и близкие родственные отношения (позже сложившиеся эволюционные связи) между организмами.

3. Установлено, что цистроны рРНК не вовлекаются в процессы межвидового генетического переноса.

4. Наконец, это достаточно крупные молекулы, в которых содержится значительная генетическая информация (1540 нуклеотидов), что делает их анализ статистически достоверным и даёт результаты более определённые, чем анализ меньших молекул,

странными стилями существования в жёстких условиях, на основании определения последовательности 16S рРНК оказались в одной категории.

В 1977 г. Вёзе и Фоксом была опубликована статья “Фило-генетическая структура прокариотического домена: первичные царства”, в которой сделано основанное на результатах секвенирования гена рРНК важное научное заявление о том, что все организмы представлены тремя доменами: 1) истинными бактериями или эубактериями, теперь их называют просто бактериями; 2) археями, которые они вначале называют архебактериями; 3) эукариями, включающими растения, животных, грибы и многие другие непрокариотные формы [Woese, Fox, 1977a]. Авторы статьи понимали, что открытие архей коренным образом изменяет биологию, вызывает необходимость перестройки филогенетического древа жизни.

Открытие архей явилось принципиальным поворотом, научной революцией в естествознании XX в. Однако это открытие многими учёными, традиционно принимавшими живой мир как дуалистический, было встречено игнорированием или молчанием. Только через 10 лет верх взяла новая парадигма в биологии. Формированию её способствовал труд Томаса Куна (Kuhn T.S.) “Структура научных революций” (англ. “The Structure of Scientific Revolutions”), переведённый в 2009 г. на русский язык [Кун, 2009]. Монография на английском языке была издана в издательстве University of Chicago Press ещё в 1962 г.

В 1970 г. Кун добавил послесловие к книге, в котором отмечалось, что важные изменения в науке происходят в результате революций. Кун вводит в научный обиход такие понятия, как “парадигмы” и “смена парадигм”, рассматривает ситуации, когда научная теория становится парадигмой. По мнению Куна, “*нормальная наука* (англ. normal science), *опирающаяся на одно или несколько прошлых научных достижений – достижений, которые в течение некоторого времени признаются научным сообществом как основа для его дальнейшей практической деятельности, часто подавляет новшества, отсюда прогресс происходит в результате борьбы конкурирующих научных теорий*”.

в качестве праймеров рассматриваются случайные или повторяющиеся элементы. В некоторых из этих исследований были получены видоспецифичные фрагменты ДНК или структуры, например, для видов, принадлежащих родам *Campylobacter*, *Carpocytophaga*, *Enterococcus*. Эти специфичные фрагменты ДНК могут быть пригодны в качестве зондов для экспресс-скрининга и идентификации других изолятов.

Наиболее перспективным и надёжным методом оценки генетического сходства организмов оказался метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот ДНК-ДНК или ДНК-рРНК (тотальных геномов), основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей ДНК. Этот тонкий метод последовательной гибридизации ДНК позволяет перейти от установления степени сходства к выводам о степени родства между организмами.

Экспериментально было подтверждено, что гибридизация между денатурированными ДНК двух штаммов происходит только тогда, когда состав азотистых оснований ДНК у них сходен и если организмы, из которых экстрагированы ДНК, генетически родственны. Когда накопилось достаточно информации относительно ДНК-ДНК гибридизации у бактерий, то оказалось, что многие группы, объединённые ранее по фенотипическим признакам (сигнатурам), были гомогенными в опытах и по ДНК-гибридизации.

Генотипический метод ДНК-ДНК гибридизации заключается в том, что двойная спираль ДНК денатурируется нагреванием и её разошедшиеся в результате разрыва водородных связей цепи фиксируются. Такая денатурация (“плавление”), приводящая к образованию одиночных цепей, обратима. Так, при понижении температуры становится возможной ренатурация (спаривание и реассоциация) цепей, причём соединиться с одноцепочечной ДНК может лишь комплементарная ей цепочка. Количество ренатурированной (реассоциированной) двуспиральной ДНК служит прямой мерой сходства сравниваемых организмов.

Последовательности, образующие двухцепочечные комплексы, необязательно комплементарны по всем нуклеотидам. Долю некомплементарных пар нуклеотидов можно определить по скорости разделения цепей ДНК в дуплексах (гибридах) при повышении температуры. Для этого определяется значение $T_{пл}$

(точки плавления), т.е. значение температуры, при которой диссоциирует (распадается) 50 % двухцепочечной ДНК. $\Delta T_{пл}$, равная 1 °C, соответствует примерно 1 % некомплементарных пар нуклеотидов ($T_{пл}$ – температура плавления гибрида, установленная посредством поэтапной денатурации; $\Delta T_{пл}$ – разность $T_{пл}$ (в градусах Цельсия) между гомологичным гибридом и гетерологичным гибридом, образуемым в стандартных условиях).

Иными словами, гибридизационный анализ свидетельствует о степени, в которой одноцепочечные молекулы ДНК различного происхождения могут реассоциироваться в двойную цепь. Несмотря на споры о технической сложности и невозможности создания совокупных баз данных, сегодня метод ДНК-ДНК гибридизации считается эталонным методом установления взаимосвязей между видами и внутри них, “краеугольным камнем очерчивания границ видов” [Vandamme, 2011].

Таким образом, метод ДНК-ДНК гибридизации даёт возможность определять степень гомологии последовательностей ДНК разного происхождения, например, двух различных организмов, близких по виду. По рекомендациям Международного комитета по систематике бактерий (International Committee on Systematics Bacteriology, ICSB), “в настоящее время геномвиды могут быть дифференцированы друг от друга только при условии, что они включают штаммы примерно с 70 %-ным гибридным сходством ДНК-ДНК и точкой плавления гибридов не менее 5 °C ($\leq 5\text{ °C } \Delta T_m$)” [Wayne et al., 1987]. Эксперты считают, что организмы с гомологией ДНК ниже 70 % принадлежат к разным видам, а гомологию ниже 50 % вообще не следует принимать во внимание. Однако вид не может быть признан на основе одной-единственной характеристики. Отсюда группам штаммов, которые очерчены посредством значений ДНК-ДНК гибридизации как отдельные виды, но которые невозможно различить по фенотипическим характеристикам, нельзя присваивать название.

Аналогичная реассоциация может быть осуществлена между молекулами ДНК и рибосомных РНК, поскольку двойные спирали образуются также между одноцепочечной ДНК и комплементарными нитями РНК. Считается, что эксперименты по гомологии ДНК/РНК могут быть использованы при определе-

сти (5 %), приобретённые в ходе дивергенции глобальных доменов (эти последовательности используются для конструирования трёх типов домен-специфических праймеров – соответственно для доменов *Bacteria*, *Archaea* и *Eucarya*); (3) “групповые” последовательности (85%), приобретённые филами в ходе внутридоменной дивергенции (используются для конструирования группоспецифических праймеров, с помощью которых можно амплифицировать ген рРНК и определить его последовательность для представителя конкретной филы, конкретного кластера родов или конкретного рода).

Преимущество этого метода в том, что по мере накопления каталогизированных последовательностей рРНК различных организмов расширяется база данных, которой можно пользоваться для сравнения последовательностей других бактерий, а не обращаться к сравнению с типовыми штаммами или эталонными штаммами, поддержание коллекций которых громоздко и трудоёмко. В литературе этот метод известен под названием “каталогизация 16S рРНК”.

Полученные К. Вёзе и Джорджем Фоксом (Fox G.E.) данные показали, что нумерические значения S_{AB} подразделяются на три чёткие категории [Woese, Fox, 1977a]. Эукарии – дрожжи, зелёные растения и мыши – имели высокий коэффициент сходства ($\sim 0,3$) и гораздо более низкий со всеми другими организмами, представляющими прокариоты. Блок, состоящий из *E. coli*, *Chlorobium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Aphanocapsa*, указывал на высокую взаимную близость среди *Eubacteria*. В этом блоке оказался и хлоропласт, который, как и митохондрии, вероятно, возник в результате эндосимбиоза микроорганизма с хозяйской эукариотной клеткой с последующей эволюцией во взаимозависимом состоянии. И наконец, блок, содержащий метаногены, указывал на высокое взаимное родство кластера и низкое родство с двумя другими блоками. Этот кластер включал в себя археи. Было очевидно, что *Archaea* составляют особую категорию организмов. Вскоре в домен археи были включены некоторые галофильные (например, *Halobacterium*) и термофильные (*Sulfolobus*, *Thermoplasma*) организмы. Таким образом, организмы, которые не считали родственными и объединяли только в связи с их

Метод разделения олигонуклеотидов двухмерным электрофорезом даёт возможность сравнивать полученные в разное время данные по характеристике последовательностей рРНК для различных организмов с помощью олигонуклеотидной каталогизации.

Для каждого организма составляют каталог или перечень нуклеотидных последовательностей. Эта информация хранится в международной базе данных нуклеотидных последовательностей (International Nucleotide Sequence Database Collaboration, INSDC, <http://insdc.org/>), осуществляющей обмен данными между тремя самыми крупными в мире архивами аннотированных нуклеотидных последовательностей (GenBank, EMBL и DDBJ).

Сравнение перечней двух организмов позволяет судить о степени их родства. Эти отношения выражают количественно, посредством коэффициента ассоциации S_{AB} (коэффициента родства) нуклеотидных последовательностей, который вычисляют для каждой пары сравниваемых организмов А и В по формуле $S_{AB} = 2N_{AB} / N_A + N_B$, где S_{AB} (коэффициент ассоциации) – частное от деления удвоенной суммы общих нуклеотидов $2N_{AB}$ в олигомерах организмов А и В и общего количества всех нуклеотидов $N_A + N_B$, различающихся в обоих перечнях.

С помощью компьютерного анализа перечней, характеризующих организмы, составляют дендрограммы, отражающие степень родства в группе анализируемых организмов. Значение коэффициента родства S_{AB} варьирует в границах от 1 – полная гомология нуклеотидных последовательностей до 0,1 – минимальная гомология, наблюдаемая у организмов, далеко разошедшихся в процессе эволюции. Значения коэффициента сходства нуклеотидных последовательностей тем меньше, чем сильнее объекты сравнения дивергировали друг с другом.

Отдельные участки рРНК различаются по филогенетическому “удельному весу”, т.е. среди них имеются высококонсервативные и относительно вариабельные. Обычно выделяют три типа таких участков: (1) “фундаментальные” последовательности (10 %), унаследованные всеми клеточными организмами от общего предка (прогенота); (2) “универсальные” последовательно-

нии взаимоотношений у организмов с отдалённым родством, тогда как опыты по гомологии ДНК/ДНК наиболее успешны для определения сходства двух близкородственных организмов.

С помощью метода ДНК-ДНК гибридизации было уточнено систематическое положение многих групп бактерий. Иными словами, в своё время был совершён знаменательный прорыв в установлении взаимосвязей между отдалённо- и близкородственными бактериями посредством ДНК-ДНК гибридизации.

Однако по мере широкого распространения этого метода микробиологов стало беспокоить частое несовпадение выводов, сделанных на основании фенотипических признаков и ДНК гибридизации. Метод ДНК-ДНК гибридизации имеет ряд ограничений: (1) пороговые значения не распространяются на все роды прокариотов; (2) определение ДНК-ДНК гибридизации требует специальных средств и поэтому доступен не для каждой лаборатории; (3) это трудоёмкий и затратный способ, имеющий недостаточно высокую воспроизводимость; (4) отсутствует возможность постоянного создания сравнительной справочной базы данных [Tindall et al., 2010a].

В связи с этим необходим был поиск новых, более объективных и надёжных генетических методов. Хотя в целом значение данных о строении ДНК для систематики прокариотов просто огромно, ибо они позволяют перейти от установления степени сходства к выводам о степени родства между организмами.

Разновидностью метода молекулярной гибридизации ДНК-ДНК является метод ДНК-зондов (генных зондов). В этом случае реакция гибридизации ведётся не между двумя препаратами тотальной ДНК, а между фрагментом нуклеотидной последовательности ДНК (зондом), включающим наиболее специфичный и наиболее консервативный для данного вида бактерий ген (генетический маркер), ответственный за определённую функцию (например, устойчивость к антибиотикам), и ДНК исследуемой бактерии.

Самый распространённый способ создания генных зондов – выделение специфических фрагментов путём молекулярного клонирования. Для этого вначале создают банк генов изучаемой бактерии расщеплением её ДНК эндонуклеазами рестрикции,

а затем отбирают нужный клон из суммы фрагментов ДНК методом электрофореза с последующей проверкой генетических свойств этих фрагментов методом трансформации. Далее выбранный фрагмент ДНК лигируют в состав подходящей плазмиды (вектора). Комбинированную плазмиду вводят в удобный для работы штамм бактерий (например, *E. coli*). Из биомассы бактерии, несущей ДНК-зонд, выделяют плазмидную ДНК и маркируют её, например, радиоизотопной меткой.

Затем осуществляют гибридизацию ДНК-зонда с ДНК бактерии. Образовавшиеся гибридные участки проявляют методом автордиографии. По относительной частоте гибридизации генетического маркера с хромосомой той или иной бактерии делают заключение о генетическом родстве этих бактерий с исследуемым неизвестным штаммом.

Дополнением к ДНК-ДНК гибридизации служит метод секвенирования последовательностей генов, кодирующих белки с консервативными функциями (“housekeeping genes” или “гены домашнего хозяйства”), а также RAPD-ПЦР (англ. Random Amplified Polymorphic DNA) – метод случайной амплификации полиморфной ДНК с произвольными праймерами. Данный анализ достаточно простой и широко применяется в молекулярной генетике. Метод RAPD-ПЦР заключается в амплификации фрагментов ДНК с использованием единичного короткого (длиной от 10 до 20 нуклеотидов) обычно декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью, содержащей 40–70 мол. % Г+Ц в составе праймера и 50–100 % лингвистической сложности нуклеотидной последовательности, с низкой температурой отжига. Полученные продукты разделяют при помощи агарозного электрофореза, получая уникальный для каждого штамма/вида профиль амплифицированных продуктов, на основании которых строят бинарную матрицу и филогенетические деревья с использованием различных программ (TREECON for Windows) [Van de Peer, De Wachter, 1994].

Полиморфизм продуктов амплификации ДНК включает характеристики трёх типов: длину фрагментов, наличие/отсутствие полосы и интенсивность свечения. Вариативность в длине продуктов является результатом инсерции/делеции в амплифицируемом фрагменте между праймер-связывающими сайтами, тогда

как наличие/отсутствие полиморфизма определяется присутствием/отсутствием самих праймер-связывающих сайтов. К недостаткам метода относится низкая воспроизводимость результатов, обусловленная повышенной чувствительностью к условиям реакции: концентрации ионов магния, соотношению праймер/матрица, температурному режиму. Тем не менее RAPD-анализ может быть использован как экспресс-метод выявления генетического полиморфизма.

Анализ генов 16S рРНК

Значительный вклад в развитие сравнительной филогении бактерий был внесён исследованиями 5S, 16S и 23S рибосомных РНК. Данные молекулы содержат участки с самой высокой степенью генетической стабильности. Считается, что они находятся вне механизма действия естественного отбора и эволюционируют только в результате спонтанных мутаций, происходящих с постоянной скоростью. Накопление мутаций зависит только от времени, поэтому информация о нуклеотидной последовательности этих молекул считается наиболее объективной для определения филогенетического родства организмов на уровне таксонов от вида до царства.

В случае анализа 5S рРНК обычно определяют полную последовательность нуклеотидов, которая в этой молекуле у бактерий составляет 120 нуклеотидов. При исследовании 16S и 23S рРНК, содержащих 1540 (из которых 900 – консервативны) и 3300 нуклеотидов соответственно, часто проводят анализ олигонуклеотидов, полученных из этих молекул с помощью специфических эндонуклеаз рестрикции.

Наиболее широкое распространение получило сравнительное изучение последовательности нуклеотидов в рибосомных РНК – 16S рРНК. Однако определение первичной структуры 16S рРНК слишком трудоёмко и дорогостояще, поэтому проводится частичный анализ последовательностей, так называемая сравнительная каталогизация олигонуклеотидов. Метод состоит в выделении 16S рРНК из различных бактерий, их частичном гидролизе до олигонуклеотидов, секвенировании последних и обработке полученных данных нумерическими методами. Построенные при этом дендрограммы близки филогенетическому дереву.

составлен из горизонтально привнесённых генов, обеспечивающих тесное взаимодействие азоспирилл с наземными растениями. Базовая составляющая пангенома *Azospirillum* (“housekeeping genes”) содержит гены, имеющие ортологи (гены, которые эволюционировали вертикально от одного предкового гена, принадлежащего общему предку сравниваемых организмов) у их аквабактериальных “родственников”. Это свидетельствует о том, что азоспириллы являются типичными представителями водных микроорганизмов. Подвижная составляющая пангенома *Azospirillum* содержит гены, кодирующие функции ассоциации с растениями. На настоящий момент азоспириллы адаптированы в большем числе случаев к ризосфере и довольно широко встречаются в иных наземных объектах. Авторы исследований полагают, что при использовании традиционных молекулярно-генетических оценок (в частности 16S рРНК) “за кадром” оказываются события, совпавшие с выходом на сушу сосудистых растений и начавшиеся в процессе наземной адаптации азоспирилл около 400 млн лет назад благодаря эффектам горизонтального переноса генов в подвижной части пангенома, составляющей почти половину его общего содержания. “*Может оказаться, что две таксономические группы более схожи по сравнению с третьей не потому, что разделяют более близкого общего предка, а потому что они наиболее часто обмениваются генами*” [Gogarten et al., 2002].

Горизонтальный перенос генов выявляется не только у прокариотов, но и эукариотов, в ядерном геноме которых немало генов бактериального или архейного происхождения. Считается, что это результат перемещения в ядро генов из митохондрий или хлоропластов, возникших на базе прокариотных геномов, претерпевших редукционную эволюцию. Обсуждается и другая причина мозаичного строения ядерных геномов эукариотов – за счёт интеграции чужеродных фрагментов ДНК, поступающих с пищей, например, при поедании бактерий протистами [Шестаков, 2009].

Значение горизонтального переноса генов существенно ослабевает в эволюционном развитии и существовании эукариотов. Современный дизайн филогенетического древа жизни показывает преобладание древовидной топологии у эукариотов

ных часов. Установлено, что ценными молекулярными хронометрами в систематике прокариотов являются, среди прочих, различные рибосомные белки, β -субъединица АТФазы, фактор элонгации Т_{tu}, РНК-полимеразы или марганец-зависимая дисмутаза пероксида. Эти альтернативные макромолекулы широко или универсально распространены среди бактерий, не передаются горизонтально, а скорость их молекулярной эволюции сопоставима или, до некоторой степени, выше скорости эволюции гена 16S рРНК, вследствие чего они должны больше подходить для дифференциации близкородственных организмов.

Тем не менее благодаря именно сравнительному анализу последовательностей нуклеотидов гена 16S/18S рРНК последние десятилетия в микробиологии проходили под знаком ревизии системы микроорганизмов, её принципов и описания новых таксонов. Изучение структуры гена 16S/18S рРНК представителей различных таксонов привело к выявлению среди прокариотов группы архей, что свидетельствует о том, что дихотомия прокариотов и эукариотов – это искусственная конструкция, которая не соответствует реальной эволюции геномов.

Оказалось, что глобальное филогенетическое древо имеет, по меньшей мере, тритомическую структуру (см. рис. 2). Стволы глобального дерева соответствуют филогенетическим мегатаксонам, которые Вёзе называет доменами (от греч. “domos” – дом, семья). Раньше всех сформировался домен *Bacteria*, и поэтому он имеет право претендовать на титул самого архаичного из трёх доменов. Домен *Archaea*, вопреки названию (от греч. “archaios” – древний), дивергировал с доменом *Eucarya* уже после того, как бактерии отделились от основания ствола филогенетического древа. Домены *Bacteria* и *Archaea* состоят из ветвей, соответствующих филогенетическим таксонам – филам (от греч. “phyle” – племя).

Применение генетических методов существенным образом повлияло на развитие эволюционных представлений в микробиологии. С помощью этих методов микробиологам удалось построить систему филогении бактерий. Так, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК был проведён на значительном количестве представителей 150 родов и более

50 видов бактерий. При этом было установлено хорошее совпадение результатов с данными, полученными ранее при исследовании ДНК-ДНК и ДНК-рРНК гибридизации, причём хорошее соответствие на всех уровнях родства.

На основании этого анализа все бактерии подразделяются на три таксономических типа [Krieg, Garrity, 2001; Ludwig, Klenk, 2001].

Фирмикуты (*Firmicutes*) – грамположительные организмы с низким до 50 % содержанием гуанина + цитозина (Г+Ц) в ДНК, а также *Bacillus* (облигатные или факультативные аэробы), *Clostridium* (преимущественно анаэробы), *Staphylococcus*, *Mycoplasma* (не имеют клеточной стенки и не красятся по Граму) и классические молочно-кислые бактерии, такие как *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*.

Один из самых крупных филумов в пределах домена *Bacteria* – актиномицеты, в новом понимании актинобактерии (*Actinobacteria*) – грамположительные (большинство нитчатые) бактерии с высоким (более 50 %) содержанием Г+Ц в ДНК, а также *Bifidobacterium*, *Mycobacterium* и *Corynebacterium*. Их рост происходит за счёт ветвления гифов. Благодаря этому они получили своё название “лучистые грибы”, которое происходит от греческих слов, обозначающих “луч” (“aktis” или “aktin”) и “грибы” (“mukēs”). Традиционно актиномицеты считались переходными формами между грибами и бактериями. Действительно, многие актинобактерии, как нитчатые грибы, продуцируют мицелий, и многие из мицелиальных актиномицетов размножаются путём спорообразования. Однако сравнение с грибами лишь поверхностное (внешнее): как и все бактерии, актиномицеты имеют пептидогликановую клеточную стенку и восприимчивы к антибактериальным агентам. Актинобактерии обитают в почвенных и водных средах: представители *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* и *Salinispora* являются симбионтами растений, например *Frankia* spp., патогенами растений или животных, например *Corynebacterium*, *Mycobacterium* или *Nocardia*, или комменсалами желудочно-кишечного тракта, например *Bifidobacterium* spp. Превосходят другие известные группы бактерий по способности синтезировать биологически активные со-

нием, распространением и реализацией на рибосомах генетической информации. Тогда как сетевая структура обусловлена повсеместным распространением горизонтального переноса генов и затрагивает преимущественно гены операционного типа. Последние сосредоточены, как правило, в подвижной части пангенома и отвечают за клеточный метаболизм, кодируют мембранные белки, сигнальные молекулы и др. Подавляющее большинство тестов, используемых в систематике прокариотов, манипулирует маркерами из базовой части пангенома (древовидная филогения). Унифицированная система учёта влияния процесса горизонтального переноса генов пока не прослеживается [Кунин, 2014; Koonin, 2012].

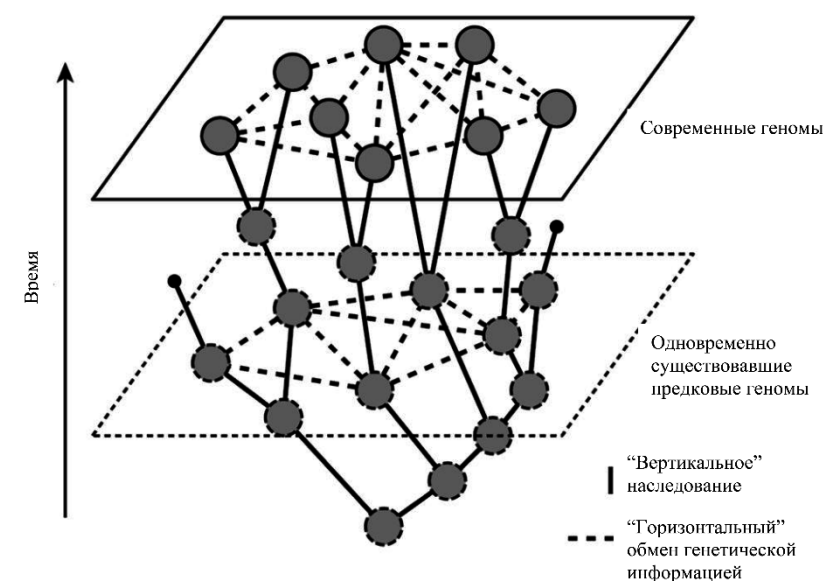


Рис. 9. Древовидное и сетевое представление эволюции прокариотов [по Koonin, 2012]

В качестве одного из примеров, демонстрирующего вклад горизонтального переноса генов в процессы видообразования, можно привести данные исследований бактерий рода *Azospirillum*, входящих в состав растительно-микробных ассоциаций [Щёголев, 2018; Wisniewski-Dye et al., 2011]. Их геном до 50 %

для свободноживущих бактерий с широкими экологическими ареалами (почвенные бациллы, псевдомонады и др.); (3) минимальное число переносов (до 8,3 %) обнаружено у патогенных бактерий, живущих в узких экониках; эти переносы весьма важны, так как определяют такие признаки, как вирулентность и токсичность; (4) переносы специфичны, поскольку приобретённый ген обнаруживается только в клетках определённого вида или даже штамма; (5) реже всего в горизонтальные переносы включены гены информационных систем (транскрипции, трансляции, репликации), составляющие базовый геном. Продукты этих генов входят в сложные белковые комплексы, в которые «чужие» белки не встраиваются или в которых не функционируют. Исключением являются гены, кодирующие аминокислот-тРНК-синтазы, что связано с особенностями работы изоакцепторных тРНК; (6) в горизонтальном переносе чаще всего участвуют гены, связанные с метаболизмом, транспортными путями, механизмами сигнальной трансдукции. У многих бактерий среди латерально привнесённых генов большую долю составляют функционально неизученные гены и гены, не имеющие сходных ортологов в реципиентном организме; (7) в составе приобретённых сегментов ДНК часто обнаруживаются профаги, плазмиды, кассеты резистентности, гены белков, участвующих в процессах сайт-специфической и «незаконной» рекомбинации, обеспечивающей интеграцию «чужих» генов.

В последние годы исследование механизмов горизонтального переноса генов между организмами и оценка его значения в эволюционном развитии жизни стало предметом пристального внимания исследователей, особенно активно проявляемого в связи с бурным развитием вычислительной молекулярной биологии, оперирующей быстро растущими базами данных расшифрованных геномов и структур разнообразных биомолекул.

По современным представлениям, эволюционные взаимоотношения между прокариотами наиболее полно отражает сочетание древовидной и сетевой топологии обобщённого древа жизни (рис. 9). Древовидная структура затрагивает преимущественно гены информационного типа (репликации, транскрипции, трансляции) в базовой части пангенома, связанные с хране-

единения, в том числе антибиотики. На настоящий момент порядок *Actinomycetales* включает 11 подпорядков и 22 семейства (<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html>).

Следующий филум в пределах домена *Bacteria* – протеобактерии (*Proteobacteria*, от греч. “próteus” – изменчивый) – грамотрицательные организмы, составляющие основную массу. Имеют сложное строение клеточной стенки, форма клеток от сферической до спиралевидной и нитевидной, некоторые клетки имеют капсулу, возможно образование плодовых тел и спор, тип питания фототрофный и нефототрофный, встречаются облигатные внутриклеточные паразиты. Самый крупный филум содержит пять основных кластеров, которые обозначены греческими буквами альфа α , бета β , гамма γ , дельта δ и эpsilon ϵ . Сюда входит большинство аэробов и организмов с окислительным метаболизмом. Филум *Proteobacteria* включает большинство известных грамотрицательных бактерий медицинского, промышленного и сельскохозяйственного значения. В него входят *Brucella*, *Ehrlichia* и *Rickettsia* (*Alphaproteobacteria*); *Burkholderia*, *Bordetella* и *Neisseria* (*Betaproteobacteria*); *Aeromonas*, *Legionella*, *Vibrio* и семейство *Enterobacteriaceae* (*Gammaproteobacteria*); и *Helicobacter* (*Epsilonproteobacteria*). *Deltaproteobacteria* включают в себя функционально разнообразные группы сульфатредуцирующих бактерий, бделловибрионов, миксобактерий, занимающих противоположные позиции в трофической системе и не имеющих большой клинической значимости.

Представители *Bacteroidetes* (*Bacteroides* – флавобактерии и сфингобактерии, пептолитические анаэробы, составляющие основную часть бактериального населения кишечника), *Spirochaetes* (спирохеты и лептоспиры) и *Chlamydiae* (хламидии) входят в несколько других филумов [Krieg, Garrity, 2001; Ludwig, Klenk, 2001].

Основная проблема бактериальной классификации – классификация и наименование некультивируемых бактерий, которые охарактеризованы лишь минимально по морфологическим признакам или по различиям в молекулярных последовательностях. Члены Международного комитета по систематической бактериологии пришли к решению признать категорию *Candidatus*,

которая официально классифицирует не полностью идентифицированные прокариоты.

Candidatus – это таксономический статус для некультивируемых видов-кандидатов, для которых установлено родство (например, те, для которых установлено филогенетическое родство на основании амплификации и сиквенс-анализа генов прокариотных РНК с использованием прокариотных праймеров), и чья аутентичность подтверждена с помощью зондирования или аналогичного метода для идентификации клеток. Кроме того, обязательное условие – доступность информации, касающейся фенотипических, метаболических или физиологических признаков. Физиологические признаки могут служить отправной точкой для дальнейших исследований и окончательного описания и присвоения названия. Утверждён подробный перечень объектов для включения в кодифицированный (зашифрованный) протокол таксона *Candidatus*.

С появлением геномики, позволившей исследовать геном как “паспорт” организма и отдельные гены *in situ*, эти первоначальные заботы могут оказаться тривиальными, поскольку сейчас исследователи располагают техническими средствами для изучения больших геномных фрагментов некультивируемых микроорганизмов посредством клонирования и секвенирования групповой ДНК, экстрагированной из смешанных сообществ, или ДНК-амплификацией из двух отдельных клеток посредством амплификации с множественным замещением цепи (multiple displacement amplification), позволяющим проводить секвенирование генов некультивируемых микроорганизмов из окружающей среды [Rondon et al., 2000; Tyson et al., 2004; Raghunathan et al., 2005; Kvist et al., 2007].

Новые возможности для изучения некультивируемого микробного разнообразия целого диапазона экосистем, включая таковые в организме человека, открывает метагеномика. Исследование разнообразия различных экосистем с помощью сравнительного анализа последовательностей биополимеров базируется на идентификации так называемых филогенетических типов на уровне вида, т.е. филотипов, которые определяют в виде групп последовательностей генов 16S рРНК с определённым уровнем сходства. Критические значения сходства последовательностей

Таблица 1. Горизонтальный перенос генов у архей и бактерий [по Koonin et al., 2001]

Вид	Число генов в геноме	Перенесённые гены, кол-во	Перенесённые гены, % в геноме
Архей			
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2407	179	8,4
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1715	77	5,0
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	2064	154	7,6
<i>Aeropyrum pernix</i>	2694	370	14,0
Патогенные бактерии			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	677	39	5,9
<i>Chlamydia trachomatis</i>	894	36	4,3
<i>Rickettsia prowazekii</i>	834	28	3,6
<i>Treponema pallidum</i>	1031	77	8,3
<i>Helicobacter pylori</i>	1553	89	6,4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3918	187	5,0
Свободноживущие бактерии			
<i>Aquifex aeolicus</i>	1552	72	4,8
<i>Thermotoga maritima</i>	1846	198	11,6
<i>Escherichia coli</i>	4289	381	9,6
<i>Pseudomonas subtilis</i>	4036	411	10,1
<i>Bacillus subtilis</i>	4110	537	14,8
<i>Synechocystis</i> sp.	3169	219	7,5

Приведённые в табл. 1 сведения характеризуют закономерности горизонтального перемещения генов: (1) доля латерально полученных генов варьирует у разных видов и может достигать от 5 до 15 % общего числа генов в геноме у свободноживущих бактерий и архей; (2) максимальные переносы характерны

горизонтальный (латеральный) перенос генов – это процесс, в котором организм передаёт генетический материал другому организму, не являющемуся его потомком. В связи с увеличивающимся количеством свидетельств, предполагающих важность этого явления для развития живых организмов, горизонтальную передачу генов сегодня некоторые исследователи рассматривают как “новую парадигму биологии”.

Горизонтальный перенос генов

Возможность горизонтального переноса генов (Lateral Gene Transfer, LGT) между организмами впервые была показана японскими исследователями в середине прошлого столетия [Akiba et al., 1960]. Открытие этого события у прокариотов дало возможность по-другому взглянуть на эволюцию жизни.

При горизонтальном переносе новых генов в геноме прокариотов происходит формирование разных генных сочетаний, способных изменить свойства клеток, расширить их адаптационный потенциал. Горизонтальный перенос генов – это источник быстрых эволюционных изменений, один из ключевых механизмов формирования новых видов у прокариотных организмов [Шестаков, 2007; Ochman et al., 2000; Koonin et al., 2001]. Как утверждает Вёзе, “это эволюционная сила, с которой нужно считаться, сравнивая по последствиям с классическими вертикальными эволюционными механизмами” [Woese, 2000].

Изменчивость организмов в результате горизонтальной передачи генов реализуется через различные каналы генетической коммуникации – процессы конъюгации (от лат. “*conjugation*” – соединение, прямой перенос, частичное объединение геномов), трансдукции (с помощью вирусов – бактериофагов), трансформации (через окружающую среду), процессы переноса генов в составе векторов – плазмид, мобильных элементов.

Активный перенос генов может происходить в симбиотических, паразитарных или ассоциативных системах, где осуществляется непосредственный физический контакт клеток. В табл. 1 приведены данные о горизонтальном переносе генов у прокариотов, полученные в результате полногеномного анализа представителей различных видов бактерий и архей.

рРНК, которые используют для определения фенотипа, не согласованы. Так, в исследованиях разнообразия микробов желудочно-кишечного тракта человека эти значения варьировали от 97 до 99 % [Zoetendal et al., 2008].

Понятно, что чем выше критическое значение, тем больше разных филотипов и, следовательно, больше ожидаемое разнообразие видов. Тем не менее независимо от используемого критического значения расчёты результирующего разнообразия должны считаться приблизительными показателями присутствующего микробного разнообразия, так как бактерии, имеющие 99 %-ное сходство последовательностей генов рРНК, могут представлять многочисленные виды и проявлять значительную экологическую и геномную неоднородность.

Таким образом, система прокариотов специфична, её описание требует иных подходов и методов, чем для растений и животных. Для классификации бактерий и архей в настоящее время используют методы молекулярно-генетического анализа с последующим построением дендрограмм. Они показывают взаимоотношения между бактериальными родами, видами или конкретными штаммами и составлены на основании изучения последовательности нуклеотидов в рРНК, а также по итогам ДНК-ДНК и ДНК-РНК гибридизации. Если бактериальная таксономия начиналась в основном как интуитивный процесс, то в настоящее время благодаря возможности использования молекулярно-генетических методов становится всё более объективной (естественной).

Однако идентификация бактерий до родов на основании только генетических методов без предварительного изучения их фенотипических характеристик часто вообще невозможна. Поэтому наилучшим подходом в систематике прокариотов считается комплексное изучение как генотипических, так и фенотипических свойств. При этом надо помнить, что в случае несоответствия между филогенетическими и фенотипическими данными приоритет временно отдают последним [Rosselló-Móra, Amann, 2001].

В 1970 г. Ритой Колвелл [Colwell, 1970] был предложен новый термин “полифазная таксономия” (англ. polyphasic taxonomy). Это говорит о том, что, несмотря на успехи молекулярной

таксономии, геносистематики, наиболее полные знания о штаммах с целью разработки достоверных (качественных) классификаций можно получить только при сочетании традиционных молекулярно-генетических тестов с изучением хемотаксономических, физиологических и культуральных свойств изолятов.

В полифазной (поливалентной) таксономии учитывается вся имеющаяся фенотипическая (“*производная белков и их функций, различных хемотаксономических маркеров и широкого ряда выраженных признаков*”) и генотипическая (“*производная нуклеиновых кислот – ДНК и РНК, присутствующих в клетке*”) информация, которая интегрируется в консенсусную классификацию (рис. 8).

свойствах исследуемых объектов. Примирить эти два подхода позволяет полифазная таксономия, которая наряду с фенотипическими учитывает и генотипические признаки, в первую очередь первичную структуру РНК [Vandamme, 2011].

Лекция 6. К ВОПРОСУ О СОВРЕМЕННОЙ КОНЦЕПЦИИ ПРОКАРИОТНОГО ВИДА. РОЛЬ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В ПРОЦЕССАХ ВИДООБРАЗОВАНИЯ У ПРОКАРИОТОВ

*Бактерии образуют виды как никто другой
(Bacteria form species like everyone else).*
Ф.М. Коэн [Cohan F.M., 2002]

Вид – ключевой элемент бактериальной таксономии. В настоящее время не существует правил очерчивания границ высших иерархических рангов, таких как род, семейство и порядок. Хотя, по предположению, на уровне рода таксоны должны быть поддержаны фенотипическими описаниями, на практике границы высших рангов очерчиваются преимущественно на основании сравнения последовательностей генов 16S рРНК.

Одна из долго существовавших генетических догм заключается в том, что биологические виды могут приобретать новые черты лишь путём постепенного (шаг за шагом) накопления мутаций, передаваемых из поколений в поколение. Это вариант так называемого вертикального переноса генов, при котором организм получает генетический материал от своего предка. Долгое время это считалось единственно возможным генетическим механизмом видообразования со строгим запретом преодоления неродственных межвидовых барьеров.

Однако с конца 50-х гг. XX столетия стали появляться данные, свидетельствующие о возможности передачи генов не только от предков к потомкам, но и по горизонтали, т.е. о реализации обмена генетической информацией между различными видами организмов, порой весьма отдалённо родственными. При этом может иметь место единовременное приобретение организмами большого генетического материала. Таким образом,

дают прокариотным морфотипом, а представители домена *Eucarya* – эукариотным, они вместе обособлены от представителей домена *Bacteria*).

Объяснения таких противоречий филогенетической системы прокариотов приводятся А.В. Пиневичем [2007]:

1. Резкое изменение фенотипа необязательно должно быть связано с большими изменениями инфраструктуры генома. Например, в случае пурпурных бактерий рода *Rhodobacter* точечные мутации генов, кодирующих основные составляющие фотосинтетического аппарата, приводят к утрате фототрофного фенотипа и его кардинальной замене на хемотрофный. В свою очередь признаки, от которых мало зависит жизнеспособность, в ходе эволюции могут теряться без обрыва вертикальных генеалогических связей. В обоих случаях дендрограммы, построенные с учётом фенотипического сходства, не совпадают с дендрограммами, построенными на основе филогенетического родства.

2. Отдельные архитектурные детали прокариотной клетки экспрессируются на разной генетической основе, т.е. являются гетерологичными аналогами. Так, унитарные мембраны бактерий и архей имеют альтернативный липидный состав. В свою очередь у разных прокариотов ригидный слой клеточной стенки представлен пептидогликановым саккулусом, белковым саккулусом, мультимерным белковым S-слоем, псевдомуреиновым саккулусом или гетерополисахаридным матриксом.

Поливалентный подход можно рассматривать как союз фено- и генотипического подходов. Ценность фенотипического подхода в том, что основанная на нём таксономическая система традиционна и ею удобно пользоваться на практике. Фенотипический подход учитывает информацию о биологических особенностях объекта и результатах сиквенса. Недостатком этого подхода является отсутствие объективного критерия для оценки эволюционных связей. Он не допускает парадоксальности, несмотря на то, что это объективное свойство мира прокариотов. Наконец, при нём выстраивается произвольная иерархия критериев – от второстепенных до ведущих. Ценность генотипического подхода заключается в его объективности. Недостаток подхода в том, что филогенетическая система нетрадиционна, ею неудобно пользоваться, она не даёт информации о функциональных

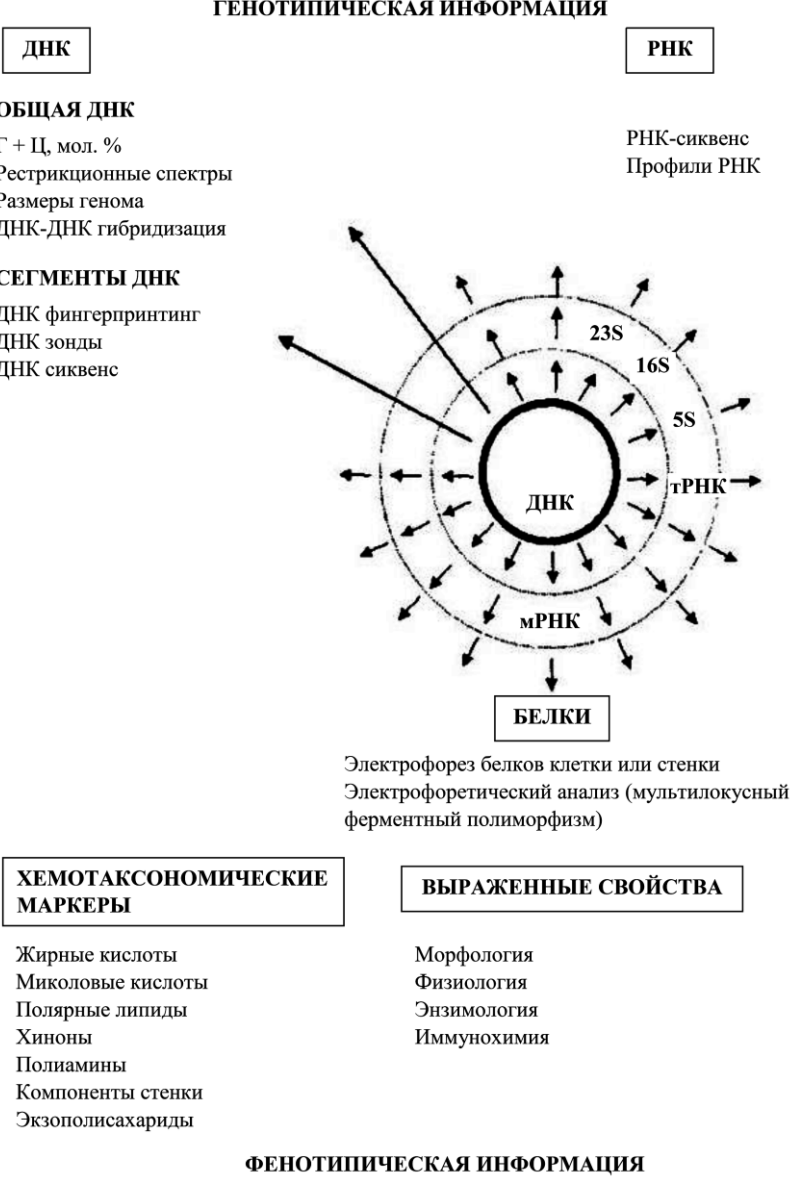


Рис. 8. Клеточные компоненты и методы анализа, используемые в полифазной таксономии микроорганизмов [по Vandamme et al., 1996]

Применение полифазного подхода привело к глубоким изменениям в бактериальной систематике, особенно в отношении систематического положения таких биотехнологически значимых групп, как актинобактерии, для которых применение традиционных таксономий на основе формы и функции не позволяло проводить отбор штаммов для промышленного скрининга. Реклассификация родов *Microtetraspora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и *Streptomyces* и очерчивание новых родов *Beutenbergia*, *Ornithinicoccus*, *Tessaracoccus* и *Williamsia* – это результаты применения полифазного подхода.

Сегодня всеми признаётся, что современная (консенсусная) классификация бактерий должна основываться на полифазном подходе – совместном учёте как можно большего числа гено- и фенотипических признаков, иными словами, интегрированном использовании возможного количества различных методик, различной информации о бактериях, полученной с помощью молекулярно-биологических, химических, нумерических методов. Надёжная (достоверная, качественная) классификация может быть создана с использованием геномной информации и информации о фенотипе. В перспективе результатом дальнейших исследований видится единая система классификации бактерий, основанная на общих принципах и являющаяся надёжной опорой как для идентификации представителей уже известных таксонов, так и для выделения из природных источников новых организмов.

Парадоксы филогенетической системы прокариотов

В настоящее время на основе достижений молекулярной биологии создана филогенетическая мегасистема для всех живых существ, обладающих клеточным строением. В результате её детализации построены многочисленные дендрограммы для отдельных филогенетических таксонов. Если в филогенетической системе многоклеточных ядерных организмов (растения, животные, грибы) фенотипические различия закономерно накапливаются по мере увеличения эволюционной дистанции (“два близких родственника больше похожи друг на друга, чем они порознь похожи на своих дальних родственников”), то объективным свойством мира прокариотов (бактерий и архей) является “парадок-

сальность” (“невозможное возможно”). В этом смысле филогенетическая система прокариотов сходна с таковой протистов (одноклеточных ядерных организмов) [Пиневич, 2007].

Парадоксальной называют такую ситуацию в систематике, когда глубина фенотипической дивергенции не соответствует глубине генной дивергенции. Другими словами, когда близкородственные микроорганизмы имеют резко контрастные фенотипы, как если бы их разделяла большая эволюционная дистанция. В свою очередь микроорганизмы, расположенные на эволюционном древе далеко друг от друга, могут проявлять высокое фенотипическое сходство (как близкие родственники).

Черты невероятной парадоксальности чаще всего выявляются среди членов домена *Bacteria*. Многие его близкородственные представители обладают резко контрастными фенотипами. Примером служат хемогетеротрофные бактерии, принадлежащие к виду *Paracoccus denitrificans*, которые расположены на дендрограмме фила *Proteobacteria* по соседству с митохондрией (их электрон-транспортные цепи идентичны). Противоречие заключается в том, что общим родственником этих бактерий и митохондрий являются пурпурные фототрофные бактерии, принадлежащие к виду *Rhodobacter capsulatus*. Равным образом сильно дивергировавшие бактерии могут проявлять парадоксальное фенотипическое сходство. Например, нитрифицирующие бактерии встречаются в двух разных филах – *Nitrospirae* и *Proteobacteria*.

Подобные парадоксы есть и среди архей. Так, близкородственные представители класса *Methanococci* обладают контрастной морфологией (от кокков, палочек, клеток неправильной формы, похожих на многоугольники, до нитевидных клеточных агрегатов). С другой стороны, гипертермофильные представители встречаются в филах *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*, а экстремальные галофиты – в разных классах *Methanococci* и *Halobacteria*.

Невероятные парадоксы обнаруживаются при сравнении дихотомической дендрограммы “прокариоты-эукариоты” (в этом случае бактерии и эволюционно обособленные от них археи обладают общим прокариотным морфотипом) и тритомической дендрограммы, построенной с учётом гомологии гена 16S/18S рРНК (несмотря на то, что представители домена *Archaea* обла-

биоportal “StrainInfo” [Dawyndt et al., 2005], в котором биологический материал, хранящийся в многочисленных Биологических ресурсных центрах (БРЦ), сведён в интерфейсе единого портала вместе с прямыми ссылками на соответствующую информацию на веб-сайтах коллекций микробных культур. Эта информация автоматически соединена с соответствующими последовательностями в общедоступном домене и опирается на все известные научные публикации, в которых использовался данный организм. Для обеспечения таксономической глубины сведений, предоставляемых биоportalом “StrainInfo”, все таксономические названия, появляющиеся на биоportalе, полностью интегрированы с основными источниками таксономической информации и имеют ссылки на эти источники.

Следует обратить внимание на то, что ничто в современной систематике не является незыблемым. Консенсусная классификация (полифазная таксономия, т.е. использование всей имеющейся информации о согласующихся гено- и фенотипических характеристиках для выделения таксономических групп) – это, безусловно, компромисс, который содержит некоторое противоречие. Нередко думают, что чем больше будет доступной информации в будущем, тем более стабильной будет классификация. Пока что исследования целого генома и анализ методом MLSA противостоят микробному разнообразию, поскольку процент генов, принадлежащих главным геномам, и степень разнообразия их последовательностей сильно варьируют между бактериальными родословными. Вне всякого сомнения, существует огромный пласт микробного разнообразия, с которым можно работать на практике, только если оно оформлено в упорядоченной структуре (искусственной или нет) с соответственными терминами для коммуникации.

Для прокариотных организмов до сих пор отсутствует единое определение рода – важной единицы систематики. Границы и критерии выделения новых родов отличаются для разных групп прокариотов. Например, межродовой уровень сходства генов 16S рРНК для актинобактерий находится в пределах 95–96 % и ниже. В данном случае при описании нового рода актинобактерий важно использование хемотаксономического анализа. Таксоны уровня семейства описываются на основе филогенетических (16S рРНК) данных. Недавно для классификации высших таксонов

(рис. 10). Данная схема отражает предполагаемое слияние видов бактерий и архей как источник возникновения эукариотов и приобретения ими основных клеточных органелл (митохондрии, пластиды, возможно, клеточные ядра и др.) [Щёголев, 2016].

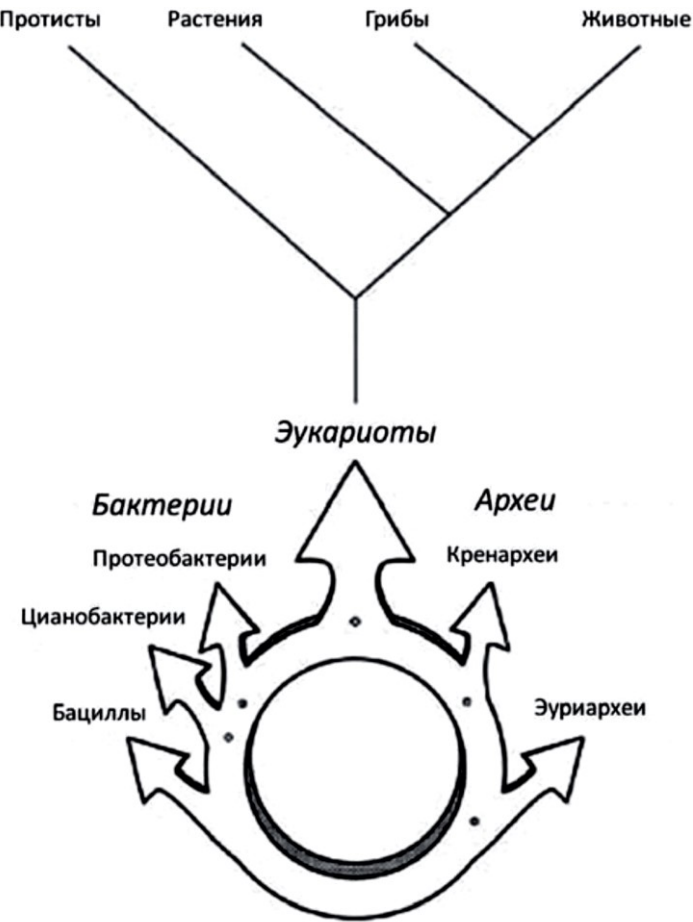


Рис. 10. Современный дизайн филогенетического дерева жизни, отражающий эффекты горизонтального переноса генов среди прокариотов и предполагаемое слияние видов бактерий и архей как источник возникновения эукариотов [по Щёголеву, 2016]

Геномный анализ показал, что горизонтальный перенос генов может происходить и в обратном направлении – от эукариотов в клетки прокариотов. Это возможно при тесных физических контактах между организмами, в системах эндосимбиоза, паразитизма, фаготрофии, при поглощении ДНК из среды, через различные каналы генетической коммуникации, в том числе с участием плазмид, вирусов, транспозонов, ретровирусоподобных элементов. Например, предполагается, что донором эукариотного гена термоустойчивой аминоксил-тРНК-синтетазы у археев *Pyrococcus* могли быть полихеты. В геноме патогенных бактерий (риккетсий и хламидий) обнаружено около 20 эукариотных генов. Среди них несвойственные прокариотам гены белков, транспортирующих АТФ и АДФ. Эти транспортные системы позволяют патогенным бактериям “выкачивать” энергию из клетки хозяина, не затрачивая собственные ресурсы.

Другие эукариотные гены, приобретённые патогенными бактериями путём горизонтального переноса, обеспечивают “нападение” на клетку хозяина – это ферменты протеолиза, ингибиторы иммунного ответа, рецепторные белки, облегчающие патогенам проникновение в клетку хозяина. Подобного рода горизонтальные переносы генов, по-видимому, происходили сравнительно недавно в процессе превращения сапротрофных организмов в патогенные. Характерно, что у риккетсии (возбудителя тифа) немало генов, гомологичных генам животных, а в геноме хламидии (возбудителя трахомы) больше генов, типичных для растений. Это указывает на различия в путях горизонтального переноса генов у этих филогенетически далёких друг от друга бактерий, а также позволяет предполагать, что предки хламидии первоначально были паразитами растений, а затем переключились на животных. Очевидно, что переносы генов патогенности происходили между риккетсиями и хламидиями, живущими в одной эконше в организме млекопитающих.

Совершенно ожидаем вопрос: “Какие конкретные виды организмов были первичными донорами генов?” В настоящее время на этот вопрос пока нет однозначного ответа. Можно лишь предполагать, что обнаруживаемые в геномах чужеродные гены могли попасть туда через цепочку промежуточных хозяев. По-видимому, на самых ранних этапах эволюции существовало общее

виды, очерченные на основании экспериментов по ДНК-ДНК гибридизации и расположенные в определённом порядке на филогенетическом остоле на основании сиквенс-анализа генов 16S рРНК, представляют согласованные биологические единицы.

В последние годы надёжным методом сравнения уровня генетического родства (генетической близости) штаммов является подсчёт средней идентичности нуклеотидов (Average Nucleotide Identity, ANI) для пары сравниваемых геномов. Приблизительно 95 %-ные значения ANI соответствуют современному стандарту определения видов (70 %) ДНК-ДНК реассоциации [Konstantinidis, Tiedje, 2005; Goris et al., 2007]. При этом для сравнения геномов двух штаммов достаточно 20 % длины полногеномной последовательности. Диапазон значения ANI 93–96 % представляет собой уровень сходства для штаммов одного вида [Rosselló-Móra, Amann, 2015].

Значения ANI выявляют сохранность ДНК стержневого генома, тогда как консервативная ДНК определяет долю ДНК, общую для двух геномов. Поэтому обе оценки внутривидового сходства не обязательно должны совпадать. По этой причине Марк Делогер с соавторами [Deloger et al., 2009] внедрили максимальный уникальный показатель совпадений (Maximal Unique Match index, MUMi), в котором учитываются оба критерия отличия. Значения MUMi представляют собой расчёт геномных расстояний с учётом количества максимальных уникальных и точных совпадений данной минимальной длины, общей для двух сравниваемых геномов. Значения MUMi лучше коррелируют с таковыми ANI, чем с очерчиванием границ индивидуальных видов на основании значений ДНК-ДНК гибридизации, и группируют штаммы так, что это сопоставимо с деревьями, полученными на основании анализа MLSA.

Сравнительно недавно создан проект “Дерево всех существующих видов” (The All-Species Living Tree project; <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>), имеющий своей целью реконструировать единое 16S рРНК-дерево, приютившее все секвенированные типовые штаммы ныне классифицированных видов в доменах *Archaea* и *Bacteria* [Yarza et al., 2008]. Полезным инструментом для отслеживания идентичности (родства) штаммов, для которых депонированы последовательности, является

гены, независимо от их функций и позиций в геноме, предлагали жёсткую филогенетическую реконструкцию среди близкородственных штаммов. Три – это минимальное количество генов, необходимое для филогенетических анализов, чтобы предварить распознавание событий горизонтального переноса генов.

Мультилокусный анализ был использован для разграничения видов и подвидов грамположительных бактерий родов *Clavibacter*, *Kribbella*, *Lactobacillus*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, а также для оценки филогенетических отношений внутри таких сложных видов, как *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum* и *Stenotrophomonas maltophilia*. В литературе появились первые данные о использовании данного подхода в классификации актинобактерий семейства *Microbacteriaceae*.

Несмотря на высокую разрешающую способность, скоростные характеристики и продуктивность нового метода MLSA, следует констатировать, что до сих пор не существует универсального дескриптора, который можно было бы использовать для надёжного определения видов.

Более двух последних десятилетий бактериальные таксономисты считают полногеномную информацию стандартом в определении таксономии. Число полногеномных последовательностей стремительно растёт и позволяет оценивать изменения на уровне генома внутри видов и между ними. Стало понятно, что помимо нуклеотидных замещений такие события, как утрата генов, дупликация генов, горизонтальный перенос генов и хромосомные реорганизации, формируют геном и что значительные фракции генома любого отдельно взятого штамма могут быть уникальными для этого. Наблюдается повышенный интерес к использованию данных о последовательностях геномов для оценки эволюционных взаимосвязей между прокариотными видами. Кроме того, в распоряжении исследователей появился целый спектр новых методов определения таксономических взаимосвязей внутри близкородственных видов и между ними.

Среди новых подходов – анализ состава и порядка генов, сравнительный сиквенс-анализ консервативных и других макромолекул или целых геномов, анализы состава нуклеотидных сигнатур и даже метаболических реакций. Эти новые аналитические методы в целом подтверждают идею о том, что бактериальные

геномное “коммунальное хозяйство” в неустоявшихся предковых клетках, между которыми происходил активный горизонтальный обмен генами. В этот период шло накопление генетической информации с последующей автономизацией клеток, давших начало отдельным таксономическим линиям. Картина эволюционных связей в мире предковых прокариотов представляла собой не столько ветвящиеся дерево, сколько своего рода мицелий с переплетённой сетью горизонтальных переносов в самых разнообразных и неожиданных направлениях, диктуемых возможностями физических контактов клеток в общих или перекрывающихся эконизах. Поэтому и геномы прокариотов и эукариотов мозаичны [Заварзин, 2018].

Данные, полученные с использованием методов геномики, позволяют утверждать, что в ходе эволюции происходили массивные геновые переносы как внутри царств, так и между ними. Многие организмы, в первую очередь прокариоты, участвовали в горизонтальных переносах как “проточные” ёмкости. Если бы в процессе эволюции кишечная палочка, например, только приобретала, но не теряла гены, то размер её генома должен был бы удвоиться за 100 млн лет, с тех пор как произошла дивергенция с близкородственной бактерией *Salmonella*. Расчёт сделан на основе применения метода “молекулярных часов”. Однако размер *E. coli* почти не изменился за столь длительное время: геномный анализ выявил не только приобретение большого числа генов, но и отсутствие многих “старых” генов, обнаруживаемых у сальмонеллы.

“Захваченные” гены могут сохраниться в геноме, но могут и подвергнуться элиминации или переносу в клетки другого организма. Так как в ходе эволюции происходит амелиорация чужих генов, то по изменению нуклеотидного состава и частоты встречаемости кодонов можно выявить те гены, которые пришли давно, и те, что появились недавно. Баланс геновых потоков, приводящих к приобретению и утрате генов, определяет не только адаптивную изменчивость организмов, но и поддержание оптимального размера генома.

Скорости геновых потоков у разных групп организмов различные и влияют на темпы эволюции геномов. Геномный анализ

позволяет сопоставить время приобретения и утраты определённых генов с геологическими эпохами, экологическими кризисами и региональной динамикой биоты.

Не только сам геном, но и механизмы горизонтального переноса генов являются объектами эволюционного процесса. Эволюционируют каналы генетической коммуникации, механизмы рекомбинации, участвующие в “приживлении” или “отторжении” чужих генов. Если в какие-то периоды глобальных геосферных и биосферных перемен меняется диапазон векторных систем (вирусов, плазмид, мобильных элементов), повышается рекомбинационная активность и частота горизонтальных переносов генов, то увеличивается и вероятность приобретения новых генов, обеспечивающих селективные преимущества клеток. Там, где нет активных контактов, не будет и контактирующих популяций. Особенно результативны такие процессы в многокомпонентных сообществах, где взаимодействуют различные организмы, метаболически связанные между собой [Шестаков, 2003].

Определение вида в прокариотологии

Строгое общепринятое определение биологического вида в микробиологии до сих пор не разработано. Линнеев вид или линнеон (linnaeon) – это эволюционирующая комплексная система (совокупность, популяция) неких групп организмов (поколений), сходных по фенотипу и генотипу; как правило, они способны потенциально скрещиваться только друг с другом, давать плодovitое потомство, изолированы репродуктивно и существуют в ограниченном ареале (изолированы географически и экологически). В данном случае ведущим критерием базового таксона служит “внешнее” различие, а “внутреннее” сходство рассматривается как морфологическая очевидность [Пиневиц, 2007]. Однако для тех организмов, которые не размножаются половым путём или для которых характерно наличие только одного пола (например, в случае партеногенеза бделлоидных коловраток), или для ряда растений, способных к межвидовым и даже межродовым скрещиваниям, такое понимание вида затруднительно.

на видо-родовом уровне и отличается более высокой воспроизводимостью результатов по сравнению с методом ДНК-ДНК гибридизации.

В отличие от мультилокусного сиквенса-типирования последовательностей (MLST) – специального метода для определения штаммов внутри видов, посредством которого сходства и различия обычно оцениваются в виде различий аллельных профилей, – метод MLSA фокусируется на исследовании филогенетических отношений между близкородственными организмами.

В последнее время опубликовано много примеров таких исследований, и в целом выявленные кластеры с очерченными границами хорошо коррелируют с видами, границы которых определены по результатам экспериментов ДНК-ДНК гибридизации [Fraser et al., 2009]. Мультилокусный анализ имеет более высокую разрешающую способность по сравнению с традиционным анализом последовательности 16S рРНК-генов (особенно в случаях описания взаимосвязей внутри и между близкородственными видами). Логически выведенное филогенетическое дерево не только обеспечивает филогенетический остов, но и выявляет внутривидовые взаимосвязи на том уровне, на котором сравнительный сиквенса-анализ 16S рРНК перестаёт быть дифференцирующим.

В результате полногеномных исследований был получен универсальный набор генов, кодирующих белок, который может быть полезен для филогенетической концепции вида в микробной таксономии [Zeigler, 2003; Santos, Ochman, 2004]. При этом предпочтительно использование конститутивных (обязательных или “домашнего хозяйства”) генов (housekeeping genes), в частности *gyrB*, *recA*, *rpoB* и др. Они эволюционируют относительно медленно и большая часть изменений, которые аккумулируются в этих генах, считаются селективно нейтральными.

Чаще всего анализируют от 6 до 8 генов [Hanage et al., 2006]. Анализы с использованием такого количества генов выявили, что MLSA-филогении близкородственных организмов точно соответствуют филогениям, полученным на основании современного анализа последовательностей полного генома [Konstantinidis et al., 2006]. Кроме того, почти все стержневые

в случае большого размера популяции и низкой вероятности генетической рекомбинации между отдельными клонами внутри этой популяции.

Модель экотипа Козна является весьма привлекательной, так как она описывает эволюционные и экологические принципы, которые, возможно, обуславливают структуру и видообразование микробных популяций. По сути, подход Козна к проблеме бактериального вида объединяет и типовую концепцию вида, и полифазную таксономию, и разные аспекты вида – эволюционный, экологический, генетический (таким образом фактически происходит сопоставление геномо-, таксо- и номенвидов). Обмен генов между бактериями для Козна не представляется проблемой (“*существование случайного латерального переноса генов (LGT) не является достаточным основанием для того, чтобы ставить под сомнение концепцию микробного вида*”), более того, он отмечает его как фактор, способствующий быстрому видообразованию.

В 2002 г. был создан Специальный комитет по переоценке определения видов в бактериологии (The *Ad Hoc* Committee for the Re-evaluation of the Species Definition in Bacteriology), который предложил новые рекомендации, касающиеся определения видов в свете разработанных новейших методологий, доступных для систематиков [Stackebrandt et al., 2002]. Как констатирует Специальный комитет, внедрение инновационных методов обеспечивает новые возможности для систематики прокариотов.

Среди последних многообещающих достижений – мультилокусный анализ нескольких генов (Multi-Locus Sequence Analysis, MLSA), основанный на секвенировании частичных последовательностей 4–12 “housekeeping” генов и их дальнейшем филогенетическом анализе. При этом сравнивают последовательности каждого отдельного гена (например, *gyrB*, *recA*, *rpoB*) или соединённые последовательности (concatenated sequences) всех исследуемых генов (например, *gyrB-recA-rpoB*). Данные гены должны присутствовать во всех исследуемых штаммах и иметь консервативные и переменные области для разграничения таксонов. Метод MLSA позволяет анализировать большой набор штаммов

Прокариоты, как известно, не обладают полом в подлинном смысле, размножаются исключительно вегетативным способом путём бинарного деления (при этом генетический материал передаётся вертикально – от материнской клетки к дочерней). Критерий репродуктивной изоляции к ним неприменим, поскольку они широко используют механизмы латерального генетического переноса, в том числе обладают потенциальным промискуитетом (от англ. “promiscuity” – неразборчивость в связях). Прокариоты – потенциальные космополиты (“*everything is everywhere*”) – теоретически они могут проникать в любой ареал и потенциально способны к экологической адаптации во всём диапазоне существования органической жизни. Поскольку прокариоты не имеют эмбриогенеза, анатомического строения и сложной морфологии, у них гораздо сложнее выявлять общие производные признаки, необходимые для описания видов по фенотипу.

В данном случае ведущим критерием базового таксона служит не “внешнее” различие, а “внутреннее” сходство. В связи с этим выделение видов из общей совокупности штаммов бактерий и архей в традиционной систематике прокариотов оказывается в значительной степени субъективным (искусственным). Эта задача решается только путём консенсуса.

Так, в 1987 г. Специальный комитет по согласованию подходов к бактериальной систематике (*Ad Hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics) заявил о том, что стандартом для очерчивания видов должна стать последовательность полного генома. Анализ ДНК-ДНК гибридизации полного генома был лучшим подходом к стандарту последовательности в течение нескольких десятилетий и представлял собой наиболее применимую процедуру.

С точки зрения генотипической идентификации, бактериальный вид (или эквивалентная виду операционная таксономическая единица, ОТЕ, основанная на последовательностях 16S рРНК [Ley et al., 2006]), определяется как “*группа культивируемых штаммов, включая типовой штамм, имеющих 70 % и более сходства показателей ДНК-ДНК гибридизации, ниже 5 мол. % отличий содержания ГЦ-пар в геномной ДНК, выше 98,65 % сходства последовательностей генов 16S рРНК*” [Kim et al., 2014]. Крайнее значение 70 %-го сходства ДНК выбрано по той

причине, что штаммы, родственные на таком уровне и выше, обычно оказываются сходными и фенотипически по тем признакам, которые традиционно используются для идентификации на уровне вида.

Это генотипическое определение вида базируется на большом количестве эмпирических сведений, включая данные молекулярной ДНК-ДНК гибридизации и другие характеристики. Назначенный в соответствии с принципом приоритета типовой штамм вида служит в качестве носителя названия вида и эталонного экземпляра. Кроме того, Специальным комитетом по согласованию подходов к бактериальной систематике рекомендовано, чтобы фенотипические и хемотаксономические признаки согласовались с этим определением [Wayne et al., 1987]. Следует особо отметить, что группам штаммов геномовидов, которые очерчены посредством количественных значений ДНК-ДНК гибридизации как отдельные виды, но которые невозможно различить по фенотипическим характеристикам, нельзя присваивать название до тех пор, пока такие характеристики не будут найдены [Stackebrandt et al., 2002].

Основным условием, необходимым для отнесения организма к одному таксону, является их монофилетическое происхождение. Для подтверждения того, что представители нового таксона принадлежат к одной монофилетической линии, т.е. имеют общую эволюционную историю, традиционно используют филогенетические построения, основанные на анализе последовательностей генов 16S рРНК, а также других фрагментов ДНК, в частности конститутивных генов (“housekeeping genes”).

Третий критерий, применяемый к виртуальным видам (филотипам), – это уровень сходства последовательности 16S рРНК на текущий момент, уточнённое значение внутривидовой идентичности 16S рРНК 98,7–99,0 % (обновлённое значение “золотого стандарта”), предложенное в 2006 г. и подтверждённое в 2014 г. в результате широкомасштабных биоинформатических исследований с использованием около 7000 бактериальных геномов [Stackebrandt, Ebers, 2006; Kim et al., 2014; http://old.ezbiocloud.net/eztaxon/taxonomic_group]. Это означает, что штаммы с уровнем сходства генов 16S рРНК менее чем 98,7 %, следует

рика Коэна [Cohan, 2002]. Автор делает акцент на виде как экотипе. При этом современные бактериальные виды на самом деле соответствуют родам, внутри которых существует большое разнообразие экотипов или видов. Основаниями для такого утверждения являются две гипотезы – MLST (Multi-Locus Sequence Typing – типирование штаммов по набору генных локусов) и “Star Clade Approach” (“Гипотеза звёздчатого вида”). Суть обеих гипотез сводится к сравнению геномов разных штаммов. Однако это не механическое выявление сходства между организмами. Каждой группе организмов с одинаковым геномом соответствует своя экологическая ниша. Другими словами, каждый кластер организмов с идентичными нуклеотидными последовательностями (sequence cluster) является экотипом.

Использование метода мультилокусного типирования последовательностей (MLST) – это первый этап в определении границ вида. Методика заключается в секвенировании нескольких (5–10) консервативных генов с целью обнаружения аллельных вариантов (т.е. вариабельных локусов генов, кодирующих белки основного метаболизма, “housekeeping” proteins) и построения аллельного профиля исследуемого штамма. При полном совпадении последовательностей пяти и более локусов штаммы объединяют в один комплекс (clonal complex). Далее на основании “Гипотезы звёздчатого вида” выясняется родословная данного комплекса, в первом приближении приравняваемого к экотипу.

Каждый экотип представляется совокупностью клонов (при этом каждый клон является мутантом исходного родительского клона), произошедших от одного анцестора и занимающих одну экологическую нишу [Cohan, Perry, 2007]. Путём математического моделирования процесса эволюции данного экотипа по скоростям рекомбинации и мутации тех же семи локусов внутри него определяется количество анцесторов. Их должно быть не более одного. Если в процессе эволюции экотипа обнаруживается более одного анцестора, следовательно, необходимо расчленить этот экотип на несколько. Конечным подтверждением объективного определения экотипов является изучение их экологии. Однако такое определение границ вида (экотипа) возможно только

В практическом плане она применима в отношении тех организмов, для которых известны палеонтологические данные. Поэтому в отношении прокариот она имеет небольшую практическую ценность. Косвенные признаки, свидетельствующие о родстве микроорганизмов, такие как последовательности нуклеотидов в ДНК и РНК, общая гомология ДНК и др., не позволяют с уверенностью говорить об этом. Во-первых, существуют практические трудности с полным секвенированием геномов всех микроорганизмов, во-вторых, горизонтальный перенос генов препятствует однозначной интерпретации полученных результатов.

3. Полигенетическая концепция вида (Polygenetic Species Concept, PSC). Имеет две разновидности – монофилетическую и диагностическую. В рамках монофилетической концепции виды – это мельчайшие группы организмов, имеющие одного общего предка и определённые, по крайней мере, по одной аутапоморфии. Аутапоморфные свойства (autoapomorphic character) – это гомологичные свойства, эксклюзивные для группы организмов (таксона), встречающиеся у всех членов этой группы, которые появились у самого первого общего предка данного таксона. Сложность заключается в поиске таких аутапоморфных признаков. Наиболее подходящими кандидатами являются последовательности нуклеотидов в ДНК, отвечающие требованиям гомологичности (одинаковое происхождение в разных таксонах), уникальности для каждого таксона, универсальности внутри этого таксона и отсутствия влияния горизонтального переноса генов. В отношении бактерий это трудновыполнимая задача.

В рамках диагностической концепции вид – это мельчайший диагностируемый кластер организмов, для которого известны анcestor и дальнейшая связь поколений. По сути, эта концепция совпадает с фенетической концепцией вида, только дополненной теоретическим обоснованием выделения видов методами полифазной таксономии. При определении сходства между организмами по множеству признаков *a priori* определяется и их родство. Важно ещё раз отметить, что в данном случае необходимо совпадение границ видов, определённых разными методами.

Особый взгляд на проблему бактериального вида обнаруживается в исследованиях американского исследователя Фреде-

относить к разным видам. Очевидно, видообразование в этих случаях должно соответствовать иным молекулярно-генетическим характеристикам. С большой степенью вероятности оно зависит от горизонтального переноса генов.

Указанные пороговые значения сходства имеют определённые исключения. Так, ген 16S рРНК проявляет высокую степень консервативности у представителей некоторых таксонов, принадлежащих, например, к видам рода *Brucella* и видам класса *Actinobacteria*, которые не различаются более чем на 1 и 2 % соответственно. Большинство филогенетически близких видов рода *Rickettsia* имеют значения ДНК-ДНК гибридизации $\leq 70\%$, что затрудняет определение таксономического статуса изолятов [Ramasamy et al., 2014].

В 2001 г. была предложена новая фило-фенетическая видовая концепция (Philo-phenetic Species Concept), которая возникла в рамках полифазного подхода. Суть концепции сводится к анализу большого набора геномных и фенотипических признаков [Rosselló-Móra, Amann, 2001]. Преимуществом концепции является то, что в данном случае происходит анализ не одного признака, а комплекса признаков. Как неоднократно отмечалось выше, неоднозначность определения границ вида была связана с выбором в качестве маркера одного-единственного признака. При этом по другим признакам виды могли часто не совпадать друг с другом. При использовании большого количества признаков для анализа вероятность определения действительного сходства между организмами значительно увеличивается.

Данная концепция лишена недостатков прежних концепций, которые опирались на данные морфологии, биохимии или физиологии микроорганизмов – нестабильные признаки, зависящие от условий культивирования и хранения, а также особенностей выбранного для анализа штамма. В отличие от геносистематики, принципы которой применялись для определения видов бактерий, фило-фенетическая концепция описывает не одни бактериальные геномы, а организмы в целом. В этом случае виды представляют собой совокупности организмов с общим геномным пулом.

Другими словами, под бактериальным видом следует понимать монофилетическую группу штаммов (включая природные

изоляты, коллекционные штаммы, поддерживаемые *ex situ* (в лаборатории) в течение длительного времени, а также их варианты, т. е. штаммы, не полностью идентичные родительским) с высокой степенью сходства геномных и фенотипических характеристик и значительно отличающуюся от других подобных групп.

Использование для определения границ видов геномных маркеров (“молекулярных ископаемых”), в частности рРНК, позволяет оценить не только сходство, но и родство между организмами. Именно родственные связи между организмами позволяют виду существовать во времени и пространстве. Родство означает существование единого генного пула у организмов одного вида, что является, во-первых, сущностью вида, во-вторых, результатом микроэволюционного процесса. Поэтому использование “молекулярных ископаемых” позволяет выделить реальные таксоны, а не просто группы организмов с высоким процентом сходства.

Предложенная фило-фенетическая видовая концепция имеет сугубо прагматический, прикладной характер (“*истинность знания определяется его практическими последствиями*”). Концепция позволяет систематикам предварительно группировать микроорганизмы в виды по степени сходства, что весьма облегчает в дальнейшем процедуру их идентификации. Однако эта концепция не позволяет уверенно говорить о том, что выделенные виды объективно существуют, что они сформировались естественным путём, а не в результате механического объединения организмов в одну группу по принципу сходства.

Использование геномных маркеров, казалось бы, решает эту проблему. Однако такой филогенетический маркер, как 16S рРНК, не всегда коррелирует с другими геномными признаками. В действительности 16S рРНК отражает скорость эволюции в микробном мире, но не на видовом уровне, где значительное вмешательство в изменение последовательностей нуклеотидов вносят рекомбинационные процессы – трансформация, трансдукция, конъюгация.

Необходимо отметить, что фило-фенетическая концепция прокариотного вида распространяется лишь на культивируемые организмы. Однако сравнение результатов определения микробного разнообразия генетическими и культуральными методами

свидетельствует о том, что организмы, выделенные в чистую культуру, в природных экосистемах немногочисленны [Заварзин, Колотилова, 2001].

Таким образом, ведущим критерием в определении вида у прокариотов является комплекс фенотипических (совокупность признаков, составляющих фенотип, при этом морфология занимает далеко не первое место при определении вида) и генотипических (инфраструктурные особенности генома) данных. В связи с этим бактериальный вид оказывается группой изолятов, в которой устойчивая генерация генетического разнообразия приводит к клонам, характеризующимся определённой степенью фенотипической согласованности, значительной степенью ДНК-ДНК гибридизации и высоким уровнем подобия последовательностей генов 16S рРНК.

Результаты сравнительного анализа основных видовых концепций бактериального и биологического видов (из более чем 20 известных), выполненного с целью определения возможной универсальной видовой концепции для классификации всех живых организмов, приводятся в работе [Rosselló-Móra, Amann, 2001]:

1. Фенетическая или политететическая концепция биологического вида (Phenetic or Polythetic Species Concept, PhSC). В рамках данной концепции виды формируются по степени сходства между организмами, которое определяется путём статистического анализа большого количества признаков. Данная концепция удовлетворяет требованиям универсальности и практической значимости. По отношению к фило-фенетической концепции бактериального вида эта концепция носит чисто эмпирический, практический характер. В её основе нет никакой биологической теории. Обнаруживаемое сходство между организмами и их группирование в таксоны объективно, но не имеет под собой теоретического обоснования или, другими словами, не отвечает на вопросы – почему существуют виды, как они образуются, почему организмы группируются в виды именно так, а не иначе и др.

2. Эволюционная концепция вида (Evolutionary Species Concept, ESC). Данная концепция теоретически обоснована, согласно ей виды определяются как устойчивые ряды поколений.

2. Клетки прокариотов без тканевой дифференциации. Если у эукариотов дифференциация идёт на клеточном и чаще надклеточном (ткани, органы) уровне, то у прокариотов – на субклеточном уровне. Прокариоты имеют большое разнообразие формы и очень малые размеры – от 0,1 до 10 мкм: по диаметру в 10 раз, по объёму – в 1000 раз меньше эукариотов. Подавляющая масса бактерий имеет линейные размеры от 0,3 до 5,0 мкм. Следствием этого является, во-первых, огромная относительная поверхность и, во-вторых, высокий показатель “давления среды”. В таких условиях мембрана прокариотной клетки должна обладать особыми свойствами, обеспечивающими, с одной стороны, эффективную изоляцию клеточного содержимого от этого “давления”, с другой – быстрое и эффективное проведение сигналов, отражающих изменения в окружающей среде. Эукариоты крупнее, обычно от 10–60 до 100 мкм. Прокариоты – организмы, в большинстве случаев представляющие собой одну клетку. Эукариоты главным образом многоклеточные (например, человеческий организм состоит примерно из 10^{15} клеток), с чёткой дифференциацией клеток.

3. У прокариотов простое строение клеток, в отличие от клеток животных и растений. Прокариотная клетка имеет одну внутреннюю полость, образуемую элементарной клеточной (цитоплазматической) мембраной. Для прокариотов характерна слабо выраженная дифференциация клеточной инфраструктуры, которая представлена нуклеоидом, мезосомами (впячиваниями внутрицитоплазматической мембраны, в которых адсорбированы ферменты, ведущие процесс дыхания), мелкими рибосомами, цитоплазматической мембраной, клеточной стенкой; у цианобактерий тилакоидами, содержащими фотосинтезируемый аппарат и по своей функции соответствующими пластидам эукариотов. Такие специализированные образования, как внутренние мембраны, аппарат Гольджи, хлоропласты или отграниченные мембраной органеллы типа митохондрий отсутствуют. Естественно, что при этом мембранные системы прокариотов оказываются под значительно большей “функциональной нагрузкой”. Процесс фотосинтеза у автотрофных прокариотов протекает на впячиваниях наружной цитоплазматической мембраны, где адсорбируются пигменты, участвующие в процессе фотосинтеза. Клеточная

предложен новый подход, основанный на сравнении 120 широко распространённых белковых последовательностей, представленных в геномах в единичной копии [Parks et al., 2018].

Современное представление о классификации отражает лучшие знания нашего времени. Это утверждение было верно и для прошлого, когда были доступны только данные морфологических и биохимических анализов. Перспектива бактериальной таксономии заключается в том, что технологический прогресс будет доминировать и существенно влиять на методологию (как это было всегда). Всё больше полногеномных последовательностей станет доступно, всё больше новых (культивируемых или некультивируемых) бактерий будет обнаружено, повысится степень автоматизации и непрерывно будут пополняться соответствующие базы данных.

Будущее усовершенствование самого понятия прокариотного вида будет основываться, возможно, на полногеномных последовательностях, общих ключевых генах или определённом типе генов, таких как обязательные или информационные гены, или на сбалансированном подборе генов, включённых в адекватные анализы типа MLSA. Это задача высокой сложности – транслировать такую информацию в прагматичные системы классификации и идентификации и оценивать тщательно разработанные классификации.

В настоящее время экспертами Международного комитета по систематике прокариотов (International Committee on Systematics of Prokaryotes, ICSP) разработаны минимальные стандарты, рекомендованные для описания новых видов прокариотов [Tindall et al., 2010; Rainey, Oren, 2011; Trujillo, Oren, 2018].

Необходимо помнить: описание видов должно основываться на более чем одном штамме [Christensen et al., 2001]. При этом типовой вид рода является обязательным ориентиром, с которым должен сравниваться новый вид, если он считается членом того же рода. Виды, помещённые в новый род, должны быть сравнены с типовыми видами наиболее тесно связанных таксонов. В случае сравнения между семействами должны быть включены типовые роды и соответственно, типовые штаммы типовых видов типовых родов [Tindall et al., 2010]. Обязательным требованием для описания новых видов или подвидов является депонирование типового штамма, по крайней мере, в двух разных коллекциях

культур, в странах, преимущественно расположенных в разных частях мира [De Smet et al., 2013], а также каталогизация и хранение последовательностей генов 16S рРНК типовых штаммов в международных базах данных (International Nucleotide Sequence Database Collaboration, INSDC, <http://www.insdc.org/>), в том числе GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и др.

Обобщая приведённые сведения, следует ещё раз подчеркнуть, что решение проблемы бактериального вида невозможно в рамках одной лишь прокариотологии. Имея дело с разными группами организмов, систематики сталкиваются с разнообразием критериев вида. При этом на практике ни один из этих критериев не может быть универсальным для всех организмов. Например, использование в качестве критерия наличия общего предка применимо только по отношению к тем организмам, для которых получены какие-либо палеонтологические данные, что автоматически исключает из анализа прокариотов. Использование критерия репродуктивной изоляции также невозможно по отношению к организмам, не имеющим половой дифференциации. Принимая тезис о том, что виды прокариотов и эукариотов не одно и то же, исследователи сталкиваются с логическими трудностями определения понятия вид.

Проблема бактериального вида – яркий пример отношения общего и частного. Бактериальный вид представляет собой частный случай такого явления как биологический вид. Из этого тезиса логически вытекает, что бактерии образуют объективно существующие виды и бактериальные виды обладают всеми атрибутами и сущностью биологического вида. Отношения общего и частного не являются односторонними. Частное не простое слепок с общего, оно обладает своими специфическими чертами. Можно сказать, что частное отражает разнообразие проявлений общего. Поэтому, с одной стороны, бактериальный вид не отличается от любого другого вида, с другой стороны, – он уникален. В качестве особенностей прокариотных видов можно отметить слабую изолированность их генома от чужеродных генов и реализацию особых механизмов такой изоляции, не связанных с половым размножением.

На настоящий момент решение проблемы бактериального вида может быть следующим: явление вида универсально

Окончание табл. 2

Свойства	Прокариоты	Эукариоты
Число белков в субъединицах рибосом	21 или 21–28 (30S); 34 или 34–43 (50S)	30 (40S); 45–60 (60S)
Размеры рРНК	16S, 23S, 5S	18S, 28S, 5,8S, 5S
РНК-полимеразы	Один класс (4 или 8–10 субъединиц)	Три класса (10–15 субъединиц)
мРНК	Нестабильная, короткий 3'-поли А-хвост	Стабильная, кэпированная, длинный 3'-поли А-хвост
Капсула	Имеется	Отсутствует
Клеточная стенка	Содержат муреин или псевдомуреин, белковый саккулус, S-слой или гетерополисахаридный слой	Пептидогликанов нет. (Лигно) целлюлоза, хитозан
Митохондрии	Отсутствуют	Имеются
Жгуты	Состоит из одной или нескольких спирально закрученных фибрилл. Нити жгутиков состоят из белка флагеллина	Состоит из 20 фибрилл, собранных в группы “2х9+2”
Тип питания	Большое разнообразие	Аэробная органо-гетеротрофия, оксигенный фотосинтез у некоторых
Фиксация молекулярного азота	Характерна для азототрофов	Молекулярный атмосферный азот не ассимилируют
Поступление пищи	Осммотрофия	Осммотрофное (сапротрофное) или зоотрофное (фаготрофное)

Продолжение табл. 2

Свойства	Прокариоты	Эукариоты
Половой процесс	Отсутствует	Обычен, с обменом хромосомами
Горизонтальный транспорт генетического материала	Присутствует	Отсутствует
Истинная многоклеточность	Многоклеточные формы отсутствуют	Дифференцировка клеток и объединение их в комплексы разной сложности – ткани и органы
Цитоплазматическая ДНК	Плазмиды и эписомы	Митохондрии, хлоропласты, центриоли, кинетосомы (базальные гранулы тела), аппарат Гольджи
Наличие стероидов в клеточной мембране	Не содержит стероиды	Содержит стероиды
Структура липидов	Содержат диацилглицериновые диэстерные или изопреноидные глицериндиэфирные, или глицеринтетраэфирные липиды в мембранах	Содержат жирные кислоты в ацилдиэстерных мембранных липидах
Дыхательная система	Является частью мембран или мезосом	Расположена в митохондриях
Размеры рибосом	70S	80S (в цитоплазме) и 70S (в органеллах)
Движение цитоплазмы	Отсутствует	Обнаруживается

для всех групп организмов, и сущность его заключается в сохранении общего генного пула в группе организмов. Следствием общего генофонда являются высокая степень сходства и родство между организмами одного вида. Как любая сущность, сущность вида противоречива. Мутации, горизонтальный перенос генов приводят к нарушению целостности генофонда. Известен ряд механизмов, препятствующих этому разрушению, – репродуктивная изоляция, системы репарации ДНК и др. Большое значение для жизнедеятельности бактерий, образования и сохранения бактериальных таксонов имеет горизонтальный перенос генов, который происходит даже между организмами, обнаруживающими слабое фенетическое сходство. Однако этот процесс не хаотичен, и разные микроорганизмы обладают разной способностью к обмену генами друг с другом. Очевидно, способность к горизонтальному переносу генов в будущем может стать критерием бактериального вида аналогично биологическому критерию (способности скрещиваться и давать плодовитое потомство) эукариотных видов [Coenye et al., 2005]. Кроме того, горизонтальный перенос генов, как сравнительно редкое событие, не может значительно отразиться на структуре генома вида. Поэтому при определении границ видов по полным последовательностям ДНК, а также при ДНК-ДНК гибридизации им можно пренебречь [Coenye et al., 2005].

Таким образом, прокариотные организмы образуют виды. Однако в силу биологических особенностей прокариотов и методических трудностей при их идентификации, границы видов у прокариотов оказываются намного шире, чем у высших организмов. По мнению Э. Штакебрандта с соавторами [Stackebrandt et al., 2002], «основа любой систематики – эволюция, а процесс построения систематики периодически требует согласования с современными научными открытиями. Экспериментальные и теоретические данные свидетельствуют о том, что всё разнообразие прокариотных организмов можно представить себе единым континуумом генов с дискретными центрами, напоминающим бугорчатое поле. Все механизмы формирования таких дискретных концентратов генов можно разделить на две категории. Первая – это репродуктивная изоляция, контроль за межвидовыми и внутривидовыми рекомбинациями за счёт работы системы репарации, вторая категория – механизмы,

связанные с влиянием условий окружающей среды на бактериальные популяции”.

Казалось бы, в теоретическом плане проблема бактериального вида уже давно решена в рамках проблемы биологического вида. Бактерии, как любые организмы, образуют виды, которые реально существуют в природе. Определена сущность вида, известны его атрибуты. Тем не менее всё ещё остаётся много неясных вопросов, а именно:

1. С помощью каких методов всё-таки можно определить границы реально существующих прокариотных видов? В современной микробиологии для этого применяются методы полифазной таксономии, включающие изучение генотипических и фенотипических маркеров [Vandamme et al., 1996]. Безусловно, это требует трудоёмких и продолжительных исследований. Кроме того, между разными признаками не всегда обнаруживается чёткая корреляция. По-видимому, видовые маркеры должны не только выполнять описательную функцию, позволяя, например, сравнивать отдельные нуклеотидные или аминокислотные последовательности, но и отражать сущность вида, т.е. механизмы видообразования и сохранения видов.

2. Какова роль горизонтального переноса генов в образовании видов и их поддержании? Казалось бы, способность прокариотов к генным рекомбинациям с далеко неродственными организмами вообще не позволяет чётко определять границы видов и наводит на гиперболическую мысль о существовании у них одного-единственного вида. Однако горизонтальный перенос генов не столь уж частое событие, а вероятность его реализации в фенотипе можно приравнять к таковой отдельных мутаций. Как отмечалось выше, способность прокариотов к горизонтальному переносу генов может использоваться даже в качестве видового маркера. В связи с этим уместны слова известного британского эволюциониста Томаса Кавалир-Смита [Cavalier-Smith, 2002]: “Приверженцы латерального переноса генов сейчас совершают аналогичную ошибку, переоценивая его частоту и недооценивая большую частоту потерь генов”. Учёный приводит ряд данных, свидетельствующих о несомненном влиянии на таксообразование у бактерий процесса потери целых генов (например, в геномах *E. coli* и *Salmonella*), а не межтаксонных рекомбинаций генов [Cavalier-Smith, 2002].

Таблица 2. Сравнительная характеристика прокариотной и кариотной клетки

Свойства	Прокариоты	Эукариоты
Ядро и организация ядерной ДНК	Нуклеоид. ДНК не отделена от цитоплазмы мембраной, находится в цитоплазме и не связана с гистонами	Истинное ядро с двойной мембранной оболочкой и внутренней системой элементарных мембран. Изолировано от цитоплазмы. ДНК связана с гистонами. Митоз. Мейоз (редукционное деление)
Размер	Обычно меньше 5 мкм	Обычно больше 5 мкм
Число, состав и набор хромосом	Одна кольцевая (или линейная) хромосома, состоящая из ДНК. Гаплоидный набор	Несколько сложных хромосом, состоящих из ДНК и белка. Гаплоидный и диплоидный наборы
Компактизация генома	Через множественное “перекручивание”	Через разноуровневую спирализацию при участии гистонов и конденсинов
Начальная область репликации	Единственная	Множественные
Разделение ДНК	Через сопряжённый с ростом клеточной стенки процесс	С помощью митотического микротрубочкового аппарата
Плазмиды	Присутствуют	Нет достоверных сведений

возможность разобраться и в планах строения одноклеточных организмов. Пришло осознание того, что реальные различия между прокариотами и эукариотами гораздо глубже, чем различия между растениями и животными. Если на первых этапах число дифференцирующих признаков не превышало 10–12, то по мере совершенствования исследовательской техники число их постоянно росло. Например, в 1987 г. британский биолог Томас Кавалир-Смит (Cavalier-Smith T., профессор эволюционной биологии Оксфордского университета) даёт перечень уже из 48 признаков, *“никогда не обнаруживаемых у эукариотов”*.

В ходе изучения биологической специфичности про- и эукариотов были выявлены как уникальные для каждого из типов признаки, свидетельствующие о независимости последующей эволюции, так и универсальные, свидетельствующие об общности происхождения, от единого анcestора (табл. 2).

Основные признаки, отличающие прокариотную клетку от эукариотной, следующие:

1. Клетки прокариотов (безъядерные) не имеют оформленного ядра и типичного хромосомного аппарата. Вместо клеточного ядра имеется его эквивалент нуклеоид, лишённый оболочки и состоящий из единственной многократно закрученной кольцевой молекулы ДНК в комплексе с немногими молекулами белка, которую называют примитивной хромосомой. ДНК компактно располагается в цитоплазме в центральной области клетки, состоит из значительного числа генов и содержит всю генетическую информацию, необходимую для размножения прокариотной клетки. На ультратонких срезах хромосома прокариотов видна в виде клубка нитей в светлом пространстве (нуклеоида). У эукариотов (истинно ядерные клетки) ДНК организована в хромосоме и окружена ядерной мембраной. Хромосомы эукариотов, которых может быть много на клетку, отделены от цитоплазмы ядерной мембраной, образуя ядро. Помимо хромосомы, у прокариотов могут присутствовать небольшие кольцевые молекулы ДНК, называемые плазмидами. Плазмиды сходны с внеядерными ДНК эукариотов и не являются обязательными для генома данного вида прокариотов.

3. Наконец, наиболее сложные вопросы, касающиеся видообразования прокариотов. Происходит ли оно сейчас? Происходило ли оно раньше? Когда и как образовались современные виды прокариотов? С одной стороны, мы наблюдаем невероятную скорость эволюции бактериальных штаммов, бактериальных сообществ, их невероятную приспособляемость, изменчивость. С другой стороны, у нас нет однозначно интерпретируемых фактов: палеонтологических, сравнительно-анатомических и эмбриологических данных, которые оказались столь эффективны при восстановлении филогении высших организмов. Микробиологи имеют дело лишь с фенотипами и генотипами и могут только строить догадки о филогении прокариотов. Единственным палеонтологическим материалом являются строматолиты, которые свидетельствуют об отсутствии у цианобактерий эволюции. Представителями древних биогеоценозов можно считать и архей, которые обитают в неизменяющихся на протяжении сотен миллионов лет условиях. По Г.А. Заварзину [2003], сложно оценивать процессы таксообразования у прокариотных организмов, с высокой степенью достоверности можно изучать лишь эволюцию микробных сообществ. Это экологический подход, рассматривающий прокариотные организмы в системе с окружающей средой. Кроме того, именно между экологической нишей и генетическими признаками обнаружена корреляция при определении видовых границ бактерий.

И последующее затруднение в анализе проблемы видообразования – это значение некультивируемых форм. Какие объективные данные не были бы получены о микроорганизмах, выделенных из природной среды в виде чистых или смешанных лабораторных культур, неизвестно, велика ли доля этих микроорганизмов от общего их биоразнообразия.

В связи с вышесказанным предоставляется возможность цитировать очевидный тезис Хилэра Беллока о том, что *“микроорганизмы так малы, что нам, очевидно, никогда не понять их до конца. Давайте не сомневаться в том, в чём никто не уверен”*.

**Лекция 7. ФАКТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРОКАРИОТНОЙ И ЭУКАРИОТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ
ОРГАНИЗАЦИИ. ЭНДОСИМБИОТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ.
ПРОБЛЕМА ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЭУКАРИОТОВ**

После открытия в конце XVII в. (Антони ван Левенгук, 1676 г., анималькули Левенгука) бактерии очень долгое время (при отсутствии информации о строении и физиологии бактерий) находились вне мегасистемы (мегатаксонов, т.е. всех надвидовых таксонов, начиная от рода и выше – семейств, порядков, классов, царств, империй). Проблема мегатаксонов находится в соответствии с уровнем знаний об эволюции и происхождении живых существ, отражает состояние изученности как общего характера эволюции (последовательность развития), так и филогении (последовательность происхождения) органического мира.

До конца XIX и начала XX в. проблема макротаксономии находилась в монопольном владении зоологов, ботаников, палеонтологов. Начиная со второй половины XX в. ею всецело овладели микробиологи, генетики, цитологи и специалисты по молекулярной биологии. Место бактерий в биологической мегасистеме окончательно определилось только в конце 1970-х гг. XX в.

До этого времени бактерии либо находились вне мегасистемы, либо не имели в ней самостоятельного статуса. В результате их относили к сфере Неопознаваемого (“*Chaos*” Карла Линнея, который хорошо был знаком с работами Левенгука, однако не нашёл у анималькулей морфологических признаков, достаточных для того, чтобы их классифицировать в самостоятельную группу животных) или к переходному миру от неживого к живым организмам, или на разных основаниях объединяли с животными, растениями (классификация 1872 г. Фердинанда Кона) или грибами.

Первой по времени классификацией живых организмов была схема из двух царств – *Plantae* (Растения) и *Animalia* (Животные), идущая ещё от Аристотеля (Aristotelus, 384–322 гг. до н.э.) и просуществовавшая до середины XIX в. Все открываемые (после открытия бактерий Левенгуком) микроорганизмы рассматривали как примитивные растения или примитивные животные на основании двух легко определяемых различий между

ческой мембране) совместимость процессов дыхания и фотосинтеза; (4) своеобразие локомоторных органов; (5) своеобразие клеточного деления; (6) состав и структура клеточной стенки. Все эти и другие признаки, свидетельствующие о том, что “...*бактерии и сине-зелёные водоросли имеют клеточную организацию, определяемую как прокариотная, которая больше не встречается в живом мире*”, и составили фактическое обоснование концепции прокариотной и эукариотной клеточной организации.

Таким образом, Стениер впервые объяснил специфику строения бактерий. Одновременно с этим он определил место бактерий в таксономической иерархии, предложив рассматривать термины “прокариоты” и “бактерии” в качестве синонимов. Он подразделил клеточные существа на два царства: царство ядерных организмов (regnum *Eucaryotae*) и царство прокариотов – бактерий (regnum *Procaryotae*). В рамках дихотомической мегасистемы бактерии стали рассматриваться как таксон *Procaryotae*.

Стениер был вынужден признать, что большинство характеристик бактерий носит негативный характер – отсутствие ядра, полового процесса (хотя широко используют механизмы латерального генетического переноса, в том числе обладают потенциальным промискуитетом), секреции с помощью аппарата Гольджи, вакуолей, фагоцитоза, пиноцитоза, амёбоидного движения и тока цитоплазмы, цитоплазматических эндосимбионтов (хлоропластов и митохондрий) и др. Тем не менее он не говорил о “примитивности” бактериальной клетки. Напротив, подчёркивал, что прокариоты – потенциальные космополиты (англ. “*everything is everywhere*”), потенциально способные к экологической адаптации во всём диапазоне существования органической жизни; что прокариоты с эукариотами принадлежат к разным типам клеточной организации; что у прокариотов имеются структуры и функции, отсутствующие у эукариотов (белковые мембраны бактериальных включений, функциональные включения, хемосинтез, diaзотрофия и т.д.).

Итак, к началу 70-х гг. отличие прокариотной клетки от эукариотной в главных чертах было установлено. Этому способствовало появление новых методов углублённого исследования структуры клетки. Стремительное развитие цитологии дало воз-

похожи на микромицетов; третьи – на дрожжи; четвертые – цианобактерии – на водоросли; пятые – крупные подвижные ба­циллы – на ресничные инфузории и т.д.

Поэтому на разных этапах развития микробиологии бакте­рий поочередно относили к царствам *Protista*, *Fungi*, *Plantae* и *Animalia*. При этом исследователи не находили ответа на во­прос “Что есть бактерия? (лат. *Quid est bacterium?*)” и не могли чётко объяснить, чем бактерии отличаются, например, от инфу­зорий или дрожжей-сахаромицетов.

На практике в микробиологии господствовал такой подход, когда группировка бактерий по сходству подразумевала род­ство. Было предложено множество “естественных” систем на ос­нове фенотипического сходства (например, систематика истин­ных бактерий и актиномицетов Н.А. Красильникова, систематика спорообразующих дрожжей В.И. Кудрявцева, основанные на сходстве морфолого-физиологических свойств, филогенети­ческие связи которых лишь предположительны), многие из кото­рых не выдержали проверки временем.

Развитие молекулярной биологии позволило обратиться к прямому сравнительному изучению гено­типа (генома) бакте­рий и открыло ряд новых подходов к характеристике организмов: определение молярного процента (мол. %) в ДНК, ДНК-ДНК ги­бридизация, изучение родства на уровне трансляции генов и т.д. Использование методов анализа семантид существенным обра­зом повлияло на развитие эволюционных представлений в мик­робиологии. Но оказалось, что эти методы имеют свои ограниче­ния, не позволяющие сравнивать организмы, находящиеся в от­далённом родстве.

Впервые фактическое обоснование концепции прокарио­тов и эукариотов было предложено Стениером и ван Нилем в 1962 г. в статье под названием “Концепция бактериума” [Stanier, van Niel, 1962]. Эта работа построена на сравнении 2 ти­пов клеточной организации с целью демонстрации их сходства и различий. По мнению авторов, особое внимание заслуживают: (1) уникальное функционально-организационное разнообразие прокариотов по сравнению с эукариотами; (2) особенности стро­ения их генетического аппарата; (3) локальная (в цитоплазматиче­

скими – способности или неспособности к активному движению и фотосинтезу. Так, фотосинтезирующие водоросли относили к растениям. Грибы также были отнесены к растениям ввиду их неподвижности. Подвижные микроскопические организмы – бактерии и простейшие – относили к животным. С накоплением информации о свойствах микроорганизмов становилось всё яс­нее, что в системе живого мира они могут претендовать на от­дельное место.

Однако аристотелево деление “растения – животные” ока­залось психологически очень устойчивым и просуществовало в неизменённом виде 2 тыс. лет. Только во второй половине XIX в. микроорганизмы (грибы, простейшие, бактерии) были от­несены к различным таксонам высокого ранга.

Так, в 1860 г. британский натуралист Джон Хогг (Hogg J., 1800–1869) предложил выделить одноклеточные в самостоятель­ное царство *Protoctista* (*Primigenum*), т.е. низшие (примитивные) организмы, а в 1866 г. молодой немецкий ботаник, биолог-эволю­ционист Эрнст Геккель (Haeckel E., 1834–1919) в своей публика­ции “Всеобщая морфология организмов” (нем. “Generelle Mor­phologie der Organismen”) выделил все микроорганизмы – про­стейшие, водоросли, грибы и бактерии – в одно царство *Protista* (протисты, первосущества). Общий отличительный признак про­тистов – простота биологической организации, отсутствие внут­ренней дифференциации на различные типы клеток и ткани, что характерно для растений и животных.

Выделение микроорганизмов в самостоятельное царство означало утверждение идеи их биологической индивидуальности и их самостоятельного исторического развития, независимого от растений и животных.

Дальнейшее изучение геккелевских протистов с использо­ванием развивающихся методов световой (позднее электронной) микроскопии и цитохимии выявило гетерогенность (неоднород­ность) этой группы, существенные различия в строении клеток микроорганизмов.

На рубеже XIX–XX вв. окончательно стало ясно, что бы­вают клетки с ядром и клетки без ядра. То, что “ядерный” кри­терий исключительно важен для мегасистематики, первым по­нял немецкий ботаник и бактериолог Фердинанд Кон (Cohn F.,

1828–1898). Ещё в 1870-е гг. он отнёс всех микроорганизмов, размножающихся бинарным делением, к отделу “*Schizophyta*” (от греч. “schizo” (“схизо”) – раскалывать пополам). Ведущим признаком отдела *Schizophyta*, помимо размножения бинарным делением, стало отсутствие ядра. Таким образом, Кон вплотную подошёл к идее о глобальной дихотомической классификации (формулировка её в 1937 г. принадлежит французскому протистологу Эдуарду Шаттону).

В 1904 г. Геккель, через 38 лет после выхода в свет его замечательного труда, дифференцирует в царстве *Protista* новое царство *Monera*, включив в него организмы “без ядра” и оценив их как “организмы, идентичные с первичной формой жизни или сходные с ней”. Этим периодом датируется возведение цитологического признака (тип клетки, тип клеточной организации) в ранг официального дифференцирующего макротаксономического дескриптора.

Постепенно становится ясным, что в мире живых организмов наиболее резкая грань проходит не между растениями и животными, а между организмами, клетки которых содержат ядра, и теми, которые их лишены. Особое внимание к принципиальным различиям в строении ядерного аппарата у разных представителей органического мира впервые привлёк французский учёный-протистолог Эдуард Шаттон (Chatton E., 1883–1947), давший в 1925 г. удачные термины – про- и эукариоты.

В соответствии с двумя выявленными типами клеточной организации – эукариотной (от греч. “эу” – истинный или настоящий, “карион” – зернышко или ядро) и прокариотной (где префикс “про” означает “до”) – протисты подразделяются на высшие и низшие.

К высшим протистам стали относить микроскопических животных (простейших, например, туфельку или эвглену), микроскопические водоросли (кроме сине-зелёных) и микроскопические грибы (плесени, дрожжи).

К низшим протистам относятся только две группы организмов – бактерии и сине-зелёные водоросли. Последние обладают хлорофиллом и продуцируют кислород в процессе фотосинтеза, подобно другим водорослям и высшим растениям, но в осталь-

ном у них гораздо больше общего с бактериями, чем с эукариотными организмами. Поэтому лучше пользоваться их альтернативным названием – цианобактерии, которое лучше отражает их природу. Общепринято мнение, что цианобактерии или более примитивные организмы, родственные или не родственные им, но имеющие сходный обмен, сыграли важную роль в создании кислорода нашей атмосферы.

Высшие протисты имеют ядерное строение клеток и являются эукариотами. Все низшие протисты имеют прокариотное строение и являются доядерными организмами или прокариотами.

В 1968 г. Гарольд Меррей (Murray R.G.E., 1868–1955) предложил все клеточные формы разделить на две группы по типу их клеточной организации: на царство *Prokaryotae*, куда вошли все организмы с прокариотным строением клетки, и царство *Eukaryotae*, куда вошли все высшие протисты, зеленые растения и животные.

Начавшееся в XIX в. формирование концепции прокариотно-эукариотной дихотомии (с греч. “dichotomia” – последовательное деление целого на две части) закончилось в 60-х гг. XX в. Такое медленное становление системы взглядов о прокариотной организации клеток в микробиологии, связанное с отсутствием в течение длительного времени приемлемой концепции “бактерия”, а также с довольно острой дискуссией по поводу возможности или невозможности построения филогенетической (естественной, эволюционной) системы микроорганизмов, Роджер Стениер (Stanier R.Y., основам микробиологии учился у К. ван Нилы) и Корнелис ван Ниль (van Niel C.B., ученик Бейеринка, Клейвера) назвали в 1962 г. “интеллектуальным скандалом (позором) бактериологии” (“...the abiding intellectual scandal of bacteriology”) [Stanier, van Niel, 1962].

Критерии (способ размножения, тип питания и др.), которые использовали предшественники Стениера, не позволяли рассматривать бактерий как самостоятельную группу живых организмов. Ситуация объективно усложнялась тем, что бактерии очень разнообразны по морфологии. Одни, например нитчатые актиномицеты, внешне напоминают мицелиальные грибы; другие – образующие окрашенные плодовые тела миксобактерии –

7. Некоторые белки этих органелл похожи по своей первичной структуре на аналогичные белки бактерий и не похожи на соответствующие белки цитоплазмы.

8. Хлоропласты, выделенные из клетки, могут некоторое время жить в воде самостоятельно. Механизмы фотосинтеза у цианобактерий и зелёных водорослей в значительной мере сходны.

При этом ДНК митохондрий и пластид, в отличие от ДНК большинства прокариотов, содержит интроны. В собственной ДНК митохондрий и хлоропластов закодирована только часть их белков, а остальные закодированы в ДНК ядра клетки. В ходе эволюции происходило “перетекание” части генетического материала из генома митохондрий и хлоропластов в ядерный геном. Этим объясняется тот факт, что ни хлоропласты, ни митохондрии не могут более существовать (размножаться) независимо.

Сегодня ещё не решён вопрос о происхождении ядерно-цитоплазматического компонента, захватившего протомитохондрии. Ни бактерии, ни археи не способны к фагоцитозу, питаясь исключительно осмотрфно. Молекулярно-биологические и биохимические исследования указывают на химерную архейно-бактериальную сущность ядерно-цитоплазматического компонента. Как произошло слияние организмов из двух доменов, также пока не ясно [Martin et al., 2015].

На сегодня известны организмы, содержащие внутри своих клеток другие клетки в качестве эндосимбионтов. Они, однако, не являются сохранившимися до наших дней первичными эукариотами, у которых симбионты ещё не интегрировались в единое целое и не потеряли своей индивидуальности. Тем не менее они убедительно подтверждают саму возможность симбиогенеза. Наиболее интересный с этой точки зрения организм – одноклеточный эукариот *Mixotricha paradoxa*. Для движения миксотриха использует более 250 тыс. бактерий *Treponema spiriochetes*, прикрепленных к поверхности её клетки. Митохондрии у этого организма вторично потеряны, однако внутри его клетки есть сферические аэробные бактерии, заменяющие эти органеллы. Крупные амёбы рода *Pelomyxa* также не содержат митохондрий и образуют симбиоз с аэробными бактериями, которые осуществляют окислительный метаболизм, т.е. берут на себя функции митохондрий. Хотя *Pelomyxa* не является подлинным промежуточным звеном

стенка бактерий содержит специфическое вещество – пептидогликан (муреин), обеспечивающий механическую прочность клеточной стенки и представляющий собой гетерополимер, состоящий из цепочек, в которых чередуются последовательно соединённые между собой пептидными мостиками остатки *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмуравовой кислоты. Способность синтезировать пептидогликан присуща только бактериальным клеткам. При этом степень толщины пептидогликана у грамположительных бактерий в несколько раз выше, чем у грамотрицательных. По результатам грамреакции, бактерии с высоким (около 90 %) содержанием пептидогликана имеют сине-фиолетовую окраску (грамположительные бактерии), все остальные, имеющие в клеточной стенке от 5 до 20 % пептидогликана, окрашиваются в розовый цвет (граммотрицательные бактерии).

4. Направленное движение цитоплазмы, характерное для большинства эукариотных клеток, у прокариотов не наблюдается. Прокариоты неподвижны или со жгутиками. Движение прокариотов осуществляется за счёт сокращения аксиальных нитей (скольжение) и с помощью полярных и перитрихальных жгутиков, отличающихся от таковых эукариотов. Каждый бактериальный жгутик состоит из одной молекулы белка флагеллина. Для обычно подвижных (что даёт возможность эффективно питаться) эукариотных клеток характерны жгутики со сложной (9+2 нити) структурой (жгутик имеет кольцо из 9 пар микротрубочек, которое окружает 2 дополнительные микротрубочки, расположенные в центре жгутика). Жгутики бактерий совершают быстрые вращательные движения и способствуют вращению клетки. Бактерии перемещаются в поле зрения в разных направлениях очень быстро для своих размеров (за одну секунду преодолевают расстояние, равное примерно 20 диаметрам самой бактериальной клетки), в отличие от броуновского движения – пассивного перемещения клеток в токе воды в одном направлении. При добавлении к препарату 0,5 %-ного водного раствора фенола собственное движение бактерий прекращается, броуновское – остаётся. Такое вращательное движение прокариотной клетки не характерно для эукариотов, и поэтому постоянное вращение бактериальных жгутиков представляет собой уникальное явление.

5. Прокариотам не свойственны мейоз и митоз. Основной способ размножения прокариотов – бесполой, его называют ещё вегетативным способом передачи генетической информации. Каждая клетка увеличивается в размерах и делится путём простого поперечного деления надвое (бинарное деление, путём амитоза). Лежащая в цитоплазме единственная кольцевая двуцепочечная молекула ДНК, длина которой превышает в 700 или 1000 раз длину самой клетки и несущая генетическую информацию, прикреплена в одной точке к внутренней поверхности плазматической мембраны. После того как ДНК удваивается, две идентичные кольцевые молекулы остаются соединёнными бок о бок с плазматической мембраной. Новая плазматическая мембрана и клеточная оболочка образуются между двумя точками прикрепления ДНК по мере деления клетки; в итоге мембрана впячивается между двумя молекулами ДНК, а каждая дочерняя клетка обеспечивается идентичной молекулой ДНК. Поскольку прокариоты полностью лишены полового процесса с образованием зиготы, у них отсутствует чередование ядерных фаз – диплоидных и гаплоидных. У эукариотов бесполое размножение происходит при помощи сложного процесса, называемого митозом; большинство же эукариотов размножаются половым путём – при помощи мейоза и последующего слипания половых клеток. Митоз позволяет производить генетически сходные эукариотные клетки, а мейоз увеличивает комбинативную изменчивость, что ускоряет процесс эволюции.

6. Организованный компактно прокариотный геном значительно меньше по размерам и количеству содержащейся в нём ДНК, по сравнению с эукариотным. Количественное содержание ДНК в прокариотах составляет $0,01 \times 10^{-6}$ мкг, в эукариотах – $6,0 \times 10^{-6}$ мкг. Геном прокариотов имеет довольно своеобразное формирование. По данным сравнительной кариологии, для “средней” бактерии, характеризующейся массой сухого вещества на клетку $2,5 \times 10^{-13}$ г ($1,5 \times 10^{11}$ Да), средняя масса содержащейся в клетке ДНК составляет $2,5 \times 10^9$ Да (1,5–2,0 % веса высушенной биомассы); среднее число нуклеотидов в ДНК – $8,6 \times 10^6$, длина их цепочки – 1100–1400 мкм. Средний структурный ген состоит из 1250 нуклеотидов ($4,0 \times 10^5$ Да). Из среднего общего

Пластиды, подобно митохондриям, имеют свои собственные прокариотные ДНК и рибосомы. По-видимому, хлоропласты произошли от фотосинтезирующих бактерий, поселившихся в своё время в гетеротрофных клетках протистов и превративших их в автотрофные водоросли.

В качестве доказательств эндосимбиотического происхождения этих органоидов приводятся следующие аргументы и биохимические данные:

1. Митохондрии и пластиды в клетке обладают определённой автономностью: они имеют собственную двуцепочечную ДНК, которая замкнута в кольцо, как у прокариотов, и могут самостоятельно передвигаться в пределах клетки.

2. Митохондрии и пластиды имеют две замкнутые мембраны, что является результатом захвата: внешняя сходна с мембранами фагоцитарной вакуоли, внутренняя соответствует собственной клеточной мембране бактерий. Биохимический состав наружной мембраны митохондрий и хлоропластов напоминает состав мембраны эукариотной клетки, тогда как внутренняя мембрана похожа на мембрану прокариотной клетки (они имеют сходный ферментный состав и молекулярную организацию).

3. Митохондрии и хлоропласты чувствительны к действию антибактериальных антибиотиков. Например, эритромицин или хлорамфеникол, подавляющие рост бактерий, подавляют также репликацию митохондрий в дрожжевых клетках; стрептомицин, ингибирующий синтез белка в бактериальных 70S-рибосомах, вызывает “выцветание” клеток у зелёных водорослей и высших растений, подавляя образование и размножение хлоропластов, при этом не действуя на рост клеток и тканей.

4. Размножаются митохондрии и пластиды бинарным делением, как прокариоты, причём делятся иногда независимо от деления клетки, никогда не синтезируются *de novo*.

5. Генетический материал – кольцевая ДНК, не связанная с гистонами, по доле ГЦ ДНК митохондрий и пластид ближе к ДНК бактерий, чем к ядерной ДНК эукариотов.

6. Митохондрии и пластиды имеют собственный аппарат синтеза белка – рибосомы прокариотного типа – с константой седиментации 70 ед. Сведберга. По строению рРНК близки к бактериальной и не похожи по своей структуре на РНК цитоплазмы.

только в клетках животных) и жгутики, возникли путём эндосимбиоза. По Маргулис, к поверхности клетки-хозяина, содержащей уже митохондрии, прикрепилась спирохетоподобная подвижная бактерия. Возможно, что это произошло ещё до того, как в клетке-хозяине образовалось ядро. Симбиоз с спирохетоподобной бактерией был вдвойне полезным. Во-первых, клетка обрела жгутик или жгутики, что придало ей большую маневренность, способность быстро двигаться в жидкой среде. Во-вторых, основание жгутика (базальная гранула или кинетосома, управляющая движением жгутика, по-видимому, стала принимать участие в клеточном делении) превратилось в центриоль, что привело к возникновению митотического веретена. В ходе дальнейшего длительного совершенствования древнего прокариотного амёбоидного организма с митохондриями, клеточной мембраной и жгутиком в нём образовалось ядро, и таким образом возник простейший эукариотный животный организм. Маргулис утверждала, что эндосимбиоз лежал в основе всего видообразования у эукариотов. Эта идея пока в ожидании своего эмпирического подтверждения.

В течение продолжительного времени симбиогенез рассматривали как нереальное событие, не имеющее фактических доказательств. Ему предпочитали более правдоподобный сценарий автогенеза. Полученные в последнее время результаты сравнительного анализа гена 16S рРНК полностью подтверждают симбиогенез митохондрий и пластид. В процессе изучения последовательности оснований в митохондриальной ДНК получены убедительные доводы в пользу того, что предшественники митохондрий – это потомки аэробных бактерий (прокариотов), родственных риккетсиям (альфа-протеобактериям), поселившихся некогда в предковой клетке и “научившихся” жить в ней в качестве симбионтов. Теперь митохондрии есть почти во всех эукариотных клетках, размножаться вне клетки они уже не способны.

Существуют свидетельства того, что первоначально эндосимбиотические предки митохондрий не могли ни импортировать белки, ни экспортировать АТФ. Вероятно, первоначально они получали от клетки-хозяина пируват, выгода для хозяина состояла в обезвреживании аэробными симбионтами токсичного для нуклеоцитоплазмы кислорода.

числа (6400) генов на клетку кодируют синтез тРНК около 50 генов (0,02 % всей ДНК); число генов для рРНК приблизительно равно 20 (0,3 % всей ДНК). Общее количество РНК равно 10–12 % веса высушенной массы.

У прокариотов ДНК не связана с белками; у них отсутствуют гистоны. У некоторых обнаружены лишь гистоноподобные белки. Предположительная функция их – стимуляция процесса транскрипции и фиксирование структуры хромосомы прокариотной клетки.

В связи с этим если правомерен вопрос об эволюции как о процессе, целенаправленном на достижение структурно-функциональной экономичности, то геном прокариотов – блестящее тому подтверждение: под давлением естественного отбора избыточный эукариотный геном освободился от всего лишнего, представ в виде вполне “разумно” устроенной структуры, обеспечивающей выживание прокариотной клетки в течение 3 млрд лет.

В русле гипотезы эволюции прокариотов как процессе последовательных утрат можно интерпретировать и тот факт, что у всех бактерий отсутствуют гистоны, но сохранились гистоноподобные белки. А поскольку у эукариотов (и у архей) есть не только гистоноподобные белки, но и гистоны, можно говорить о том, что именно гистоподобные белки – наиболее консервативный элемент генома, доставшийся прокариотам от археклетки.

7. Принципиальное значение имеет сравнение структуры и функций белоксинтезирующего аппарата прокариотов и эукариотов (табл. 3). Так, с одной стороны, обнаружено сходство в общей архитектуре рибосом: наличие 2 субъединиц – большой L-субъединицы и малой S-субъединицы. Прокариотная рибосома диссоциирует на субъединицы с коэффициентом седиментации 50 ед. Сведберга (молекулярная масса 1650 Да) и 30 ед. Сведберга (молекулярная масса 850 Да). Эукариотные рибосомы диссоциируют на 60S и 40S субъединицы.

С другой стороны, рибосомы прокариотов и эукариотов отличаются константами (коэффициентами седиментации субъединиц, S). Все прокариотные организмы содержат 70S-рибосомы. Эти рибосомы имеют коэффициент седиментации около 70 ед. Сведберга, и их молекулярная масса составляет около $2,5 \times 10^6$ Да

(2500 кДа), средний диаметр – 200–250 Å (20–25 нм). По химическому составу они являются чистыми рибонуклеопротеидами, т.е. состоят только из РНК и белка. Соотношение масс РНК/белок в них составляет примерно 2:1, соответственно парциальный удельный объём 70S-рибосом около 0,60 см³/г, плавучая плотность в растворе CsCl – 1,64 г/см³. Морфология 70S-рибосом прокариотов почти универсальна, только рибосомы архей обладают некоторыми особенностями, отличающими их от рибосом бактерий (см. лекцию 8).

Таблица 3. Рибосомы про- и эукариотов и компоненты рибосомных субъединиц

Мелкие	5S рРНК (прокариоты)	120 нуклеотидов	
	5,8S рРНК (эукариоты)	120 нуклеотидов	
Большие	23S рРНК (прокариоты)	3300 нуклеотидов	Компоненты большой рибосомной субъединицы
	25S–28S рРНК (эукариоты)	3700–5000 нуклеотидов	
“Средние”	16S рРНК (прокариоты)	1540 нуклеотидов	Компоненты малой рибосомной субъединицы
	18S рРНК (эукариоты)	2500 нуклеотидов	

Цитоплазматические рибосомы эукариотов крупнее и их называют 80S-рибосомами (с коэффициентом седиментации около 80 ед. Сведберга). Молекулярная масса этих рибосом составляет около 4,0х10⁶ Да (4000 кДа), средний диаметр – 250–300 Å (25–30 нм). Подобно рибосомам прокариотов они содержат РНК и белок, но содержание белка в них значительно больше. Соотношение масс РНК/белок в 80S-рибосомах составляет примерно 1:1, парциальный удельный объём около 0,65 см³/г, плавучая плотность в растворе CsCl – 1,55–1,59 г/см³.

В настоящее время с использованием методов электронной микроскопии во всех этих организмах обнаружены ранее неизвестные миниатюрные органеллы, напоминающие митохондрии и названные гидрогеносомами, или митосомами, или митохондриеподобными органеллами. Поскольку эти протисты – анаэробы, данные органеллы не участвуют в аэробном дыхании, подобно митохондриям. Полученные факты не оставляют сомнений в том, что митохондриеподобные органеллы представляют собой производные деградировавших митохондрий, которые, вероятно, потеряли свой геном при переходе соответствующих организмов к анаэробному образу жизни. По-видимому, эта редукция митохондрий произошла в нескольких независимых случаях на протяжении эволюции эукариотов. Отсюда следует вывод: в настоящее время нам неизвестны амитохондриальные эукариоты; все эукариоты, изученные достаточно детально, обладают митохондриями или подобными им органеллами. Этот факт является важнейшим открытием первого десятилетия XXI в.

История эндосимбиоза у эукариотов не ограничивается одними митохондриями. Вторым ключевым событием эндосимбиоза было приобретение цианобактерий одноклеточным общим предком зелёных водорослей и наземных растений. Эти цианобактериальные эндосимбионты (*“маленькие зелёные рабы”*, как писал Мережковский, привнесли с собой хлорофилл, превращающий лучистую энергию солнечного света в химическую энергию преобразования двуокиси углерода и воды в углеводы, и другие органические вещества) превратились в пластиды, которые в последующем разделились на хлоропласты и хромопласты.

После цианобактериального эндосимбиоза протисты устроили настоящее “неистовство” по части захвата зелёных водорослей и других эукариотных клеток, обладающих пластидами. В результате возникали сложные эндосимбионты, состоящие из пластиды и остатка эукариотной клетки, первоначального хозяина пластид. Интересны последствия этого симбиоза: в результате эукариоты смогли захватить сушу и кислые воды, в которых отсутствуют цианобактерии (прокариоты), но в изобилии живут зелёные водоросли (эукариоты).

Маргулис предполагала, что помимо митохондрий и пластид некоторые органеллы, такие как центриоли (присутствуют

цитоплазме. У простейших обнаружено довольно много таких цитоплазматических генов. Сравнительно недавно их нашли также в клетках водорослей. Эти факты побудили учёных выдвигать предположение, согласно которому внеядерные гены являются остаточным генетическим материалом каких-то бактерий, случайно попавших в клетку и “застрявших” в ней. Маргулис высказала смелое суждение о том, что такие “гены” являются частью отдельных весьма древних живых организмов, до сих пор живущих внутри клеток более высокой сложности в симбиотическом сосуществовании с ними. Она пишет: *“Сложные клетки возникли из более простых путём симбиоза и объединения их вещества и генетического материала, то есть путём симбиогенеза”*.

Маргулис приводит следующие аргументы: рибосомы прокариотов сходны по величине с рибосомами эукариотных органелл – митохондрий и хлоропластов. Это позволило сделать предположение о том, что эти два типа органелл могли бы возникнуть в результате симбиоза прокариотных организмов двух разных типов. Один из них был крупным гетеротрофным фотосинтезирующим анаэробом (т.е. фотоорганотрофом), питающимся органическими веществами и являющимся предшественником эукариотов. Однажды он поглотил организм, способный к дыханию. Возник симбиоз между выделяющим кислород прокариотом и потребителем кислорода. Симбиоз оказался настолько удачным, что стал облигатным, т.е. эндосимбионты, утратив генетическую автономию, потеряли способность к независимому существованию. Практически все ныне живущие эукариоты содержат митохондрии или подобные им органеллы, а все автотрофные эукариоты содержат также хлоропласты.

Этот факт доказан в результате проведённых детальных ультраструктурных исследований одноклеточных анаэробных эукариотов (протистов), таких как амёбы, микроспоридии, некоторые анаэробные грибы. Они лишены типичных митохондрий и долгое время считались примитивными, первично амитохондриальными эукариотными формами. Их объединяли в группу *Archezoa* и считали “ранней ветвью эукариотов”, отделившейся от общего древа до того, как произошёл митохондриальный эндосимбиоз.

Если в прокариотной клетке рибосомы ассоциированы с цитоплазматической мембраной, то в эукариотной клетке они находятся в свободном состоянии или присоединены к эндоплазматическому ретикулуму. Кроме того, в эукариотной клетке рибосомы локализованы и в органеллах – митохондриях и хлоропластах.

Рибосомы эукариотов, локализованные в митохондриях и хлоропластах, имеют коэффициент седиментации, как у бактерий, 70S, что считается аргументом в пользу эндосимбиотического происхождения эукариотных органелл (полагают, что предшественниками митохондрий были внутриклеточные паразитические эубактерии рода *Rickettsia*, см. лекцию 8). Следует отметить, что информационная ёмкость крупных молекул больше, но их трудно анализировать. Поэтому исследователи выбирают в качестве основных молекулы “средней” величины – 16S и 18S рРНК, состоящие из 1540 и 2500 нуклеотидов соответственно.

Различно у прокариотов и эукариотов и число видов рибонуклеиновых кислот: у прокариотов три вида: 5S, 16S и 23S рРНК, у эукариотов до шести видов – 5S; 5,8S; 18S; 25S–28S рРНК.

Принципиальным считается и различие в механизмах транскрипции (синтез мРНК). Так, только у эукариотов для каждой из 3 рибонуклеиновых кислот (информационной, рибосомной и транспортной РНК) характерна своя РНК-полимераза. У прокариотов функционирование всех трёх рибонуклеиновых кислот “обеспечивает” одна РНК-полимераза.

Различия в прокариотных и эукариотных рибосомах отражены и в рибосомных белках. Если в прокариотных рибосомах их 55 и молекулярный вес низкий, то в эукариотных рибосомах число белков достигает 70, а молекулярный вес их выше, чем белков прокариотных рибосом. В 1984 г. японскими биохимиками были проведены сравнительные исследования рибосомных белков методами гель-электрофореза, аминокислотного сиквенса, с помощью иммунологических реакций. Полученные данные выявили строгую гомологию среди исследованных прокариотных рибосомных белков и очень низкую гомологию между прокариотными и эукариотными рибосомными белками, а также чёткую гомологию внутри последних.

Общепризнанным является тот факт, что, несмотря на указанные различия, общая структура и функция рибосом остались неизменёнными во всех филогенетических линиях живого мира, что свидетельствует об их эволюционной консервативности.

8. Дифференцирующим признаком прокариотного и эукариотного типов клеточной организации остаётся чувствительность к антибиотикам. Так, пенициллины обладают избирательной токсичностью по отношению к прокариотам, так как они воздействуют на определённые этапы синтеза пептидогликана – компонента клеточной стенки большинства прокариотов, но не синтезируемого эукариотами. К пенициллинам нечувствительны только две группы прокариотов: микоплазмы, у которых нет клеточной стенки, и галофильные археи, клеточная стенка которых не содержит пептидогликана.

Полиеновые антибиотики (например, нистатин, филиппин, амфотерицин В) связываются со стеринами в клеточной мембране организмов, что приводит к разрушению мембран и утечке необходимых метаболитов из клетки. Высокое содержание стерина характерно для мембран эукариотной клетки, но не для мембран большинства прокариотов. Поэтому полиеновые антибиотики – это агенты, обладающие избирательной токсичностью по отношению к эукариотам.

Аминогликозиды (например стрептомицин), макролидные антибиотики (например эритромицин) подавляют синтез белка на 70S-рибосоме и таким образом избирательно токсичны для прокариотов. Экспериментально установлено, что эти антибиотики влияют и на синтез белка в таких органеллах эукариотов, как рибосомы хлоропластов и митохондрий. Правда, концентрация антибиотиков, необходимая для заметного подавления белоксинтезирующей активности в хлоропластах и митохондриях, значительно выше концентрации, необходимой для подавления роста прокариотных клеток. Возможно, что наружные мембраны этих органелл представляют собой частичный барьер для проникновения антибиотиков внутрь.

9. Устойчивым признаком, дифференцирующим прокариотный и эукариотный типы клеточной организации, служат различия в универсальной 5S рРНК-компоненте большой рибосом-

симбиогенеза была разработана советским ботаником Борисом Михайловичем Козо-Полянским (1890–1957), которым было впервые высказано предположение о том, что симбионтами являются и митохондрии.

Теория симбиогенеза (симбиотическая теория, или эндосимбиотическая теория, или теория эндосимбиоза) объясняет механизм возникновения некоторых органоидов эукариотной клетки – митохондрий и пластид. В соответствии с теорией симбиогенеза эти органеллы являются потомками эндосимбиотических бактерий, которые потеряли способность к автономному существованию.

Длительное время практически отсутствовали исследования по симбиогенезу (в широком его понимании как самоорганизация на основе кооперации и взаимодействия, как взаимовыгодное проживание одной клетки внутри другой). Второе рождение теория симбиогенетического происхождения эукариотов получила с 1960-х гг. в работах Линн Маргулис (Margulis L., 1938–2011, американский ботаник, занималась исследованием водорослей современными методами электронной микроскопии и молекулярной генетики, профессор Массачусетского университета в Амхерсте, США).

Маргулис считается автором современной версии концепции эндосимбиоза (*“клетка в клетке”*, *“союз двух миров”*). В 1983 г. в СССР вышла в переводе с английского книга Маргулис *“Роль симбиоза в эволюции клетки”* (издательство “Мир”), в которой автор полагает, что *“симбиоз – это физическое объединение различных организмов, их совместное проживание в одном и том же пространстве и времени”*. Биологический симбиоз не может быть приравнен к простому взаимовыгодному сотрудничеству, основанному на одном лишь балансе выгод и затрат. Истинный симбиоз, утверждает Маргулис, состоит в том, что в результате длительного сосуществования он всегда приводил к органическому *“слиянию”* разнообразных организмов в некое новое целое и в этом смысле всегда являлся главным фактором эволюционного обновления (рис. 12).

Маргулис пришла к этому заключению на основании нескольких биологических фактов. Она обратила внимание на то, что у инфузории *Paramecium aurelia* существует ген, который содержится не в клеточном ядре парамеции, а в окружающей ядро

Согласно гипотезе автогенеза, ядерная оболочка, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы и другие компартменты эукариотов возникли в результате дифференциации участков цитоплазматической мембраны, которые разрастались и инвагинировали в цитоплазму. Происхождение митохондрий и осуществляющих фотосинтез пластид связывали со специализацией отдельных участков цитоплазматической мембраны и их превращением в преобразователи химической и световой энергии. Согласно инвагинационной гипотезе, предком эукариотов была аэробная прокариотная клетка, к которой, по-видимому, могли прикрепляться другие прокариоты. Их геномы объединялись. Ядро, митохондрии и пластиды возникли путём впячивания и отшнуровывания участков клеточной мембраны. В эти структуры попадала чужеродная ДНК. Усложнение генома происходило в процессе дальнейшей эволюции. Инвагинационная гипотеза происхождения эукариотов хорошо объясняет наличие двойной мембраны у органелл. Однако эта гипотеза не объясняет, почему система биосинтеза белка в хлоропластах и митохондриях сходна с прокариотной, в то время как таковая в ядерно-цитоплазматическом комплексе имеет ключевые отличия.

В конце XIX в., в 1883 г., задолго до появления гипотезы автогенеза, немецкий ботаник Андреас Шимпер (Schimper A., 1856–1901) одним из первых предложил теорию эндосимбиотического происхождения хлоропластов и показал их саморепликацию внутри клетки. Возникновению этой теории сопутствовал вывод русского ботаника-физиолога Андрея Сергеевича Фаминцына (1835–1918, академик Императорской академии наук, Санкт-Петербург) о двойственной природе лишайников – симбиотического комплекса грибов и водоросли (1897 г.). Более чёткие положения симбиотической теории были сформулированы русским зоологом Константином Сергеевичем Мережковским (1855–1921, профессор Казанского университета, автор книги “Рай земной или Сон в зимнюю ночь 27 века”). В 1905 г. он предложил термин “*симбиогенез*” (от греч. “*sym*” – вместе, “*bios*” – жизнь и “*genos*” – происхождение), в 1909 г. впервые выдвинул теорию двух плазм и создал на её основе новую систему органического мира. Фаминцын в 1907 г., опираясь на работы Шимпера, также пришёл к выводу, что хлоропласты являются симбионтами, как и водоросли в составе лишайников. В 1920-е гг. теория

ной субъединицы. У прокариотов она моделируется как цепь, содержащая 4 спирали, у эукариотов – как цепь с 5 спиралями. Наличие этих двух типов 5S рРНК служит филогенетическим маркером прокариотных и эукариотных цитоплазматических рибосом. Впервые использовать специфику прокариотной и эукариотной 5S рРНК в качестве филогенетического признака предложили японские исследователи. Они показали, что длину 5S рРНК эукариотной рибосомы составляют 160 нуклеотидов, а прокариотной 5S рРНК – в среднем 118 нуклеотидов, причем у грамположительных – 116 нуклеотидов, у грамотрицательных – 120. Факт различной типологии 5S рРНК у грамотрицательных и грамположительных бактерий авторы этих интересных исследований трактуют весьма решительно. Они полагают, что 120-нуклеотидный тип 5S рРНК более древний, чем 116-нуклеотидный тип, отсюда сложноорганизованные грамотрицательные бактерии – наиболее древняя бактериальная группа, что противоречит классическому представлению об эволюции прокариотов, (представлению, принимающему во внимание фактор “прогрессивности”), согласно которому древнейшими считаются обладающие более простой организацией грамположительные бактерии, по сравнению с грамотрицательными, имеющими сложное строение – сложную внешнюю (наружную липопротеидную дополнительно к цитоплазматической) мембрану, функционально специфический отсек клетки, особенности липидного состава мембран, большее разнообразие жизненных циклов и другие особенности.

10. Для прокариотов характерны недостижимое для других групп организмов разнообразие условий обитания и исключительная пластичность. Типы питания весьма разнообразны. Прокариоты характеризуют по природе источников трёх необходимых компонентов жизнедеятельности: энергии, углерода и водорода (источника электронов). По источнику энергии различают две категории организмов: фототрофы (использующие солнечный свет) и хемотрофы (использующие энергию химических связей в питательных веществах). По источнику углерода выделяют автотрофы (CO₂) и гетеротрофы (органическое вещество). По источнику водорода (электронов) различают органотрофы (потребляющие органику) и литотрофы (потребляющие производные литосферы – H₂, NH₃, H₂S, S, Fe²⁺ и т.д.).

По такой классификации зелёные растения – фотолитоавтотрофы, животные и грибы – хемоорганогетеротрофы с дыханием аэробного типа. Из 16 типов питания эукариотам свойственны только фотолитоавтотрофия и хемоорганогетеротрофия в аэробных условиях (лишь немногие эукариоты, например дрожжи, приобрели способность к анаэробному обмену). Тогда как в мире прокариотов встречаются самые разнообразные сочетания. Нередко в онтогенезе прокариотов наблюдается переход от одного типа метаболизма к другому, например, от фототрофии к хемотрофии, от автотрофии к гетеротрофии, от аэробноза к анаэробнозу. Среди ядерных химер на это способны лишь некоторые протисты, одноклеточные водоросли и грибы (например, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Saccharomyces*).

Бактериям свойственны функции, которыми не обладают, например, высшие растения: только бактерии могут усваивать молекулярный азот; нитрифицирующие и денитрифицирующие бактерии – единственный источник закиси азота. Прокариотам, способным усваивать водород, аммиак, метан и углекислоту, живой мир планеты, по-видимому, обязан освобождением первичной атмосферы от этих компонентов.

Таким образом, прокариотная и эукариотная организация клеток принципиально различна. В связи с этим возникает ряд вопросов, касающихся эволюции и, в частности, происхождения 2 типов клеток и их взаимоотношений. Главный вопрос: существует ли эволюционная преемственность между прокариотами и эукариотами? Сегодняшняя наука даёт отрицательный ответ. Бактерии не были эволюционными предшественниками самих эукариотов, они являются эволюционными предшественниками лишь их цитоплазматических органелл – митохондрий и пластид.

Эволюционное происхождение митохондрий и хлоропластов

До середины 1970-х гг. господствовало представление о том, что эволюционное древо клеточных организмов разветвляется на два ствола. Один из них – это ствол эукариотов (ядерные клетки с митохондриями и пластидами). Другой – ствол прокариотов-бактерий. При этом предполагалось, что прокариоты-бактерии образуют монофилетическую группу. Единство происхождения ядерных организмов сомнений не вызывало (рис. 11).

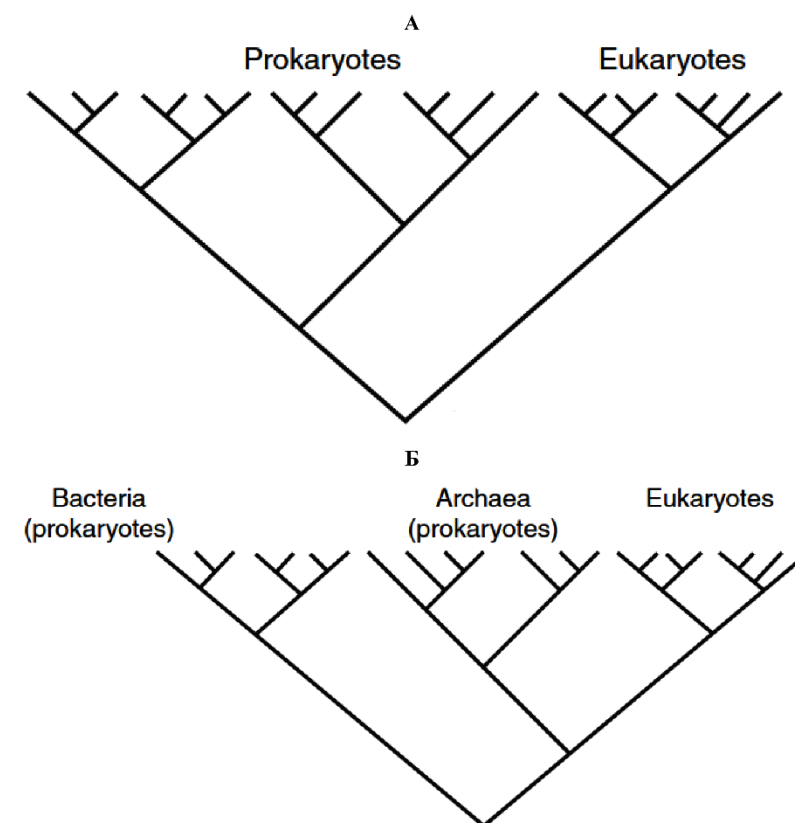


Рис. 11. Древо жизни, построенное по данным анализа морфологических характеристик (А) и последовательностей нуклеотидов в ДНК (Б) [по Gaucher et al., 2010]

Общим прототипом клеточных организмов считали архайческих бактерий. В 1960–1970-е гг. был предложен ряд гипотетических сценариев, согласно которым эукариоты произошли благодаря постепенной компартментализации бактериальной клетки. Канадский ботаник Фрэнсис Тейлор (Taylor F.) назвал это автогенезом (от греч. “avto” – сам и “genos” – происхождение).

ления неорганических веществ (серы, водорода, соединений железа). Археи составляют значительную часть глобальной биомассы и занимают особые (экзотические) природные ниши. Стил жизни архей чаще всего связан с экстремальной термофилией или галофилией и метаногенезом. Необычны места обитания архей. Они живут при высокой температуре и давлении на больших глубинах в океанах, глубоких трещинах земной коры, в условиях гиперсолёности, строгого анаэробизма и кислотности. До недавнего времени существовало предположение, что они были оттеснены бактериями из обычных местообитаний, но, по-видимому, это не так.

Теперь известно, что наряду с экстремофилами значительную часть архей составляют те, что обитают в обычных биотопах: холодных морских и пресных водах, осадках пресных озёр, почвах, пищевом тракте животных и людей. Археи обладают адаптационной стратегией, позволяющей им распространяться по всей толщине океанических вод. Наиболее многочисленная и морфологически разнообразная группа архей – это метаногены, строгие анаэробы, образующие метан из двуокиси углерода и водорода. Биологическое образование метана осуществляется только археями. Основным путём образования метана является окисление молекулярного водорода углекислотой – “карбонатное дыхание”: $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$. Опытами с меченым водородом показано, что водород в этом процессе служит донором электронов, а источником протонов в молекуле метана является вода. В некоторых случаях могут быть использованы соли муравьиной и уксусной кислот, метиловый спирт и метиламины. Таким образом археи получают необходимую им энергию.

Фенотип архей

Археям свойственна типичная прокариотная клеточная организация: отсутствие окружённого мембраной ядра, мембранных органелл, характерных для эукарий (митохондрий, аппарата Гольджи). Их хромосомная ДНК расположена непосредственно в цитоплазме и имеет вид бактериального нуклеоида – электронно-прозрачной зоны, заполненной фибриллами ДНК. Поверхность цитоплазматической мембраны отделена от среды клеточной стенкой: у одних видов – толстым, у других – тонким

между предковой формой – эукариотным организмом, ещё лишённым митохондрий, и его потомками, обладающими типичными митохондриями, сам факт существования подобного организма указывает на потенциальную возможность возникновения органелл по рассмотренному выше сценарию. Инфузории рода *Paramecium* постоянно содержат внутри клеток водоросли рода *Chlorella*.

Корни эукариотов среди архей и бактерий

В настоящее время теория эндосимбиоза – это общепризнанная версия происхождения митохондрий и пластид. Попытки объяснить подобным образом происхождение других органелл и структур клетки пока не находят доказательств и подвергаются обоснованной критике.

Теория эндосимбиоза тесно связана с теорией биосферы Вернадского, которая сегодня достигла наивысшего развития в гипотезе Геи, названной в честь древнегреческой богини Земли (теперь её чаще всего называют теорией или концепцией Геи-Земли) и развиваемой Л. Маргулис и Джеймсом Лавлоком (Lovelock J.). Данные исследователи утверждают, что симбиоз (как самоорганизация на основе кооперации и взаимодействия) существует не только на уровне бактерий, но и таких сложных систем, как атмосфера, почва и Земля в целом [Lovelock, 2009, 2014]. Согласно концепции Геи-Земли, даже такие планетарные параметры, как, например, температура и химический состав атмосферы, являются результатом совместной деятельности всех живых организмов планеты. Лавлок и Маргулис, в сущности, утверждают, что вся Земля представляет собой “единый огромный живой организм”, способный приспосабливать окружающую среду к своему существованию в ней, превращая её в свою среду обитания. Точнее было бы называть её единой саморегулирующейся системой, которая создана биотой и окружающей средой, и которая способна в большой мере сама “залечивать свои раны и регулировать свои отклонения от равновесия”.

Теория Геи возвращает особое внимание к целостной биосферной концепции В.И. Вернадского (1863–1945) о ключевой роли живых организмов (биоты) в формировании химического и физического состава биосферы, атмосферы и гидросферы Земли. Современные экологические данные подтверждают

взгляды Вернадского, а также теорию Геи и указывают на важные функции прокариотных организмов по формированию и регуляции параметров геохимической среды. Вернадский писал: “Бактерии независимы в своём питании не только от других организмов, но непосредственно и от солнечных лучей. Они потребляют для построения своего тела химическую энергию земных соединений, например минералов, богатых кислородом. Этим путём они производят в биосфере огромную геохимическую работу, как разлагая эти соединения, так и создавая, как следствие этого разложения, новые синтезы. Их роль значительна в истории углерода, серы, азота, железа, марганца и, вероятно, многих других элементов нашей планеты”.

Заключая вышесказанное, необходимо ещё раз обратить внимание на то, что эукариоты являются гибридными (химерными) организмами в смысле как клеточной организации, так и набора генов. На настоящий момент доказано, что все ныне существующие эукариоты обладают митохондриями или митохондриеподобными органеллами, произошедшими от альфа-протеобактерий, а растения содержат пластиды, произошедшие от цианобактерий. Набор генов у эукариотов представляет собой разнородную смесь генов, происходящих, вероятно, от архей, генов с наиболее вероятным бактериальным происхождением и генов неизвестного происхождения, считающимися в настоящее время специфическими для эукариотов. При этом у эукариотов в три раза и более больше генов с ближайшими бактериальными гомологами, чем с ближайшими архейными гомологами. Архейный набор значительно обогащён генами, связанными с функциями обработки информации (трансляция, транскрипция, репликация, сплайсинг), тогда как бактериальный набор генов кодирует в основном ферменты метаболизма, мембранные белки и компоненты биогенеза мембран, различные сигнальные молекулы и другие “операционные” белки.

Исходя из установленного происхождения митохондриального эндосимбиоза, по-видимому, эукариотный геном появился путём слияния двух предковых геномов, архейного или родственного археям и бактериального, вероятнее всего, альфа-протеобактериального.

древний) – кренархеоты, креноты, представляющие довольно гомогенную группу из экстремальных термофилов, обитающих в горячих (55–105 °C) кислых (pH 1–3) серных источниках, галобактерий, живущих при высоких температурах в рассолах высокой концентрации; тип *Euryarchaeota* (от греч. “evry” – повсюду, широта, в смысле повсеместного присутствия) – эвриархеоты, включающие метаногены, которые образуют метан из углекислого газа и водорода, гипертермофил *Thermococcus*, своеобразный сульфатредуцирующий термофил *Archaeoglobus fulgidus*, иногда выделяемый в самостоятельную группу; тип *Korarchaeota* (от греч. “koros, kore” – молодой человек или молодая женщина и “archaios” – древний) – корархеоты, которые в небольших количествах обнаружены в 2002 г. в гидротермальных источниках с высокой температурой и которым пока невозможно дать характеристику, поскольку выделить корархеоты в чистом виде ещё не удалось; тип *Nanoarchaeota* (от греч. – древний карлик) – археотные симбионты, обнаруженные в горячем глубоководном источнике (Исландия) на поверхности клеток кренархеотов нового рода *Ignicoccus* [Huber et al., 2002]; тип *Thaumarchaeota* (от греч. “thaumas” – чудо) – археи, выделенные в 2008 г. на основании филогенетических данных (последовательности генов рРНК), отличающиеся способностью к образованию фермента топоизомеразы I типа, который ранее считался уникальным для эукариотов [Brochier-Armanet et al., 2008a, 2008b; Spang et al., 2010], и представленные таксонами, из которых большая часть – кандидаты (*Candidatus*); тип *Aigarchaeota* – (от греч. – заря) – тип архей, родственный кренархеотам, к которому относят два вида “*Candidatus* Caldiarchaeum subterraneum”, геном которого собран из образцов, отобранных в слабокислом источнике в золотом руднике в Японии, и “*Candidatus* Calditenuis aerorheumensis”; тип *Lokiarchaeota* – выделен на основании метагеномного анализа образцов, отобранных на глубине около 3 км в Атлантическом океане; тип *Thorarchaeota* – выделен по результатам метагеномных исследований по реконструкции геномов архей из морских осадочных отложений (Северная Каролина, США).

Все археи хемоавтотрофы, т.е. получают энергию, необходимую для осуществления синтетических реакций, путём окис-

медленнее должна быть скорость, с которой изменяется последовательность мономеров в макромолекуле. Если молекула-хронометр подвержена многочисленным изменениям в отношении последовательности, она не может служить инструментом для определения родства, поскольку области общих последовательностей со временем будут утеряны; наиболее надёжные хронометры должны быть свободны от непосредственной связи со случайными фенотипами, а также интронов, псевдогенов и “хламовой” ДНК.

Итак, в 1990 г. Вёзе предлагает название *Archaea* взамен традиционного *Archaeobacteria*, а позднее, в 1994 г., вводит новое деление организмов на три таксона субмаксимального ранга – три домена (от англ. “domain” – область, сфера, владение), тождественные трём первичным царствам эволюции: бактерий (домен *Bacteria* – бывшие эубактерии и цианобактерии, архей (домен *Archaea*) – бывшие археобактерии и эукарий (домен *Eucarya*) – бывшие эукариоты.

Категории “домен” и “фила” введены в более широкое пользование в 2001 г. Категория “домен” соответствует высшему филогенетическому мегатаксону и имеет ранг выше категории “царство”. Категория “фила” соответствует эволюционной ветви глобального филогенетического дерева жизни и является интрадоментной категорией. Домены состоят из фил.

Прокариоты – члены домена *Bacteria* и домена *Archaea*, у которых нет ограниченного цитоплазматическими мембранами ядра и органелл. Эукариоты составляют филогенетический домен *Eucarya*, к которому относятся растения, животные и человек. Это организмы, в клетках которых присутствуют оформленное ядро и уникальный мембранный аппарат, состоящий из двух обособленных частей – цитоплазматической мембраны и эндо-мембран, представляющих собой систему топологически замкнутых микрокомпартментов (ядерная оболочка, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, микросомы и т.д.). Эндо-мембраны взаимодействуют между собой и с цитоплазматической мембраной при помощи системы везикулярного транспорта [The Prokaryotes, 2006].

В настоящее время домен *Archaea* включает 8 типов: тип *Crenarchaeota* (от греч. “kren” – ключ, источник, “archaios” –

Предполагаемое слияние генов проще всего интерпретировать как отражение симбиогенеза. Однако все сегодняшние попытки точно указать (идентифицировать) реальных архейных и бактериальных “родителей” эукариотов не дают однозначных результатов и, по-видимому, свидетельствуют о сложных эволюционных связях. Понятно, что какова бы ни была истинная природа архейного предка эукариотов, он, вероятно, жил при умеренных температурах, не в экстремальных условиях и постоянно пребывал в контакте с бактериальным сообществом. Современные археи с подобным образом жизни (например, представители архей *Methanosarcina*) имеют ряд генов, происходящих из различных бактериальных источников, что указывает на широко-масштабный горизонтальный перенос генов от бактерий. Таким образом, архейный хозяин эндосимбионта мог уже иметь много бактериальных генов, что отчасти объясняет наблюдаемое преобладание и разнообразие “бактериальных” генов у эукариотов. Данные предположения не являются бесспорными и, возможно, впоследствии могут быть подтверждены или опровергнуты, изменены или дополнены, но сама возможность выдвижения таких заключений на основе использования методов геносистематики чрезвычайно важна.

Данные, полученные сегодня с помощью молекулярно-биологических методов, в сущности, подтвердили гипотезу Фаминцына–Мережковского–Шимпера–Маргулис об эндосимбиотическом происхождении пластид и митохондрий. Этим была доказана несостоятельность гипотезы о происхождении эукариотов от бактерий [Пиневиц, 2007]. По современным данным, глобальное эволюционное древо разветвляется на три ствола (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*). Два прокариотных ствола *Bacteria* и *Archaea* сформировались независимо друг от друга. Что касается эукариотов, то они возникли не как отдельная ветвь ствола бактерий, а представляют собой третий ствол (см. рис. 11). Вышесказанное убедительно свидетельствует о неразрывной внутренней связи прокариотов и эукариотов, представителей всех надцарств, царств и типов живых существ.

Лекция 8. **КОНЦЕПЦИЯ АРХЕЙ. ФЕНОТИП И ГЕНОТИП
АРХЕЙ: СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТ**

*Новые истины проходят три стадии.
На первой их высмеивают,
на второй им резко оппонируют и затем, в конце концов,
их принимают как само собой разумеющееся.*
А. Шопенгауэр (1788–1860)

В предыдущей лекции мы анализировали становление концепции прокариотной и эукариотной клеточной организации, которое проходило очень долго – практически со второй половины XIX в. до начала 70-х гг. прошлого столетия. До середины XIX в. все живые существа подразделялись на два царства: *Plantae* и *Animalia*. Это аристотелево деление “растения – животные” оказалось психологически очень устойчивым и только во второй половине XIX в. микроорганизмы (грибы, простейшие, бактерии) были отнесены к различным таксонам высокого ранга.

Так, в 1858 г. известный британский палеонтолог Ричард Оуэн (Owen R., 1804–1892) все одноклеточные организмы в царстве животных выделил в ранг самостоятельного царства *Protozoa* (простейшие). В основе выделения нового царства у него лежала концепция преобладающих признаков, позволяющая разделить настоящие растения и животных. Если таких признаков не было или их оказывалось недостаточно, то такие организмы нужно было относить к простейшим [Owen, 1858]. Два года спустя, в 1860 г., англичанин Джон Хогг (Hogg J., 1860) предлагает все одноклеточные организмы выделить в самостоятельное царство *Protoctista* (протоктисты), первоначально названные “*Regnum Primigenum*”, которые определялись как низшие или первичные организмы – протофиты (protophyta, низшие растения) и протозоа (protozoa, низшие животные) [Hogg, 1860]. В 1866 г. 30-летний немецкий биолог Эрнст Геккель (Haeckel E., 1834–1919) в своей двухтомной монографии “Всеобщая морфология организмов” (нем. “*Generelle Morphologie der Organismen*”) выделяет все микроорганизмы – грибы, простейшие, водоросли и бактерии – в одно царство *Protista* (протисты) [Haeckel, 1866].

с именем Роберта Хангейта (Hungate R.E., ученик ван Ниля), разработавшим методы культивирования анаэробов.

Благодаря этим исследованиям была накоплена значительная коллекция метаногенов и достаточная биомасса метаногенов, что позволило начать широкие исследования их уникальных физиолого-биохимических свойств. Интерес к данной группе микроорганизмов был настолько велик, что к настоящему времени археи оказались гораздо более изученными, чем многие бактериальные формы.

Можно предвидеть недоумённые вопросы: “Почему археи получили статус третьего домена не сразу” и “Почему учёные работали с ними, не подозревая, что имеют дело с иной, нежели бактерии, формой жизни”? Дело в том, что при изучении бактерий большие трудности связаны с определением границ высших систематических единиц – таксонов. Методы молекулярной ДНК-ДНК или ДНК-РНК гибридизации, хорошо зарекомендовавшие себя для определения родства филогенетически близких видов и родов, не подходят для эволюционно далёких таксонов. Бактерии часто мутируют, им свойствен перенос генетических элементов. В течение длительной эволюции могли накопиться большие изменения в геноме, строении белков, не говоря уже об изменении фенотипических признаков. Возможна также конвергенция видов. Всё это затрудняло сравнение далёких в филогенетическом отношении видов.

Успех группы Вёзе был определён удачным выбором информативной хронометрической молекулы (рибосомной РНК) для измерения филогении, которая соответствовала необходимым требованиям: быть повсеместно распространённой в изучаемой группе; обладать функциональной гомологичностью, т.е. идентичными функциями у каждого организма, поскольку функционально различные молекулы не могут иметь структурного сходства; быть достаточно крупной, чтобы вмещать адекватное количество информации; иметь в геноме участки гомологичной и гетерогенной последовательностей. Причём последовательности в выбранной молекуле-хронометре должны изменяться со скоростью, соизмеримой с эволюционным расстоянием. Чем шире измеряемое филогенетическое расстояние, тем

упрощения их организации, редукции (вплоть до полного исчезновения) различных систем. Возможно, и с предками современных вирусов произошли подобные упрощения при переходе к паразитизму. Науке не известны вирусы, живущие свободно, вне хозяина. Поскольку современная наука пока не в состоянии дать однозначного ответа на вопрос о происхождении вирусов, надлежащего места в единой макросистеме живых организмов вирусам до сих пор не найдено.

В исследование третьего царства живых существ, наряду с микробиологами, интенсивно включились биохимики и молекулярные биологи. После 1977 г. в течение трёх лет наблюдается мощный поток публикаций, настоящий информационный бум, вызванный открытием археобактерий. Только с 1979 по 1983 г. были выделены из природы и описаны 17 новых родов, свыше 25 видов и 7 новых порядков этой группы организмов, т.е. число известных форм археобактерий возросло за это время на 70% [Гутина, 1992а]. Столь высокие темпы описания новых форм микроорганизмов – явление, не наблюдаемое ранее в микробиологии и означающее крупные изменения в фонде знаний о многообразии микробного мира. Однако этому предшествовал ряд научных событий.

Дело в том, что организмы, которые были идентифицированы в 1977 г. как археобактерии, были известны давно и не являются редкими существами. Ещё Н.Л. Зёнген (Söhngen N.L.) в начале 1900-х гг. описал метаногенную бактерию, отнеся её к роду *Sarcina* на основании внешнего сходства с типовым видом *Sarcina ventriculi* [Söhngen, 1906]. В свою очередь ван Ниль в 1936 г. выделил в роде *Sarcina* подрод *Methanosarcina*. Позднее (уже в 70-х гг.) на основании фенотипических данных и по составу ДНК *Methanosarcina* была выделена в самостоятельный род.

В 70-е гг. начинается интенсивное исследование метаногенов и биологической природы процесса образования метана. Однако изучение этих вопросов тормозилось из-за отсутствия чистых культур метаногенов. Сложность их получения заключается в чрезвычайной чувствительности метаногенов к кислороду. Прогресс в их изучении вызван разработкой методологии анаэробного культивирования, созданием селективных питательных сред из смеси водорода и углекислого газа. Эти работы связаны

Этот новый таксон он назвал царством примитивных форм, пограничных между царствами высших животных и растений.

Следует отметить, что названия царств *Protozoa*, *Protoctista* и *Protista* были предложены их авторами в короткий временной промежуток (1858–1866), практически для одних и тех же групп организмов, выделяемых по одному принципиальному принципу (одноклеточность): в третье царство живой природы помещались все организмы, которые по формальным критериям не могли быть отнесены ни к настоящим растениям, ни к настоящим животным. Если следовать правилу хронологического приоритета в выборе названий таксонов, то необходимо отдать предпочтение царству *Protozoa* Owen, 1858, а *Protoctista* Hogg, 1860 и *Protista* Haeckel, 1866 считать его младшими синонимами. Что же касается формальных терминов – простейшие (protozoa), протоктисты (protoctists) и протисты (protists), которые не подчиняются вышеуказанному правилу, поскольку не являются таксономическими категориями, то их следовало бы рассматривать в качестве равноправных синонимов, обозначающих любые организмы, которые нельзя отнести ни к настоящим растениям, ни к настоящим животным [Фролов, Костыгов, 2013]. Поскольку в современной научной и учебной литературе термины “простейшие”, “протоктисты” и “протисты” до сих пор используются отечественными и зарубежными исследователями, необходимо понимать, что они обозначают лишь нетаксономическую группу организмов.

Итак, выделение микроорганизмов в самостоятельное царство означало утверждение идеи их биологической индивидуальности и самостоятельного исторического развития, независимого от растений и животных. Однако научное сообщество оказалось неготовым к глобальной перестройке двухцарственной системы живой природы. Введение третьего царства делало ещё более размытой границу между царствами растений и животных. И одной из основных причин этого было отсутствие методов, дающих возможность “на равных” исследовать простейших, настоящих животных и растения. В результате углублённого изучения геккелевских протистов с использованием развивающейся техники световой микроскопии, методов цитохимии и возведения цитологического признака в ранг официального дифференцирующего

дескриптора все протисты были подразделены на высшие протисты (простейшие, водоросли, грибы) и низшие протисты (бактерии и сине-зелёные водоросли). Все высшие протисты имеют ядерное строение и являются эукариотами, все низшие протисты имеют прокариотное строение и являются доядерными организмами-прокариотами.

В 1962 г. с выходом статьи Роджера Стениера и Корнелиса ван Нили была обоснована концепция прокариотов и эукариотов: “... бактерии и сине-зелёные водоросли имеют клеточную организацию, определяемую как прокариотная, которая больше не встречается в живом мире”. Благодаря этой концепции микробиологи получили возможность на практике отличать бактерии от простейших, грибов и водорослей даже в тех случаях, когда между ними наблюдается внешнее сходство.

В предыдущей лекции рассматривалась биологическая специфичность прокариотов и эукариотов, а также то, что сегодня выявляются всё новые отличительные признаки, как уникальные, свидетельствующие о независимости последующей эволюции, так и универсальные, свидетельствующие об общности происхождения прокариотов и эукариотов от единого анцестора.

В 1968 г. Р. Мерреем (Murray R.) было предложено все клеточные организмы разделить на царство *Prokaryotae*, куда вошли все организмы с прокариотным строением клетки, и царство *Eukaryotae*, куда были включены все высшие протисты, растения и животные.

В это время появляется много других схем ранжирования живых существ на уровне макротаксонов. Наиболее известные – система классификации живого мира, предложенная Робертом Виттэкером (Whittaker R.) из Корнельского университета в 1969 г., в основе которой лежит не цитологический, а эколого-трофический критерий, включающая 5 царств: царство *Monera* – прокариоты, царство *Protista* – одноклеточные эукариоты и три царства *Plantae*, *Fungi*, *Animalia* – многоклеточные эукариоты. При этом три последние мегатаксона различаются по способу питания. Фототрофный тип питания за счёт процесса фотосинтеза характерен для растений; грибы характеризуются осмотротным типом питания – питанием растворёнными органическими веще-

удивлённому взгляду путешественников предстали кенгуру вместо лошадей и эвкалиптовые деревья вместо елей [Воробьёва, 2007]. Открытие нового мира живых существ значительно расширило представление об истории жизни на Земле и о путях клеточной эволюции с момента возникновения гипотетической первичной клетки, о происхождении эукариотной клетки и филогенетическом родстве бактерий. По мнению Г.А. Заварзина, “именно прокариотное сообщество так изменило условия на Земле, что смогли появиться новые, в том числе непрокариотные формы жизни” [Заварзин, 2011б].

Основной тезис концепции, сформулированный Вёзе: “...жизнь на этой планете состоит из 3 типов – эубактерий, археобактерий и эукариотов. Два класса прокариотов не более родственны друг другу, чем каждый из них эукариотам” [Woese, 1987].

Выделение нового царства археобактерий обусловило необходимость разделять прокариоты и эукариоты на уровне надцарств. В связи с этим мегасистема живого мира стала выглядеть таким образом:

Надцарства	Царства
Прокариоты	Археобактерии. Эубактерии
Эукариоты	Растения. Животные. Грибы

В этой системе высших таксонов не нашлось места такой группе живых организмов, как вирусы. Центральное положение общепризнанной клеточной теории гласит о том, что клетка – это структурная и функциональная единица всего живого. Вирусы – живые, но неклеточные организмы. Одни исследователи полагают, что это доклеточные формы жизни. Другие специалисты рассматривают их как организмы, произошедшие из предковых форм, имеющих клеточное строение. Однако в процессе перехода к внутриклеточному паразитизму произошла утрата их клеточной организации. Действительно, среди многоклеточных паразитов разных царств имеется множество случаев значительного

В 1-ю группу вошли все эукариоты: высшие растения, животные, дрожжи, водоросли и т.д., за исключением таких оргanelл эукариотов, как митохондрии и хлоропласты. Таким образом, первая группа представлена ядерно-цитоплазматическим компонентом эукариотных клеток.

Ко 2-й группе организмов, получивших название эубактерий (истинных бактерий), относится подавляющее большинство прокариотов. Сюда же попали на основании степени гомологии гена 16S рРНК митохондрии и хлоропласты эукариотных клеток.

В 3-ю группу вошли некоторые малоизученные прокариоты (эубактерии, как они считались ранее), обитающие в экстремальных и гиперэкстремальных условиях: в первую очередь метанобразующие бактерии (метаногены), позднее круг этой группы значительно расширился, к ним были причислены аэробные сероокисляющие и анаэробные серовосстанавливающие бактерии, экстремальные галофилы, в также термоацидофилы (от лат. “*acidus*” – кислый, греч. “филия” – люблю).

По утверждению Вёзе, 3-я группа микроорганизмов представляет третью ветвь эволюции, “*третью форму жизни*”, третье (“*первичное*”) царство живых организмов в дополнение к двум известным царствам – прокариотам и эукариотам. По предложению сотрудника его лаборатории Линды Магрум (Magrum L.J.) эта группа микроорганизмов была названа архебактериями. Это название впервые появилось осенью 1977 г.: вначале оно прозвучало на пресс-конференции в Иллинойском университете, а затем было приведено в статье Вёзе и Фокса [Woese, Fox, 1977b], посвящённой характеристике 16S рибосомной РНК метаногенов.

Окончательно концепция архебактерий была сформулирована в 1978 г. и основной смысл её – отрицание господствующей до 1977 г. прокариотно-эукариотной дихотомии, утверждение идеи нового “*первичного*” макротаксона и одновременно линии развития живых существ – архебактериальной [Woese et al., 1978].

Открытие существования архебактерий (с 1990 г. архебактерии стали называть археями) относится к одному из величайших (монументальных) достижений современного естествознания XX в. Его можно сравнить с открытием Австралии, когда

ствами; животные осуществляют голозойное питание, заключающееся в захватывании и переваривании твёрдой пищи. Способы питания, специфичные для растений и грибов, возникли в процессе эволюции на уровне представителей царства *Monera*, на уровне *Protista* они получили своё дальнейшее развитие, здесь же сформировался третий тип питания – голозойный.

Можно привести немало других схем деления организмов, в частности, мегатаксономию Томаса Кавалир-Смита (Cavalier-Smith T.) [Cavalier-Smith, 1998, 2004, 2007, 2010]. По убеждению этого британского учёного, все живые существа должны быть представлены в двух доменах: *Bacteria* и *Eukarya*. В домен *Bacteria* автор включает два царства: эубактерии и археи, а в домен *Eukarya* – шесть царств: растения, животные, грибы, простейшие, архезоа (*Archezoa*) и хромиста (*Chromista*). Последние два царства в прежних классификациях отсутствовали. Царство *Archezoa* включает примитивные эукариотные организмы, которые содержат оформленное ядро, но не имеют аппарат Гольджи, митохондрии, хлоропласты, пероксисомы, которые присутствуют у большей части эукарий, и в то же время имеют 70S рибосомы прокариотного типа. Царство *Chromista* включает фототрофные организмы, у которых хлоропласты находятся не в цитоплазме, как у растений, а внутри люменов эндоплазматического ретикулума. К этому царству относятся диатомовые, коричневые водоросли, криптомонады и оомицеты.

Можно привести и другие мегатаксономии. Дополнительную информацию по данному вопросу можно найти в работах С.А. Карпова [2005], а также А.О. Фролова и А.Ю. Костыгова [2013]. С конца 30-х по начало 80-х гг. XX в. мегасистематика обогатилась новыми системами, все они сейчас представляют лишь исторический интерес, исключительно как этапы развития взглядов на систему живой природы. Предлагавшиеся разными авторами гипотетические системы живых организмов были типично иерархическими, при этом доминирующим признаком оказывался цитологический. Во всех них общим является то, что в дифференциации макротаксонов доминирует прокариотно-эукариотная дихотомия.

Большинством исследователей в России и за рубежом поддерживается классификация, предложенная Карлом Вёзе. Эукарии – это организмы, содержащие жирные кислоты в ацилдиэстерных мембранных липидах и эукариотные рРНК; домен *Bacteria* включает прокариотные организмы, содержащие диацилглицериновые диэстерные липиды в мембранах и бактериальные рРНК; домен *Archaea* объединяет прокариотные организмы, содержащие изопреноидные глицериндиэфирные или глицеринтетраэфирные липиды и архейную рРНК (см. табл. 2).

Итак, к началу 70-х гг. XX в. в биологии утвердилось представление о существовании на Земле двух форм жизни – прокариотов и эукариотов (в настоящее время в научной литературе часто используется термин “кариоты” без приставки “эу-”). В эти годы проводится интенсивный поиск новых критериев, пригодных для решения вопросов эволюции и систематики живых организмов, получают развитие молекулярно-биологические методы исследования, разрабатывается геносистематика. Особое внимание обращается на характеристики таких информационных макромолекул, как ДНК и РНК, образно названных “внутренними ископаемыми” или “документами эволюционной истории”. В систематике разрабатывается и широко внедряется метод анализа семантид (углублённого изучения сходства строения биополимеров – ДНК, РНК, белков).

Теоретической основой использования в систематике молекулярных характеристик служат следующие положения молекулярной биологии: (1) информационные макромолекулы можно рассматривать в качестве молекулярных хронометров, измеряющих эволюционные взаимоотношения между организмами; (2) филогенетическая информация “записана” в виде последовательностей нуклеотидов в ДНК и РНК или последовательностей аминокислот – в белках; (3) последовательность и число нуклеотидных замен в информационных молекулах отражают историю происхождения и развития организмов.

Основным инструментом систематики бактерий становится сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов рибосомных РНК, дополненный фенотипическими признаками.

Аргументы за использование рибосомных РНК для создания филогенетической системы прокариотов, т.е. для построения единой системы, объективно отражающей родственные отношения между разными группами прокариотов и историю их эволюционного развития (построения эволюционного древа, аналогичного таковому в филогенетических системах высших растений и животных), сводятся к следующему: рибосомы – консервативный элемент клетки, они очень древнего происхождения, рибосомные РНК представлены во всех клеточных формах, генетически стабильны; функции их всегда одинаковы; первичная структура 16S рРНК характеризуется высокой консервативностью; молекула 16S рРНК имеет области как экстремально консервативные, так и вариабельные, что даёт возможность на основании анализа этих областей устанавливать как далёкие, так и близкие родственные отношения между организмами; эти молекулы достаточно велики (1540 нуклеотидов), что делает их анализ статистически достоверным по сравнению с таковым меньших молекул, например, молекул 5S рРНК (120 нуклеотидов, слишком мала, $1,5 \times 10^2$ пар оснований против $1,6 \times 10^3$ в 16S рРНК). 23S рРНК имеет 3300 нуклеотидов и труднее анализируется.

Таким образом, одним из перспективных филогенетических маркеров оказались рибосомные РНК, у которых консерватизм первичной структуры сочетается с постоянством функций и повсеместным распространением, указывающим на древнейшее происхождение. Это 16S рРНК прокариотов и органелл эукариотов и 18S рРНК цитоплазмы эукариотов.

В 1977 г. учёные отдела микробиологии и отдела генетики и развития Иллинойского университета (США), возглавляемого специалистом по генетике микроорганизмов, профессором микробиологии Карлом Ричардом Вёзе (Woese C.R., 1928–2012), сравнили олигонуклеотидные последовательности прокариотных 16S рРНК и эукариотных 18S рРНК у широкого спектра живых организмов и пришли к неожиданным результатам. На основании сравнительного анализа последовательностей этих рРНК были выявлены не две группы организмов, различающихся прокариотным и эукариотным типом организации, а три группы, имеющие различное эволюционное происхождение.

взаимоотношениям и дивергентному разнообразию одноклеточных организмов, обладающих различными типами питания (автотрофия и гетеротрофия).

Будучи потомками единого “избыточного” анцестора, две линии развития – прокариотная и эукариотная – “избрали” для себя индивидуальный способ развития. Прокариотная линия развития дивергировала на две – эубактериальную и архебактериальную.

Представители эубактерий, сохранив пептидогликановую стенку анцестора с включёнными в неё *D*-аминокислотами, “пошли” по пути элиминации избыточного генома (т.е. элиминации из генов интронов, простых последовательностей, упрощения строения рибосом и т.д.).

Представители архей, напротив, сохранив богатый геном, начали эволюцию посредством приспособления к экстремальным условиям жизни и сформировали самостоятельную филогенетическую ветвь с богатым фенотипическим разнообразием, но в то же время и однообразием генотипа.

В связи с вышесказанным В.Н. Гутина считает правомерным отказаться от термина “архебактерии”, как не отражающего филогенетический возраст этих организмов, а присвоить им название “мезобактерии”, как наиболее соответствующее их уровню развития и соотношению с эубактериями и эукариотами.

Что касается эукариотов (если исключить последующие эндосимбиозы), то именно эукариотная цитоплазма в наибольшей мере заслуживает быть названной “архаичной” как наиболее полно сохранившая рудиментарные черты археклетки. В отличие от неё, да и от архей, эубактерии – наиболее “эволюционно продвинутая” линия в том смысле, что эубактерии по сравнению с археклеткой подверглись наиболее радикальным эволюционным преобразованиям. При этом в отличие от архей, у которых эволюции главным образом подвергся фенотип, у эубактерий глубоким изменениям подверглись и генотип, и фенотип. Если генотип эубактерий эволюировал путём элиминации избыточности, “дойдя” до состояния экономно устроенного и активно функционирующего генома, то и фенотип подвергся существенной эволюции.

структурированным слоем. Лишь у одного организма – термоплазмы – клеточная стенка отсутствует. Многие виды архей обладают жгутиками бактериального типа. Из включений у них обнаружены газовые вакуоли, типичные для бактерий, запасное вещество гликоген – комплекс крахмалоподобного полисахарида с белком – соединение, присущее бактериям и эукариотам. По строению клеток, форме, размерам клеток, общим принципам организации и характеру деления клеток архей сходны с бактериями, наиболее близки к грамположительным бактериям: клетка покрыта единственной плазматической мембраной, дополнительная внешняя мембрана, характерная для грамотрицательных бактерий, отсутствует, клеточные стенки различного химического состава, как правило, толстые. Хотя только среди них обнаружены организмы кубической формы. Следует особо заметить, что архей отличаются удивительным разнообразием морфологических форм и ещё недавно в этом смысле считались микробиологической экзотикой.

Несмотря на прокариотный принцип организации клеток архей, Вёзе с соавторами выводят эти организмы из царства прокариотов и выделяют их в новое царство, даже домен, подчёркивая тем самым уровень их организации. Исчерпывающую информацию по данному вопросу желающие могут найти в работах Лены Ивановны Воробьёвой и Бориса Васильевича Громова [Воробьёва, 2007; Громов, 2007].

Уникальные биохимические черты архей:

1. У большинства представителей домена *Archaea* имеется клеточная стенка. Для архей характерно отсутствие в ней пептидогликана (муреина), типичного для клеточных стенок бактерий. Клеточные стенки архей состоят из других биополимеров – кислых гетерополисахаридов (у шаровидных представителей экстремально галофильных архей из филы *Euryarchaeota* – эвриархеоты) или поверхностных белков, образующих наружный S-слой. Ригидный S-слой клеточной оболочки большинства представителей архей образован экзоплазматическими белковыми субъединицами и представляет собой жёсткую сетку из белковых молекул, покрывающих клетку снаружи, подобно кольчуге. Этот слой защищает клетку от физических и химических воздействий,

а также предотвращает контакт макромолекул с клеточной мембраной. Такие археи, как метаногены, имеют клеточную стенку, содержащую псевдомуреин (псевдопептидогликан), демонстрирующий лишь некоторое сходство с бактериальным муреином. Псевдомуреин напоминает пептидогликан бактерий по морфологии, функции и физической структуре, но отличается тем, что вместо обязательного компонента *N*-ацетилмурамовой кислоты в его полисахаридной цепи имеется талозаминуриновая кислота, а в пептидных мостиках отсутствуют аминокислоты в *D*-форме (*D*-аланин, *D*-глутаминовая).

Следует особо отметить, что если у бактерий по строению клеточной стенки выделяются две группы – грамположительные и грамотрицательные бактерии, то археи по данному признаку намного вариабельнее. Для архей характерно многообразие причудливых морфологических форм, напоминающих различные геометрические фигуры (встречающиеся, впрочем, и у бактерий) – шар, цилиндр, спираль, пирамиду, многоугольник, шестилучевую звезду или аморфную каплю, палочки, хоккейную клюшку, сеть с “застывшими” в её отверстиях клетками. Однако у архей имеются особые морфотипы, не обнаруженные у бактерий, – это плоские квадратные пластинки и коробочковидные формы наподобие осколков битого стекла.

Археи относятся к самостоятельному археотному варианту прокариотного морфотипа. Существуют два глобальных морфотипа – эукариотный и прокариотный. Если эукариотный морфотип един в своей основе, прокариотный морфотип гетерогенен и подразделяется на 4 бактериальных морфотипа (основной или грамотрицательный бактериальный морфотип, упрощённый или грамположительный бактериальный морфотип, усложнённый бактериальный морфотип (у цианобактерий) и трихомный морфотип (трихом – квазимногоклеточное образование, т.е. неразветвлённый филаментозный или сфероидный агрегат, в котором клетки окружены общей наружной мембраной и соединены трубчатыми микроплазмодесмами, встречается у представителей фил *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*) и один археотный морфотип (археи не синтезируют липополисахаридов,

“наследство” от анцестора, а эколого-адаптивное приобретение, закреплённое естественным отбором.

Для обозначения гипотетического единого мегаорганизма американским учёным Густавом Каэтано-Анольесом (Caetano-Anolles G.) недавно предложено название “последний универсальный общий предок” (англ. Last Universal Common Ancestor, LUCA). Предполагается, что анцестор состоял из множества отдельных “первоклеток”, не конкурирующих между собой, а обменивающихся необходимыми для существования компонентами и генетической информацией. Считается, что это были крупные полиплоидные клетки с изначальной избыточностью генов, которые обменивались ими за счёт горизонтального переноса информации путём слияния отдельных клеток между собой с последующим их произвольным делением. Идея о мегаорганизме LUCA основана на относительно высоком консерватизме трёхмерной структуры белков, которая в ходе эволюции изменяется не так быстро, как первичная последовательность ДНК. Каэтано-Анольес предпринял поиски общих белков, которые свидетельствовали бы о принадлежности трёх ветвей жизни к всеобщему анцестору. Проанализировав базы данных по белкам, он обнаружил у нескольких сотен различных современных организмов от 5 до 11 % универсальных белков, чья структура как бы законсервировалась в процессе эволюции. Сравнительный анализ генов у клеточных организмов, геномы которых уже расшифрованы, показывает, что практически все они содержат около 60 общих генов [Кунин, 2014]. Считается, что все эти гены, несомненно, были у общего предка и достались ныне существующим организмам в наследство. Эти гены кодируют белки, обеспечивающие наиболее древние и важные для жизнедеятельности клетки функции, биохимическая основа которых сохранилась неизменной до наших дней.

Около 3,0–3,5 млрд лет назад глобальный общий мегапредок (“всемирная ярмарка генов”) разделился на трёх “потомков” – бактерий, архей, а также эукариотов, от которых произошли в последующем многоклеточные организмы (растения, грибы, животные). В дальнейшем этот распад привёл к конкурентным

Гипотеза А. Вайса [Wais, 1986]. Продолжая решать проблему анцестора, Вайс предложил дифференцировать “универсальный анcestor” на 3 адаптированные к среде обитания формы: (1) протоархебактериальные серометаболизирующие термофилы, (2) протоархебактериальные метаногены, (3) протоэубактерии. Все эти формы вместе могли бы, вероятно, рассматриваться как комплексный универсальный анcestor (наилучшим образом приспособленный к эволюции на экосистемном уровне) до того момента, когда каждая из этих систем начала внутреннюю специализацию. По сути, это есть отражение новой полифилетической схемы клеточной эволюции, подразумевающей происхождение групп организмов из нескольких предковых групп.

По гипотезе Вайса, эволюция шла путём упрощения и специализации сложного универсального анцестора, при этом бактериальный геном стал более примитивным после быстрой эволюции и стремительной специализации, в то время как геном эукариотов и архей сохранил черты эукариотного анцестора.

Подытоживая вышесказанное, рассмотрим ещё одну точку зрения на характер предполагаемого анцестора и его соотношения с тремя линиями развития живых существ. В её основе лежит представление, высказанное отечественным специалистом в области истории науки Верой Николаевной Гутиной (Санкт-Петербург, Россия). Рассуждения В.Н. Гутиной [1992а,б] сводятся к тому, что археи не более “*архаичны*”, чем бактерии и эукариотная цитоплазма. Иными словами, археи не являются предковой группой.

При этом первичную клеточную структуру предлагается назвать термином “археклетка” (*син.* прогенот, по Вёзе). В обосновании этой гипотезы используются многочисленные черты, которые сближают археи и эукариоты. По-видимому, унаследовав их (интроны, простые последовательности, гистоноподобные белки в частности) от единого избыточного анцестора, археи продолжили свою эволюцию по пути конвергентного приспособления к экстремальным условиям жизни, формируя свой уникальный фенотип путём приспособлений к резко различающимся условиям жизни. Отсюда – поразительная фенотипическая гетерогенность архей. Иначе говоря, специфика архей – это не

не имеют наружной мембраны, их мембранная система максимально рационализирована и состоит из одной цитоплазматической мембраны).

Среди архей встречаются одноклеточные и многоклеточные формы в виде ветвящихся клеток, мицелиальных ансамблей и т.д. Отсутствием в клеточных стенках архей пептидогликана объясняется их нечувствительность к антибиотикам, нарушающим синтез клеточной стенки у эубактерий – пенициллину, цефалоспориноу, D-циклосерину.

2. Другое важное уникальное свойство архей касается состава их мембранных липидов. Мембрана архей содержит уникальные липиды. Необычность химического строения мембранных липидов архей в том, что в состав их входят не сложные эфиры глицерина и жирных кислот, а простые эфиры глицерина и высокомолекулярных спиртов, образующие однослойную липидную мембрану. По современным представлениям, во всех биологических мембранах липиды расположены в виде бимолекулярного слоя. Этот принцип у архей нарушается, что свидетельствует об особом положении этих организмов среди прочих живых существ. Различным является тип связи между остатками липидов и глицерина. В сложноэфирных липидах связь сложноэфирная, а в эфирных – эфирная. Эфирные связи химически более стойкие, чем сложноэфирные (эстерные). Эта стабильность помогает археям выживать в суровых условиях: при высоких температурах (изопреноидные мембраны сохраняют в широком диапазоне температур от 0 до 100 °С жидкокристаллическое состояние, что необходимо для их нормального биологического функционирования, проницаемость таких мембран для ионов и низкомолекулярных органических веществ также мало изменяется с повышением температуры, в отличие от мембран из “обычных” липидов, у которых она резко возрастает), в сильноокислых и сильнощелочных средах. Бактерии и эукариоты содержат некоторое количество эфирных липидов, но, по сравнению с археями, они не являются главной составляющей мембран.

В целом археи обладают таким же планом строения, что и бактерии упрощённого или грамположительного морфотипа. Однако у этих прокариотов липидный матрикс цитоплаз-

матической мембраны состоит из уникальных липидов – липидов, содержащих простую эфирную связь. Как и у грамположительных бактерий, у них отсутствует наружная мембрана. По отношению к археям может быть использован термин “квазиграм-положительный” морфотип.

3. Жгутики архей работают так же, как и у бактерий: их длинные нити приводятся в движение вращательным механизмом в основании жгутика. Этот механизм работает за счет трансмембранного протонного градиента. Тем не менее жгутики архей существенно отличаются от бактериальных по строению и способу сборки. Если каждый бактериальный жгутик состоит из одной молекулы белка флагеллина, то в отличие от бактериальных жгутиков жгутики архей синтезируются иначе и состоят из нескольких белков-флагеллинов.

4. Имеются различия и в составе аппаратов трансляции и транскрипции. Фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза, осуществляющая процесс транскрипции т, м, рРНК, у архей отличается по субъединичному составу и чувствительности к антибиотикам от РНК-полимераз эубактерий. РНК-полимераза архей отличается структурной сложностью, в ее состав входит от 9 до 12 отдельных субъединиц, тогда как у бактерий РНК-полимераза состоит из 4–8 субъединиц.

Рибосомы архей уникальны. По форме и свойствам они занимают промежуточное положение между рибосомами бактерий и эукариотов. В отличие от рибосом бактерий не ингибируются такими антибиотиками, как хлорамфеникол (левомицитин) и стрептомицин (аминогликозид), подавляющими синтез белка на 70S рибосоме. 30S субъединица рибосом архей содержит больше белка по сравнению с аналогичной бактерий, которая имеет 12 специфических рибосомных белков.

5. Особенность строения транспортных РНК архей заключается в том, что они лишены некоторых модифицированных оснований, характерных для бактерий. У метаногенов в тРНК отсутствует (характерная для всех бактерий последовательность) риботимидин в тимидин-псевдоуридин-цитидин петле (ТΨС-петле, псевдоуридин сокращённо обозначается греческой буквой пси – Ψ), он заменён на другие основания, в частности псевдоурацил.

пройдя по пути увеличения в размерах и усложнения. Таким образом, отождествлённая Серси с анcestorом экзотическая термоплазма и эукариоты пошли по разным эволюционным путям.

Гипотеза О. Кандлера. Гипотезу Серси и Уотли поддерживает известный учёный-эволюционист Отто Кандлер (Kandler O.). Он считает, что анcestor как бактерий, так и архей не имел чёткой клеточной стенки. *“Именно термоплазма в отличие от эубактериальной микоплазмы олицетворяет собой первичную клетку организма без клеточной стенки”*. По Кандлеру, обнаружение эукариотных черт у архей определило их кандидатуру на возможную роль в качестве анcestора всех 3 линий развития. Учёный допускает, что универсальный анcestor не был *“простым примитивным организмом”*, а скорее всего, был *“идентичным современной эукариотной цитоплазме”* [Kandler, 1994]. Это приводит к предположению, что архей не развили свои эукариотные черты по мере эволюции, а “получили” их от эукариотоподобного анcestора, компоненты которого должны быть космополитичными по своей природе [Woese, 1998].

Гипотеза Д.А. Прангишвили. Обсуждая вопрос о причинах наличия в генах архей некоторых типов последовательностей, считавшихся ранее атрибутом только эукариотного гено-типа, грузинский молекулярный биолог Давид Александрович Прангишвили [1989] полагает, что *“вряд ли следует их считать результатом совершенствования молекулярной организации клеток при эволюционном переходе от прокариотов к эукариотам. Наличие интронов, повторяющихся последовательностей могло быть характерным для генома уже на ранних стадиях его формирования и совершенствования”*. При этом обсуждается возможная роль другой архей в качестве “прообраза” анcestора, а именно серозависимого (использует в качестве доноров электронов H₂S и S) сульфолобуса *Sulfolobus* – термоацидофила, обитающего в горячих кислых источниках при 80 °С, окисляющего серу до сульфата. По-видимому, эукариотная цитоплазма в высшей степени сходна с современными серозависимыми археями. Отмечается, что в филогенетическом плане *Thermoplasma* и *Sulfolobus* ближе к эукариям, тогда как метаногены и галофилы – к бактериям.

Взгляды Вёзе с соавторами были положены в новую схему клеточной эволюции, известной под названием полифилетической. Согласно этой теории, от общего гипотетического предка (прогенота, протоклетки) обособились 3 различные самостоятельные ветви: эубактерии, архебактерии (археи) и эукариоты, представляющие собой ядерно-цитоплазматический компонент эукариотов, включивший в себя в качестве эндосимбионтов представителей разных групп эубактерий, превратившихся в митохондрии и хлоропласты (см. рис. 11). С точки зрения иерархической систематики эти ветви Вёзе предложил рассматривать в качестве доменов (или надцарств): бактерии, археи, эукарии.

Проблема анcestора

Проблема анcestора породила множество гипотез о его природе (цит. по Гутиной, 1992а). Рассмотрим некоторые из них.

Гипотеза термоплазменного анcestора Д. Серси и Ф. Уотли [Searcy, Whatley, 1984]. Согласно этой гипотезе, анcestор имел клетку большой величины, был наделён избыточным геномом (интронами и повторяющимися последовательностями), имел истинные гистоны. По версии авторов, современная бактериальная клетка – это продукт отбора на регуляторную экономию и ускоренный темп роста, а также продукт элиминации (устранения) избыточного генетического материала. Предполагается, что первичная клетка была избыточной по всем параметрам, за счёт чего и была наделена высокими потенциальными способностями к адаптивной эволюции. В соответствии с этим предположением возникает вопрос: “Кто из современных представителей может претендовать на роль первичного анcestора?”. С точки зрения Серси и Уотли, именно такой путь прошла микоплазменная архея *T. acidophilum* – аэробная, хемоорганотроф, термоацидофильная, растёт при 59 °С, рН 1–2, не имеет клеточной стенки. В современном виде она несёт черты редукции, став проще и специализированнее, чем общий клеточный анcestор. Вместе с тем именно избыточность генома позволила ей адаптироваться в экстремальных условиях горячих и кислых источников, в то время как эукариотная клетка “избрала” для себя альтернативную стратегию,

6. Многие археи способны к осуществлению биохимических процессов, не свойственных никаким другим организмам. Они дышат серой или железом, окисляя молекулы водорода и используя углекислоту в качестве единственного источника углерода. Только определённая группа архей в процессе жизнедеятельности образует метан (метаногены). Метаногены обитают в анаэробных средах, таких как болота, возможно даже, что первый свободноживущий организм был метаногеном. Обычная для этих организмов биохимическая реакция представляет собой окисление водорода с использованием углекислого газа в качестве акцептора электронов. Метаногенами в качестве альтернативных акцепторов электронов могут использоваться такие органические соединения, как спирты, уксусная и муравьиная кислоты.

Для метаногенеза необходимо наличие уникальных кофакторов, не встречающихся у других существ (известные коэнзимы у бактерий: липоевая кислота, витамин В₁₂ и коэнзим Q). На сегодня описаны три кофермента, являющиеся переносчиками электронов и участвующие в механизме метанообразования: кофермент М (КоМ, СоМ, 2-меркаптоэтансульфоновая кислота), являющийся переносчиком метильных групп, так называемый метилирующий кофактор, выделяющийся исключительно высоким содержанием серы: HO₃S-CH₂-CH₂-SH (меркаптоэтансульфонат); кофермент, обозначенный символом F₄₂₀, или 8-гидрокси-5-деазофлавин, который является переносчиком электронов с низким потенциалом, и кофактор переноса C₁-групп.

Для архей характерны другие новые типы метаболизма: у галофилов обнаружен новый путь фотосинтеза, при котором квант света поглощается не хлорофиллом, а пигментным белком – бактериородопсином, реализующим фотохимический процесс генерации энергии.

7. Археи расположены близко к корню филогенетического дерева и представляют одну из наиболее простых форм жизни. Полный геномный сиквенс архей показал, что их хромосома состоит из 1,6–2,5 млн пар нуклеотидов (пн). Для сравнения: хромосома кишечной палочки *E. coli* насчитывает 4,6 млн пн, геном дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – 12 млн пн, а геном человека

– 2910 млн пн. Чрезвычайно малый размер генома архей указывает на небольшое число генов и кодируемых ими белков, что служит признаком очень простой формы жизни. Например, у метаногена *Methanobacterium thermoautotrophicum* он составляет 1/3 генома *E. coli* ($1,1 \times 10^9$ Да по сравнению с молекулярной массой генома *E. coli* $2,7 \times 10^9$ Да), а размер генома *Thermoplasma acidophilum* не превышает $0,8 \times 10^9$ Да. В связи с этим археи могут служить идеальным объектом для изучения и понимания основных принципов и механизмов жизни.

8. Для архей характерно отсутствие важнейших белковых компонентов, участвующих в окислении водорода, – цитохромов и хинонов (менахинонов и убихинонов). Для них характерны уникальные хиноны – калдариеллохиноны, термоплазмахиноны.

9. Большинство архей – экстремофилы, т.е. развиваются в экстремальных условиях при высоких температурах, кислотности, в насыщенных солевых растворах. Так, для архей характерно наличие гипертермофилов. Их термофилы – рекордисты среди живых существ по способности расти при высоких температурах. Есть метаногены, растущие при температурах свыше 100°C . Причём оптимумом для них является температура 105°C , а при 80°C они уже не могут расти. Недавно описаны формы, развивающиеся при $250\text{--}300^\circ\text{C}$ в среде при давлении, равном 265 атм. Они обитают на больших глубинах (2500 м) на дне океана в горячих сульфидных водах, выходящих со дна в виде так называемых чёрных гейзеров. Механизмы крайне высокой термостойкости архей и составляющих их макромолекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот) до сих пор ещё полностью не расшифрованы.

Экстремофильные археи относятся к 4 главным физиологическим группам: галофилам, термофилам, ацидофилам (кислотоустойчивые) и алкалифилам (щелочеустойчивые). Эти группы нельзя рассматривать в ранге самостоятельных таксонов. Некоторые археи относятся одновременно к нескольким группам. Так, галофилы, включая представителей рода *Halobacterium*, живут в экстремально солёных средах (солёных озерах при минерализации больше 20–25 %) и превосходят по численности своих соседей – бактерий. Термофилы лучше всего растут при температу-

рРНК. Оказывается, что физическая организация генов архей имеет истинно бактериальный тип.

Известно, что у всех бактерий гены рибосомных РНК скомпонованы в один оперон в следующем порядке: $5' - 16\text{S} - 23\text{S} - 5\text{S} - 3'$ и транскрибируются в виде единого транскрипта.

В ядре эукариотов гены трёх рибосомных РНК эукариотного типа: 5,8S, 18S, 27S и соответственно транскрибируются в порядке: $5' - 27\text{S} - 5,8\text{S} - 18\text{S} - 3'$. При этом весь оперон транскрибируется РНК-полимеразой-I, а ген 5S рРНК – другой РНК-полимеразой-III.

Таким образом, разброс эукариотных и бактериальных черт создаёт картину смешанного (мозаичного) генома архей. Причем, степень “эукариотности” и “эубактериальности” существенно различна у разных представителей архей. Эта разнородность может иметь эволюционное происхождение.

Вёзе пишет в своих статьях [1987, 1998]: “Археи как третья форма жизни революционировала наши знания о прокариотах, изменила и расчистила путь нашим мыслям о родстве прокариотов и эукариотов и будет оказывать сильное влияние на представление о предке, который восходит ко всей существующей жизни. Различия между археями и эубактериями – количественные и качественные – столь велики, что две эти группы должны рассматриваться как отдельные – первичные линии развития, каждая из которых исходит непосредственно от универсального анцестора”.

В 1998 г. Вёзе выдвинул концепцию “универсального предшественника” всех живых существ на Земле. Он считал, что “анцестор был не прокариотным, скорее, это был простейший тип организма”, который был назван Вёзе прогенотом [Woese, 1987, 1998; Woese et al., 1990]. Предшественники современных организмов представляли собой сообщество примитивных особей, лишённых полноценной внешней мембраны, препятствующей свободному обмену генетического материала между ними. Мир прогенотов с высоким уровнем мутаций и свободно обменивающимися генами должен был отличаться высокой скоростью эволюции в клеточные формы жизни.

Ещё одно недавно выявленное эукариотное свойство архей – наличие в их генах, кодирующих тРНК, интронов, представляющих собой некодирующие области генов – функционально пасивные последовательности, прерывающие экзоны (активные последовательности трёх видов РНК – транспортных, информационных (матричных) и рибосомных).

До определённого момента считалось, что присутствие интронов в генах – исключительная монополия эукариотов, а сам факт их наличия оценивался как чёткий эукариотный признак. В 1983 г. сотрудники из лаборатории профессора Вёзе открыли мозаичную, т.е. экзонно-интронную структуру генома у серозависимых экстремальных термофилов. В генах транспортной РНК этих архей были обнаружены черты подлинно эукариотных генов: отсутствие 3'-концевой терминальной ЦЦГ-последовательности, всегда имеющейся в генах тРНК бактерий и наличие коротких интронов.

У архей обнаружен так называемый гистон нТа, идентичный истинным гистонам высших эукариотов. У метаногенов выявлены гистоноподобные белки, по ряду свойств отличающиеся от гистоноподобных белков бактерий и от истинных гистонов эукариотов. Интересно отметить существенную гетерогенность выявленных гистоноподобных белков у различных представителей архей по сравнению с консервативностью таковых у бактерий и эукариотов.

Всё вышесказанное свидетельствует об особом пути эволюционного развития архей, по-своему “распорядившихся” теми компонентами ядерного аппарата (генома), которые они (как и эукариоты, и бактерии) унаследовали от общего анцестора.

В то же время можно предполагать, что избыточный геном (включающий интроны, повторяющиеся последовательности, гистоноподобные белки) – это не следствие усложняющейся эволюции, а, напротив, первичный признак, свойственный анцестору. В последующей эволюции “судьба” генома каждой из трёх филогенетических линий сложилась самостоятельно: каждая “избрала” для себя свой путь.

Однако “блеск эукариотности” архей тускнеет, когда проводится сравнительный анализ генов, кодирующих 16S, 23S и 5S

рах свыше 45 °С в таких местах, как горячие источники; для гипертермофилов оптимальная температура 80 °С и выше. Например, штамм *Methanopyrus kandleri* 116 растёт при температуре 122 °С, рекордно высокой для всех организмов.

Другие археи обитают в суперкислых или щелочных средах. Наиболее устойчивый ацидофил *Picrophilus torridus* растёт при pH 0, что эквивалентно 1,2 М серной кислоте. Устойчивость к экстремальным условиям внешней среды сделала архей центральной темой в обсуждениях возможных форм жизни на других планетах. Некоторые среды, в которых обитают экстремофилы, не сильно отличаются от таковых на Марсе, что наводит на мысль о возможном переносе таких устойчивых микроорганизмов между планетами на метеоритах.

Археи обитают в местах с низкими температурами. Встречаются в холодных водах полярных морей. Огромное количество архей обнаружено повсеместно в океанах в составе планктона. Некоторые морские кренархеоты способны к нитрификации, и они, вероятно, оказывают влияние на океанический круговорот азота. Большая численность архей обнаружена у побережья Антарктики, они составляют более 34 % биомассы прокариотов. Археи являются симбионтами в желудочно-кишечном тракте животных. Долгое время считалось, что прокариотный домен *Archaea* охватывает в основном экстремофильные организмы (гипертермофилы, экстремальные галофилы и абсолютные анаэробы). Сейчас известно, что археи повсеместно присутствуют в изобилии во многих умеренных средах, в том числе в аэробных морских и пресных водах. Тогда как члены домена *Bacteria* играют важную роль в экстремальных средах, таких как горячие источники, обычно считающиеся провинцией *Archaea*.

10. Открытие нового мира прокариотов не могло не поставить перед учёными естественного вопроса: “Нет ли среди архей патогенных для людей и животных форм?”. Убедительных доказательств прямой патогенности архей пока не получено. Среди архей не описан ни один штамм как патогенный (как явный возбудитель инфекций). Археи устойчивы к огромному числу антибиотиков, продуцируемых грамположительными бактериями. Установлено, что эти антибиотики действуют главным образом

на гены, которые отличают бактерий от архей. В связи с этим выдвинута гипотеза о том, что давление отбора в направлении формирования устойчивости к антибиотикам, синтезируемым грамположительными бактериями, привело к существенным изменениям в структуре генов-мишеней антибиотиков у некоторых микроорганизмов, которые стали общими предками современных архей [Cavalier-Smith, 2002; Gupta, 2005]. Предполагаемая эволюция архей под действием антибиотиков и других неблагоприятных факторов также может объяснить их адаптацию к экстремальным условиям, таким как повышенные температуры и кислотность, как результат поиска ниш, свободных от продуцирующих антибиотики организмов. У архей не обнаружено активных биопродуцентов гидролитических ферментов (слабая протеолитическая и амилолитическая активность обнаружена лишь у отдельных представителей галофилов). Способность использовать экзогенные органические вещества ограничена у архей простыми соединениями: органическими кислотами, спиртами, метиламинами. У некоторых представителей архей обнаруживаются отдельные факторы патогенности, что свидетельствует об актуальности проведения соответствующих исследований. Эти ограничения эволюции архей ещё предстоит выяснить.

Таким образом, в результате исследований физиологии и биохимии архей, в первую очередь метаногенов, стала очевидной их неординарность по сравнению со всеми другими бактериями. Недаром Вёзе писал, что *“они имеют множество интригующих свойств, они беспредельно удивляют нас, они совершенно другие”* [Woese, 1987].

Генотип архей

Углублённое изучение архей выявило у них наряду с прокариотными и ряд эукариотных черт. По мнению Вёзе, *“...хотя они относятся по цитологическим признакам к прокариотам, они ближе к эукариотам”* [Woese, 1994]. В отличие от эубактериального сходства, эукариотное распространяется на геном. Специфика генома архей, свидетельствующая о наличии в нём типично эукариотных черт, чётко прослеживается по следующим параметрам: наличие некоторых типов последовательностей в генах тРНК и рРНК, интронов, гистоноподобных белков

различного типа, а также определённая организация генов рибосомных РНК.

Большинство генов эукариотов как бы “разорваны” на несколько кодирующих участков (экзонов). Экзоны разделены находящимися между ними некодирующими последовательностями. Внутри генов эукариотов всегда бывают участки, которые не кодируют ни полипептиды, ни стабильные РНК. Эти участки назвали интронами (от англ. “intervening zone”) – зона, “перемежающая” смысловую последовательность гена. А кодирующие участки были названы экзонами (от англ. “expressing zone”) – экспрессируемая зона гена. Во многих случаях каждому экзону соответствует домен – часть белковой молекулы, обладающая относительной завершённостью и независимостью. Другими словами, интрон – участок ДНК, который является частью гена, но не содержит информации о последовательности аминокислот белка. Интроны – это участки ДНК, копии которых удаляются из первичного транскрипта и отсутствуют в зрелой РНК. Интроны характерны для всех типов эукариотной РНК, но также найдены в рибосомной РНК (рРНК) и транспортной РНК (тРНК) прокариотов.

Особенность геномов архей – наличие в них многократно повторяющихся нуклеотидных последовательностей, что характерно для хромосомной ДНК эукарий. Так, в геноме экстремального галофила *Halobacterium halobium* обнаружены повторяющиеся последовательности в количестве 500.

Различают три основных класса повторяющихся последовательностей: (1) рассеянные по геному умеренно повторяющиеся последовательности длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч пар нуклеотидов; (2) блоки относительно простых и коротких повторяющихся элементов – простые последовательности, состоящие из одного нуклеотида и двух tandemно повторяющихся последовательностей длиной в 15–50 пар нуклеотидов; (3) интроны – вставочные последовательности, которые хотя и транскрибируются, но не определяют структуру белка, выполняя лишь регуляторную функцию. У эубактерий повторяющиеся последовательности не обнаруживаются.

спор (например, *Microbispora*, Lechevalier, Lechevalier, 1957; *Saccharomonospora*, Nonomura, Ohara, 1971; *Microtetrastroma*, Thieman et al., 1968; *Microspolyspora*, Lechevalier et al., 1961). Кроме того, оказалось, что число спор у моноспоровых и других актиномицетов детерминировано вообще нечётко.

Это были времена, когда предлагалось проводить установление родовой принадлежности ряда актиномицетов только на основании изучения их биохимических, физиологических и серологических свойств, а морфологические особенности вообще не рассматривать.

Техника и методы идентификации прокариотов

С практической точки зрения очень важно, чтобы число таксономических признаков и методов, применяемых для идентификации бактерий, ограничивалось минимумом. Сегодня предложены сотни характеризующих тестов, но микробиологу необходимо отобрать из них те, с помощью которых можно было бы быстро, просто и объективно идентифицировать тот или другой исследуемый микроорганизм.

Например, идентификация интенсивно изучаемой в ИЭГМ УрО РАН группы микроорганизмов – актинобактерий рода *Rhodococcus* – крайне сложна по тем схемам, которые приведены в современных определителях и включают огромное количество признаков. В результате многолетних исследований была разработана оптимальная схема видовой идентификации родококков, основанная на использовании ограниченного числа признаков, выявленных в результате нумерического анализа. Использование 50 вместо 120 фенетических признаков позволяет дифференцировать родококки на уровне вида. Эта оптимизированная схема видовой дифференциации родококков включает в качестве диагностических маркеров таксономически значимые антибиотики, свободные жирные кислоты, характеристики ряда клеточных белков. С помощью разработанной схемы проведена не только ревизия всего массива выделенных (около 3 тыс. коллекционных культур) штаммов, но и реклассифицированы или вновь идентифицированы культуры, полученные из других коллекций, в том числе Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (National Collection of Industrial, Food and Marine

Подтверждением этого может служить наличие двух чётко выраженных линий развития в эубактериальном сообществе: грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также уникального разнообразия энергетического и конструктивного метаболизма (8 типов трофии), а также широчайшая, сравнимая лишь с археями, экологическая приспособляемость к разнообразным условиям обитания.

Всё сказанное может быть отражено в виде ещё одной схемы макротаксономии, отражающей сетевую структуру эволюции органического мира (рис. 13). Два главных её композиционных элемента – это два макротаксона – прокариотов и эукариотов. Остальные её структурные компоненты – это занимающие некое промежуточное положение таксоны или линии развития: в пределах прокариотного таксона – эубактерии и археи; в пределах эукариотного таксона – эукариотная цитоплазма и мезокариоты (динофлагелляты – упрощённое ядро, отсутствие гистонов; микроспоридии – истинное ядро, но нет митохондрий, рибосомы бактериального типа). Смешанность фенотипов и общность генотипов по наиболее фундаментальным признакам предполагают, во-первых, единство клеточного анцестора (археклетка), во-вторых, что ни один из них не находится в изолированном положении.



Рис. 13. Схема макротаксономии, согласно представлениям В.Н. Гутиной [1992а]

Схема по своему замыслу альтернативна традиционной монофилитической концепции клеточной эволюции, согласно которой первая клетка была прокариотной, а эукариотная произошла путём сериальных эндосимбиозов.

клеток понимают соответствующее перемещение дочерних особей, приводящее к их обособлению, после образования перегородки в материнской клетке. Исходная кокковидная клетка удлиняется, в ней образуется перегородка, и дочерние палочковидные особи разъединяются разными способами.

Известно три основных способа разъединения дочерних клеток после деления: простой (скользящий) (*slipping*); путём внезапного раскалывания (*snapping*) и путём сгибания (*bending*). По наличию *bending*- или *snapping*-способов обособления клеток, приводящих к образованию V- или Y-форм, например, дифференцируются коринеподобные бактерии на уровне рода. V-формы обнаруживаются не только у коринеподобных бактерий, но и у бацилл и флавобактерий. Этот факт является подтверждением необходимости анализа всего комплекса признаков, характеризующих морфологические особенности культур, а не какого-либо одного. Способы обособления клеток исследуют в специальных термостатируемых микрокамерах при помощи фазового контраста в световом микроскопе.

При идентификации и классификации бактерий часто используют и данные об ультраструктуре клеток, которые получают с помощью электронного микроскопа. Электронный микроскоп пока не стал повседневным инструментом отечественного бактериолога, но там, где доступен, он даёт ценную информацию, в частности, о структуре клеточной стенки, способе и месте прикрепления жгутика, соответствующих клеточных включениях и о других таксономически полезных деталях. Именно с помощью электронного микроскопа был сделан важный вывод о прокариотной и эукариотной организации живых существ.

К концу 60-х гг. XX в. ценность морфологических признаков стала подвергаться сомнению в силу ряда причин. Одна из них состоит в том, что к данному периоду времени было описано большое количество новых форм актиномицетов, характер морфологии которых оказался переходным между резко различными морфологическими типами, составляющими ранее чётко обособленные роды. Так, например, между актиномицетами, образующими одиночные споры (*Micromonospora*, Oerskov, 1923), и актиномицетами, образующими споры в цепочках (*Streptomyces*, Waksman, Henrici, 1943), появился ряд форм, у которых образуются, помимо одиночных спор, пары и цепочки

таксономия предполагает только те процедуры, которые основаны на анализе продуктов генов, а не самих генов, анализ которых сохраняется за традиционной геносистематикой.

Во втором случае речь идёт о традиционном морфобиологическом критерии. В микробиологии морфобиологический критерий в течение довольно длительного времени пользовался репутацией достаточно надёжного дескриптора. Так, известные русские микробиологи Василий Леонидович Омелянский (1867–1928), Сергей Николаевич Виноградский (1856–1953) в начале XX столетия считали, что истинно научная, т.е. естественная, систематика может быть построена лишь на данных морфологии. Датский бактериолог Орла-Йенсен в своей монографии “Главные линии естественной бактериальной систематики”, опубликованной в 1909 г., пишет о том, что *“разделение живых существ должно проводиться не столько в соответствии с внешней формой, сколько с их внутренними свойствами”*. Действительно, в его систематике большинство родов известных к тому времени микроорганизмов было идентифицировано по биохимическим критериям, а таксоны более высокого ранга (семейства) – по морфологическим.

Наиболее полным выражением “морфологической традиции” в систематике бактерий считалась монография Николая Александровича Красильникова “Лучистые грибки” [1970]. Красильников до конца своей научной деятельности оставался морфологистом и весьма осторожно относился к переключению методологии таксономии на молекулярный уровень.

Для классификации и характеристики родов актиномицетов им были предложены такие признаки, как подвижность клеток, способ деления мицелия, фрагментация мицелия, наличие воздушного и/или субстратного мицелия, наличие спор, способ образования спор и число спор, и многие другие морфологические признаки. Всего 16 признаков.

У грамположительных бактерий, как правило, видна поперечная перегородка, в то время как у грамотрицательных бактерий образуется перетяжка, видимая под микроскопом. Важной морфологической характеристикой нокардиоподобных актиномицетов является, например, не только наличие характерного цикла развития бактериальных клеток, но и определённых типов (способов) разъединения клеток. Под способом разъединения

Но она не согласуется и с теми предположениями, в соответствии с которыми археи не представляют собой самостоятельной линии, а происходят от древних примитивных бактерий, являющихся предковыми по отношению к другим прокариотам. Согласно этим вопросам, различие в строении 16S рРНК эубактерий и архей объясняется повышенной скоростью эволюции архей.

Схема существенно отличается и от прогенотной гипотезы Вёзе, трактующей прогенот как некий рудиментарный фенотип, более примитивный, чем современные прокариоты; наиболее близким его потомком считаются археи.

Следует особо заметить, что методология конструкции предложенной схемы макротаксономии характеризуется тем, что базируется она не столько на различиях, сколько на сходствах. Сходство рассматривается главным образом генотипическое (генеалогическое), т.е. унаследованное от анцестора, а различие, проявляющееся преимущественно на фенотипическом уровне, оценивается как адаптивно-приспособительное.

Согласно этой схеме макротаксономии, первичная (анцесторная) клетка имела избыточный геном, черты которого унаследовали все её прямые потомки. Если одна из линий развития – прокариотная (эубактериальная и археи) – продолжила свою эволюцию путём элиминации избыточного генома и одновременно посредством приспособительной метаболической эволюции, то эукариотная линия развития, сохранив избыточный геном, “избрала” для себя путь морфобиологического усложнения, достигнув структурно-организационного и регуляторного совершенства.

“Судьба” двух ответвлений (эубактерий и архей) прокариотной линии сложилась по-разному. Эубактерии, предельно элиминировав свой геном, утратили и способность адаптироваться к сверхэкстремальным условиям среды путём выработки соответствующего фенотипа. Отсюда характерная для эубактерий мезофилия, хотя некоторые эубактерии и приобрели способность жить в относительно экстремальных условиях. В отличие от эубактерий, археи более бережно “обошлись” со своим геномом. За счёт сохранения некоторой его избыточности они получили возможность к адаптации к суперэкстремальным условиям.

Этим их эволюция отличается от эволюции эукариотов: эукариоты использовали потенциальные возможности своего генома для достижения прогресса на пути к морфофизиологическому совершенству.

Другое предположение состоит в том, что прямые потомки анцестральной клетки продолжили свою эволюцию, не последовательно заменяя друг друга, т.е. “вытесняя наименее приспособленных”, а одновременно, в виде целостного биоценоза, структурные компоненты которого – отдельные экосистемы, составленные из представителей разного уровня организации. Осваивая различные экологические ниши, они приспособлялись к ним свой фенотип, одновременно сохраняя фундаментальные черты “предка” – структуру генома, генетический код, конструкцию и механизмы функционирования аппарата синтеза белка и т.д. Находясь между собой в неразрывном взаимодействии, как генетическом, так и трофическом, представители единого биоценоза не только совместно существовали, но и взаимно обогащали друг друга, активно формируя и одновременно преобразуя окружающую среду.

Именно таким одновременным функционированием “всего живого”, т.е. биосферы, по В.И. Вернадскому, можно объяснить протекание глобального круговорота веществ в природе. Предложенная схема макросистемы трактует эволюцию в эколого-биосферных понятиях, а саму структуру органического мира как “*один живой организм биосферы*”, по выражению Вернадского [2004].

Лекция 9. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Микроорганизмы – самая обширная по количеству представителей группа, члены которой распространены повсеместно. Несмотря на это, мир микроорганизмов во всём его разнообразии ещё далеко не познан. В настоящее время описано несколько тысяч видов микроорганизмов, однако, по данным, полученным с помощью методов молекулярной биологии (амплификация, разделение и секвенирование генов, кодирующих 16S рРНК), это составляет всего лишь менее 1 % всех микроорганизмов, реально существующих на Земле. С развитием молекулярных методов иссле-

ного определителя для идентификации всех грибов не существует, поэтому вначале определяется класс или порядок идентифицируемого гриба и далее пользуются соответствующим определителем для данного класса или порядка.

Идентификация дрожжевых грибов, которые относятся к числу наиболее широко используемых объектов разных микробиологических исследований, основана на культуральных (макроморфологических), цитологических, физиолого-биохимических особенностях, характеристике жизненных циклов и полового процесса, специфических признаках, связанных с экологией, и проводится с использованием специальных определителей для дрожжей.

В основе систематики микроскопических форм водорослей лежат строение их клеток и состав пигментов. Определение систематического положения простейших проводится с использованием морфологических особенностей и жизненных циклов. Таким образом, идентификация эукариотов базируется главным образом на особенностях их морфологии и циклов развития.

Идентификация прокариотов (бактерий и архей), которые морфологически менее разнообразны, чем эукариоты, основана на использовании широкого спектра фенотипических, а во многих случаях и генотипических признаков. Она в большей степени, чем идентификация эукариотов, основывается на функциональных признаках, поскольку большинство бактерий можно идентифицировать не по их внешнему виду, а только выяснив, какие биохимические процессы они способны осуществлять.

Существуют различные приёмы фенотипического (фенетического) анализа, те, которые сейчас признаются достаточно репрезентативными, и те, полезность которых сегодня признана сомнительной, утратившей своё первоначальное значение.

В первом случае речь идет о той методологии таксономии, которая получила наименование “хемотаксономия”. Хемотаксономия предполагает детальное изучение химического состава и структуры отдельных компонентов бактериальной клетки, например, определение таких дифференцирующих клеточных компонентов, как сахара, аминокислоты, различные липиды, в частности жирные кислоты, фосфолипиды и т.д. Хемотаксономия

кокковидная цианобактерия *Eosynococcus* из породы возрастом 2,3 млрд лет (оз. Белчер в Гудзоновом заливе) абсолютно похожа на современную кокковидную водоросль *Gloeotheca*.

Уже в течение первых нескольких миллионов лет жизни на Земле в результате эволюции появились морфологически и физиологически разнообразные микроорганизмы. С тех пор в результате эволюции появилось экстраординарное разнообразие микроорганизмов – бактерии, археи и эукариоты, которые населяют нашу планету сегодня. Помимо микробной жизни в результате эволюции примерно 600 млн лет назад появились “высшие формы жизни” – растения и животные, которые образуют купол эволюционного дерева. Неудивительно, что микробный мир столь разнообразен, принимая во внимание то, что микроорганизмы эволюционировали в течение более 3,8 млрд лет, по сравнению с 0,6 млрд лет эволюции растений и животных.

Надо заметить, что ни одна попытка создания любой (естественной или искусственной) диагностической системы не обходится без первого её этапа – идентификации форм в соответствии с классическими критериями фенотипического (фенетического) анализа. Сегодня, несмотря на широкое применение молекулярно-генетических методов, систематика бактерий остаётся пока в значительной степени основанной на фенотипических признаках.

К традиционным критериям фенотипической систематики относятся морфологические, физиолого-биохимические и экологические. При этом принципы классификации и идентификации разных групп прокариотов и эукариотных микроорганизмов имеют существенные различия: идентификация грибов до классов, порядков и семейств основана на характерных чертах строения и способах образования половых клеток (структур). Кроме того, используются характеристика бесполовых спороношений, строение и степень развития мицелия (зачаточный, хорошо развитый, септированный или несептированный), культуральные (колония) и физиологические признаки.

Дифференциация родов внутри семейств и идентификация видов проводятся с применением морфологических признаков, полученных с использованием электронной микроскопии, а также физиологических и культуральных особенностей. Еди-

дования микроорганизмов стало очевидно, что более 99 % микроорганизмов из природных экосистем невозможно культивировать в лабораторных условиях.

В настоящее время наблюдается лавинообразный рост числа ещё вчера неизвестных родов и видов микроорганизмов. Если скорость идентификации новых видов будет оставаться на современном уровне, то для описания и классификации всех животных понадобится 30 лет, всех растений – 50 лет, а всех микроорганизмов – 10 тыс. лет. В связи с этим для познания многообразия микробов на Земле перед микробиологами стоит задача ускорения процесса выделения, идентификации и классификации новых, ещё не открытых микроорганизмов, в том числе некультивируемых форм.

Один из наиболее сложных и в то же время самых интересных аспектов в микробиологической работе – это попытка экспериментально идентифицировать неизвестный микроорганизм. Вы выделили культуру, единственная информация, которой вы располагаете в начале работы, – это сведения, относящиеся к источникам выделения и среде обитания (географии) этой культуры. Всю последующую информацию, необходимую для идентификации культуры до рода и вида, придётся получить в ходе независимого исследования её фенотипических и генотипических характеристик. Прокариотные организмы, принадлежащие к одному виду, имеют общие структурные, физиологические и экологические признаки, которые могут быть определены экспериментально или предсказаны в результате биоинформатического анализа геномных последовательностей. Для того чтобы минимизировать значимость единичных изменений, вызванных горизонтальным переносом генов, необходимо учитывать максимально возможное число фенотипических (морфологических, химических, метаболических, экологических) характеристик [Rosselló-Móra, Amann, 2015].

Говоря о геномных методах (см. лекцию 5), следует привести слова Г.А. Заварзина и Н.Н. Колотиловой: “...создаётся впечатление, что разнообразие бактерий по одному гену малой рибосомальной субъединицы гораздо больше разнообразия, установленного по функциональным характеристикам. Мало надежды и на полное секвенирование ДНК с установлением

функционально значимых генов: вполне может возникнуть ситуация комбинаторики по тысяче признаков» [Заварзин, Колотилова, 2001].

В связи с этим возникает необходимость широкого применения фенотипических признаков для идентификации микроорганизмов. Фенотипические методы в большинстве случаев являются менее трудоёмкими, более дешёвыми и быстрыми, при этом не менее информативными, чем геномные. Главные их недостатки – зависимость фенотипа от условий культивирования и хранения микроорганизмов, а также высокая вариабельность многих фенотипических признаков среди микроорганизмов одного вида.

Таксономические признаки

Существует несколько подходов к анализу фенотипических признаков: (1) классический фенотипический анализ; (2) нумерическая таксономия, включающая компьютерную обработку 100–200 признаков; (3) хемотаксономия (изучение химического состава клеточных стенок, липидов, а также полиаминов); (4) типирование фенотипа, а именно серологическое типирование, получение электрофоретических профилей белков и липополисахаридов, пиролизная масс-спектрометрия, инфракрасная спектроскопия и ультрафиолетовый резонанс.

Важно отметить, что для однозначного отнесения исследуемого штамма к определённому виду должна наблюдаться чёткая корреляция между фенотипическими и геномными признаками. Другими словами, виды, определённые с помощью геномных методов, должны совпадать с видами, определёнными фенотипическими методами.

Фенотипические признаки отражают лишь небольшую часть генома организма. Фенотипические методы включают изучение таких характеристик, как (1) морфология клеток (форма и размер, образование клеточных агрегатов, наличие почек или их отсутствие, формирование дифференцированных клеток, тип деления, тип жгутикования, тип подвижности, наличие капсул, чехлов, шипов и др.) и колоний (выращенных на определённых средах и в конкретных условиях); (2) цитология клеток (при исследовании которой делается вывод о прокариотной или эукариотной организации исследуемых организмов); (3) культураль-

Имеются лишь ограниченные ископаемые свидетельства эволюционной истории прокариотов. По наиболее точным оценкам учёных, возраст нашей планеты составляет примерно 4,6 млрд лет. Почти всё это время на Земле существует жизнь. На протяжении большей части этого периода жизнь была исключительно микробной. Обнаружены строматолиты возрастом 3,8 млрд лет, которые образуют купол гор, сформированных из окаймленных слоев отложений, в которых росли бактерии в прибрежных морских экосистемах. Формирование строматолитов появляется тогда, когда отложения прикрепляются к полисахаридным капсулам и наносам бактериальных клеток. По мере движения бактерий они оставляют за собой окаменелые слои отложений.

В настоящее время строматолиты образуются в прибрежных зонах, где растут цианобактерии, как это происходило в доисторические времена, в докембрийскую эру. То, что древние строматолиты находились в Западной Австралии и Южной Африке, указывает на то, что микробная жизнь возникла и начала видоизменяться вскоре после формирования Земли.

Установлено, что возраст идентифицируемых окаменелых остатков примитивных бактериальных клеток, восстановленных из строматолитов и седиментарных горных пород, составляет приблизительно 3,5–3,8 млрд лет. Некоторые из таких окаменелых клеток в этих породах похожи на нитчатые фототрофные бактерии. Если допустить, что продуцентами самых древних строматолитов были фотосинтезирующие бактерии, как сейчас, то оказывается, что к этому времени, по крайней мере, появились самые первые фототрофы, например, зелёные бессерные бактерии *Chloroflexus*. Такие бактериальные клетки, которые сохранились как древние окаменелости, вероятно, были ограничены анаэробным фотосинтезом. Фотосинтез с производством кислорода появился, очевидно, не раньше чем 2,5 млрд лет назад, когда цианобактериальный метаболизм радикально изменил ход эволюции, сменив анаэробную атмосферу на аэробную, в которой содержался молекулярный кислород. Эволюция разнообразных микроорганизмов происходила параллельно с изменениями в геологии и химии Земли и её атмосферы. Некоторые протерозойские микрофоссилии сходны с современными микроорганизмами по размерам, морфологии, типу деления клеток, например,

главным образом на эволюционных доказательствах, выявляемых с помощью ископаемых, которые остались в слоях осадочных пород земной коры.

В отличие от высших форм жизни, большая часть эволюционной истории микроорганизмов не сохранилась в ископаемом виде, и микробные систематики (учёные, изучающие разнообразие и филогению) предпринимают попытки реконструировать эволюционное прошлое современных микроорганизмов путём сравнения современных форм. В качестве документов эволюционной истории начали использовать макромолекулы ДНК, РНК и белков – семантиды.

Это оказалось возможным благодаря внедрению в таксономию бактерий молекулярно-биологических методов, позволяющих изучать последовательность нуклеотидов в консервативных нуклеиновых кислотах или последовательность аминокислот в функционально сходных ферментных белках. Современный методический уровень и современные технологии позволяют секвенировать (с большим или меньшим успехом) любые молекулы.

Мы уже знаем, какие преимущества имеет ген 16S рРНК. Приводятся следующие аргументы в пользу этого подхода: рибосомы очень древней природы, рибосомные РНК распространены у всех живых организмов; они имеют постоянные функции. Первичная структура гена 16S рРНК изменяется слабо, слабее, чем большинство белков. Ген 16S рРНК имеет области как экстремально консервативные, так и переменные, что даёт возможность на основании их анализа установить как далёкие, так и близкие родственные отношения. Молекулы 16S рРНК легко изолируются, они достаточно велики (1540 нуклеотидов), что делает их анализ статистически более достоверным, чем анализ меньших молекул, например, молекул 5S рРНК (120 нуклеотидов). 23S рРНК имеет 3300 нуклеотидов и труднее анализируется.

Таким образом, одним из перспективных филогенетических маркеров оказались рибосомные РНК, у которых консерватизм первичной структуры сочетается с постоянством функций и повсеместным распространением, указывающим на древнейшее происхождение. Это 16S рРНК прокариотов и органелл эукариотов и 18S рРНК цитоплазмы эукариотов.

ные признаки (характер роста на плотных и в жидких средах); (4) физиологические свойства (использование различных субстратов, отношение к температуре, аэрации, pH, потребность в витаминах, способность к кислотообразованию и др.); (5) биохимические свойства (наличие специфических метаболических путей, особенности образования специфических ферментов и метаболитов); (6) хемотаксономия (химический состав клеточных компонентов: цитоплазмы, мембран, клеточных стенок, запасных веществ, капсул, жгутиков, детальное изучение состава и типа липидов, например, спектра жирных и тейхоевых кислот у актиномицетов, состава миколовых кислот у нокардий, микобактерий, коринебактерий, определение моносахаридного и аминокислотного состава клеточных стенок у нокардий, коринебактерий, микобактерий); (7) серодиагностика (использование иммунохимических методов анализа, в частности метода иммунофлуоресценции, иммунодиффузии и других реакций антиген-антитело для идентификации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов); (8) фаготипирование (использование специфических фагов, бактериальных вирусов – бактериофагов) [Rainey, Oren, 2011]. Физиологические характеристики устанавливаются в ряде биохимических тестов, которые надо будет провести с неизвестным микроорганизмом.

Работа по предварительной идентификации может начинаться с той группы признаков, с которой исследователь лучше знаком. Первый этап в процедуре предварительной идентификации – накопление информации, имеющей отношение к морфологическим, культуральным и физиологическим (биохимическим) особенностям идентифицируемых организмов.

Сюда входят приготовление предметных стёкол для исследования целой клетки и инокуляция разнообразных бактериологических сред для выявления характерных признаков роста и физико-химических изменений сред под воздействием исследуемого организма, например, способности минерализовать органические соединения с выделением аммиака у аммонификаторов или восстанавливать неорганические соединения серы у сульфатредукторов (физиологические признаки), а также типов продуцируемых ферментов (биохимические признаки, получение знаний о ферментах, катализирующих те или иные биохимические реакции).

При работе с культурами важно умение пользоваться асептическими методами, ибо хорошие навыки проведения микробиологических посевов определяют результаты. Загрязнение культур нежелательными организмами приведёт к ошибкам, превращая идентификацию в опасную догадку. Если появляются сомнения в достоверности результатов определённого теста, повторите его, не полагаясь на случай.

Для успешной идентификации неизвестного организма требуются: (1) тщательные методы, (2) интеллектуальное интерпретирование результатов тестирования, (3) точное ведение рабочих записей. По мере накопления информации по результатам завершённых тестов её в определённом порядке заносят в описательные таблицы. Не полагайтесь на свою память – сделайте запись немедленно.

После того, как в описательных таблицах накапливается достаточное количество информации, наступает следующий этап – проверка по таксономическому ключу, который позволяет идентифицировать организм.

Описание новых таксонов бактерий в последние десятилетия происходит стремительными темпами, главным образом благодаря успехам в изучении анаэробов. Поэтому за опубликованием новых таксонов бактерий необходимо следить по публикациям в журнале *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (до 2000 г. *International Journal of Systematic Bacteriology*).

Вершиной фенотипической системы прокариотов считается Руководство Берджи по систематике бактерий (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*). Альтернативой фенотипического подхода является генотипический подход. Основанная на нём систематика отражает филогенетические связи между живыми организмами. Эти связи можно реконструировать по гомологии генов рРНК.

После того, как вы занесли в описательную таблицу все данные, имеющие отношение к морфологическим, культуральным и физиологическим характеристикам исследованного изолята, вы готовы приступить к определению его рода и вида. Род установить относительно просто, тогда как видовая дифференциация – более сложное дело.

Рассмотрим некоторые комментарии к проблемам бактериальной классификации. Мы уже знаем, что существуют различные варианты классификации микроорганизмов: естественные (филогенетические), отражающие эволюционные связи организмов, филогенетические взаимоотношения микроорганизмов и искусственные (фенотипические), которые служат лишь целям быстрой идентификации организмов, т.е. установлению принадлежности организма к определённому таксону, и они основываются на признаках, удобных для практической идентификации микроорганизмов.

Преимущество фенотипической классификации в том, что для неё необходимо только описание признаков, поэтому она возможна для всех групп организмов (про- и эукариотов), особенно на первых этапах таксономического описания.

Фенотипические методы включают в себя химические или хемотаксономические методики, которые не направлены на ДНК или РНК. Классические фенотипические тесты традиционно составляли основу официального описания бактериальных видов, подвидов, родов и семейств. Генотипические сведения используются для размещения таксонов на филогенетическом древе и нанесения основных краевых линий (границ) в системах классификации, тогда как фенотипическая согласованность необходима для получения удобных (пригодных) систем классификации и, следовательно, может повлиять на глубину иерархических линий. Малочисленные или переменные фенотипические характеристики для отдельных бактериальных групп создают проблемы при описании и дифференциации таксонов. Для таких бактерий часто требуются альтернативные хемотаксономические или генотипические методы, чтобы характеристика штаммов была объективной и надёжной.

Филогенетическая классификация требует более глубоких сведений об организмах и прежде всего об их эволюции. Нам многое известно о филогении, т.е. об эволюционной истории (от греч. “phylon” – племя, и “genesis” – начало, источник, происхождение) высших организмов благодаря ископаемым, которые они оставили после себя. Кости динозавров и доисторического человека – веские доказательства нашей эволюционной истории. У высших форм иерархия порядков, семейств и родов базируется

Таблица 4. Классификация пептидогликанов
[по Schleifer, Kandler, 1972]

Перекрестная связь	Пептидный мостик	Аминокислота в положении 3
Пептидогликан типа А: связь между аминокислотой в положении 3 одной пептидной субъединицы и аминокислотой в положении 4 второй пептидной субъединицы	Нет (A1)	<i>L</i> -Лизин (A1α)
		<i>L</i> -Орнитин (A1β)
		<i>мезо</i> -Диаминопимелиновая кислота (A1γ)
	Полимеризованные пептидные субъединицы (A2)	<i>L</i> -Лизин
	Монокарбоновые <i>L</i> -аминокислоты и/или глицин (A3)	<i>L</i> -Лизин (A3α)
		<i>L</i> -Орнитин (A3β)
		<i>LL</i> -Диаминопимелиновая кислота
	Дикарбоновая аминокислота (A4)	<i>L</i> -Лизин (A4α)
		<i>L</i> -Орнитин (A4β)
		<i>мезо</i> -Диаминопимелиновая кислота (A4γ)
Пептидогликан типа В: связь между аминокислотой в положении 2 одной пептидной субъединицы и аминокислотой в положении 4 второй пептидной субъединицы	Содержит <i>L</i> -диаминокислоту (B1)	<i>L</i> -Лизин (B1α)
		<i>L</i> -Гомосерин (B1β)
		<i>L</i> -Глутаминовая кислота (B1γ)
		<i>L</i> -Аланин (B1δ)
	Содержит <i>D</i> -диаминокислоту (B2)	<i>L</i> -Орнитин (B2α)
		<i>L</i> -Гомосерин (B2β)
		<i>L</i> -Диаминомасляная кислота (B2γ)

Мембраносвязанные тейхоевые кислоты присутствует во всех бактериях с грамположительным морфотипом, тогда как тейхоевые кислоты, связанные с клеточной стенкой, присутствуют только у представителей отдельных грамположительных видов бактерий.

Bacteria, Абердин, Великобритания), Белорусской коллекции бактериальных культур (Минск, Беларусь).

Сегодня до сих пор остаётся наиболее широко применяемым такой цитохимический метод исследования, как окраска по Граму, которую целесообразно использовать при предварительном изучении природных изолятов.

Грам Ханс Кристиан (1853–1938) – датский микробиолог. В 1884 г. применил дифференцирующее окрашивание бактерий, названное последствие его именем (окрашивание по Граму).

Способность бактерий окрашиваться по Граму связывают с химическим составом и молекулярной организацией клеточной стенки. Все бактерии делятся на 2 группы по способности окрашиваться красителями триметилфенолового ряда: грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии удерживают комплекс генцианового фиолетового с йодом при обработке препарата спиртом и поэтому окрашиваются в фиолетовый свет. Грамотрицательные бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином или сафранином они приобретают розовую окраску.

Надо помнить, что результаты грамреакции зависят от возраста культуры: в старых культурах мёртвые клетки окрашиваются грамотрицательно, поэтому, как правило, для окраски по Граму используются молодые односуточные культуры. Хорошими объектами для грамреакции служат грамположительные *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* и грамотрицательная кишечная палочка *E. coli*. Некоторые бактерии (протеи, в частности) окрашиваются грамвариабельно, т.е. часть клеток – как грамположительные, а часть – как грамотрицательные.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные – розово-красный цвет.

Нередко для предварительной диагностики бактерий используют быстрый и простой метод дифференциации бактерий по Граму без окрашивания. Для этого клетки 1–2-суточной культуры помещают петлёй в каплю 3 % КОН на предметное стекло, размешивают круговыми движениями и через 5–8 сек петлю резко поднимают. Суспензия грамотрицательных бактерий становится вязкой и тянется за петлёй, образуя мукоидные тяжи.

Грамположительные бактерии равномерно распределяются в капле щелочи (как в воде). Реакция считается отрицательной, если образования слизистых тяжей не наблюдается в течение 60 сек. Увеличение вязкости вызвано лизисом клеточных стенок грамотрицательных бактерий в растворе щелочи, освобождением ДНК с последующим увеличением вязкости. При использовании метода дифференциации бактерий по Граму без окрашивания имеются исключения. Так, культуры целлюломонад и эрсковий, имеющие строение клеточной стенки, типичное для грамположительных бактерий, проявляют себя в тесте с КОН как грамотрицательные бактерии (образуют тяжи), в то время как грамотрицательные бактерии рода *Flavobacterium*, напротив, не образуют вязкой массы подобно грамположительным бактериям. Вероятно, имеются и другие примеры подобных исключений.

К цитохимическим методам исследования относится способ выявления кислотоустойчивости бактериальных клеток. Кислотоустойчивость – свойство, характерное для некоторых актинобактерий (в частности, нокардий, микобактерий, родококков, гордоний). Кислотоустойчивость проявляется в том, что нативные клетки с трудом воспринимают красители, а при окрашивании – прочно их удерживают. При обработке кислотой окраска клеток сохраняется. Кислотоустойчивость обусловлена особенностями химического состава клеточной стенки этих бактерий – высоким содержанием в ней сложных липидов и, в частности, наличием миколовых кислот (высокомолекулярных α -разветвленных β -оксикислот). Наибольшее распространение в микробиологической практике получила техника выявления кислотоустойчивости бактериальных клеток по Циль-Нильсену.

Важным признаком для идентификации грамотрицательных бактерий является наличие, расположение и количество жгутиков. По характеру движения бактерий в препарате можно предположительно судить о типе жгутикования. Если жгутики расположены на одном или двух полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое – “ввинчивающееся”, без покачивания из стороны в сторону; при перитрихальном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения.

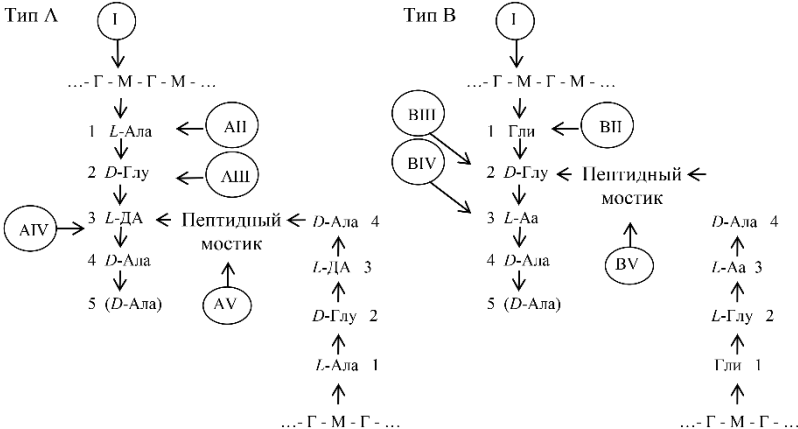


Рис. 14. Структура пептидогликанов, согласно Р. Schumann [2011]. Г – *N*-ацетил-*N*-глюкозамин, М – *N*-ацетилмурамовая кислота, Ала – аланин, Глу – глутаминовая кислота, ДА – диаминокислота, Гли – глицин, Аа – аминокислота с одной аминогруппой. **I**: частичная замена *N*-ацетильной на *N*-гликолильную группу в остатках мурамовой кислоты. **II**: замена *L*-Ала на Гли. **III**: α -карбоксильная группа *D*-Глу свободна или связана с Гли, глицинамидом, *D*-аланинамидом, кадаверином или путресцином. **IV**: в качестве *L*-ДА может быть *мезо*-2,6-диаминопимелиновая кислота, *LL*-2,6-диаминопимелиновая кислота, *L*-лизин, *L*-орнитин, лантионин, 2,6-диамино-3-гидроксипимелиновая кислота, гидроксизин или *трео*- β -гидроксиорнитин. **V**: 1–7 аминокислотных остатков, например, Гли, *L*-Ала, *L*-серин, *L*-треонин, *L*-Глу, аспарагиновая кислота, *L*-лизин. **VI**: замена Гли на *L*-серин. **VII**: замена *D*-Глу на *трео*-3-гидроксиглутаминовую кислоту. **VIII**: в качестве *L*-Аа может быть *L*-гомосерин, *L*-Ала, *L*-Глу, *L*-орнитин, *L*-лизин, *L*-2,4-диаминомасляная кислота. **BV**: подтип B1 содержит *L*-ДА (*L*-лизин или *L*-2,4-диаминомасляную кислоту), подтип B2 содержит *D*-диаминокислоту (*D*-орнитин, *D*-лизин или *D*-2,4-диаминомасляную кислоту), дополнительно могут присутствовать остатки Гли, *L*-треонина или *L*-аспарагиновой кислоты

пятиатомного спирта рибита (рибиттейхоевые), остатки которых соединены между собой фосфодиэфирными мостиками. Одна молекула тейхоевой кислоты включает от 7 до 15 спиртовых остатков. Свободные гидроксильные группы в молекулах спиртов могут быть замещены остатками *D*-аланина, глюкозы, *N*-ацетилглюкозамина и некоторых других сахаров.

Клеточные стенки бактерий содержат разнообразные типы пептидогликанов, которые могут быть специфическими для рода или вида. Наиболее ценную информацию получают от типа и состава поперечной сшивки (связи) пептидогликанов между соседними цепочками в полимерной структуре. Всего выделяют 18 подтипов пептидогликанов. Обычно заглавной буквой А или В обозначают тип поперечной связи между диаминокислотой в положении 3 или 4 одной пептидной субъединицы и D-аланином в положении 4 другой пептидной субъединицы; арабской цифрой (например, А1, А2, А3, А4 или В1, В2) – тип пептидного мостика или его отсутствие, греческой буквой (например, А1α, А1β, В1α, В1β и т.д.) – аминокислоту, находящуюся в положении 3 основной цепи (табл. 4). Более детальная классификация пептидогликанов приводится на сайте www.peptidoglycan-types.info.

Данные о структуре пептидогликана у бактерий хорошо коррелируют с филогенетическим положением данных организмов. Для большинства известных муреинсодержащих бактерий характерен пептидогликан типа А, пептидогликан типа В обнаружен у всех родов семейств *Microbacteriaceae* и представителей группы *Erysipelothrix/Holdemania*. Информацию о составе и структуре пептидогликана рекомендуется приводить при описании новых таксонов грамположительных бактерий [Tindall et al., 2010б]. Подробная информация о методах выделения и оценки структуры пептидогликана приведена в недавно опубликованных обзорах [Schumann, 2011; Wang, Jiang, 2016].

Тейхоевые кислоты

Тейхоевые кислоты (от греч. “тейхос” – стенка) представляют собой анионные фосфор- и углеводсодержащие полимеры, построенные на основе глицерина (глицеринтейхоевые) или

Отдельный бактериальный жгутик настолько тонок, что неразличим в световом микроскопе, если не окрашен особым способом, который увеличивает его кажущуюся толщину. Так, диаметр отдельных жгутиков колеблется в пределах 0,01–0,02 мкм (у представителей *Bdellovibrio* – 0,04–0,06 мкм), а максимальное разрешение светового микроскопа составляет 0,2 мкм. Лишь у немногих бактерий, например, у представителей *Spirillum*, пучки жгутиков достаточно плотны, и их удаётся обнаружить при наблюдении в светлом поле с помощью фазово-контрастного устройства или в тёмном поле. Существует несколько способов окраски жгутиков. Все они основаны на использовании различных протрав, осаждающихся на поверхности жгутиков, благодаря чему диаметр жгутиков увеличивается, и они становятся видимыми под световым микроскопом. Наибольшее распространение получил метод окраски жгутиков по методу Леффлера в модификации Пешкова.

Надо помнить, что окраска жгутиков требует тщательной подготовки клеток и аккуратности в работе, так как они легко обламываются даже при лёгком взбалтывании суспензии. Для окраски используют молодую, чаще всего суточную культуру, поскольку с возрастом клетки могут терять подвижность. Если клетки суточной культуры неподвижны, следует просмотореть клетки 12-, 6- или даже 2-часовых культур. Подвижность бактериальных клеток следует отличать от их пассивного перемещения в результате броуновского движения, которое особенно заметно в суспензиях с большой плотностью. Если движение напоминает броуновское, для того чтобы убедиться в собственной подвижности клеток, к капле исследуемой суспензии добавляют каплю 5 %-ного водного раствора фенола. Активное движение тотчас прекращается, тогда как броуновское – сохраняется. В настоящее время редко используют окрашивание, требующее специальных навыков. Характер жгутикования исследуют под электронным микроскопом в препаратах, предварительно напылённых металлом.

Методы окраски бактерий, развитие приёмов окраски связаны с именем Роберта Коха (Koch H.H.R., 1843–1910). С этим именем связаны и методы получения чистых культур бактерий и выращивания их на твёрдых средах, благодаря которым с 1881 г.

быстрыми темпами стали выделять бактерии. Применение микроскопов при микробиологических исследованиях и повышение их разрешающей способности были распространены благодаря внедрению достижений Карла Цейса (Zeiss C.F., 1816–1888). Эти методы заимствованы у ботаников. Тепловая фиксация клеток на предметном стекле и окраска метиленовым синим были заимствованы у Пауля Эрлиха (Ehrlich P., 1854–1915).

Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым относятся красители, у которых красящими свойствами обладает анион, у основных красителей хромофором является катион. Примерами кислых красителей служат спирторастворимый эозин, эритрозин, спирторастворимый нигрозин (анилин чёрный), кислый фуксин; все эти кислые красители интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители – метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллвиолет, сафранин – интенсивно связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомной РНК в клетке бактерии делает её более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются исключительно основные красители.

Различают простое и дифференцированное окрашивание микроорганизмов. В первом случае окрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны её форма и размеры. Дифференциальное окрашивание выявляет только определённые структуры клетки и запасные вещества. Для простого окрашивания чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированные (различными способами – нагреванием, химическими веществами, цель фиксации – сделать безопасным обращение с культурами, обеспечить лучшее прилипание к стеклу, сделать мазок восприимчивым к окраске, так как мёртвые клетки окрашиваются лучше, чем живые) окрашенные препараты могут храниться длительное время.

Форму клеток и их расположение (цепочки, розетки, тетрады, пакеты и т.д.) выявляют, как правило, на препаратах живых клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии. В то же время для определения формы клеток мелких палочковидных

чередуются последовательно соединённые 1,4-β-гликозидными связями повторяющиеся остатки *N*-ацетил-*N*-глюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты. Такие гетерополимерные неразветвлённые (мурамополисахаридные) цепочки образуют основу муреина. К карбоксильной группе *N*-ацетилмурамовой кислоты присоединена короткая пептидная цепь, в состав которой входят такие аминокислоты, как *L*-аланин, *D*-глутаминовая кислота, *мезо*-диаминопимелиновая кислота или *L*-лизин и *D*-аланин. Диаминокислоты *мезо*- (или *LL*-) диаминопимелиновая кислота или *L*-лизин играют большую роль в образовании муреиновой сети, поскольку обе их аминогруппы могут образовывать пептидную связь и, следовательно, служить связующим звеном между двумя гетерополимерными цепочками. Диаминопимелиновую кислоту (ДАПК) и лизин заменяют иногда орнитин и диаминomásляная кислота. Гетерополимерные цепочки соединяются пептидными связями в мешковидную гигантскую молекулу. Изменения в гликановых нитях, а именно замена *N*-ацетильной группы на *N*-гликолильную в остатках мурамовой кислоты, считаются таксономически значимым критерием дифференциации родов бактерий.

Пептидогликаны на основании вариаций поперечно-сшивающих структур пептидных субъединиц разделяют на два основных типа: А и В. В пептидогликане типа А пептидные субъединицы поперечно связаны между диаминокислотой в положении 3 одного пептида и С-терминальным *D*-аланином в положении 4 соседнего пептида, чаще всего напрямую или через межпептидный мостик. Пептидогликан типа В характеризуется поперечной связью между *L*-карбоксильной группой *D*-глутаминовой кислоты в положении 2 одного пептида и карбоксильной группой *D*-аланина в позиции 4 другого пептида. Поскольку две карбоксильные группы не могут связываться “стык в стык”, между ними нужен вставочный мостик, содержащий диаминокислоту, чтобы обеспечить свободную аминогруппу для связывания с карбоксильной группой соседней пептидной субъединицы (рис. 14). Тип пептидогликана определяют по количественному соотношению аминокислот пептидной части пептидогликана с помощью автоматического анализатора [Schleifer, Kandler, 1972].

Этот раздел систематики (хемотаксономия) оказался одним из самых эффективных в последнее время, во-первых, в силу достаточной репрезентативности его данных, во-вторых, благодаря сравнительно простой и доступной процедуре выполнения соответствующих экспериментов.

Хемотаксономия сыграла исключительно плодотворную роль в систематике актинобактерий (актиномицетов) и многих других грамположительных бактерий: молочнокислых, микрококков, стафилококков [Wang, Jiang, 2016]. Своим успехом она обязана простым и быстрым количественным и качественным анализам состава клеточной стенки и липидов организмов.

Одним из преимуществ хемотаксономических методов является то, что при их исполнении не требуется углублённое и обычно длительное изучение специфических особенностей развития организмов, их жизненных циклов. Специалист в данном случае может ограничиться знанием условий получения биомассы, необходимые количества которой очень незначительны.

Надо помнить: клеточную биомассу собирают в конце логарифмической или в начале стационарной фазы роста. Для выявления химических маркеров применяют: (1) тонкослойную хроматографию (ТСХ); (2) газовую хроматографию (ГХ); (3) жидкостную хроматографию высокого разрешения (ВЭЖХ); (4) ЯМР спектроскопию. Рассмотрим некоторые хемотаксономические признаки.

Выявление различия между грамотрицательными и грамположительными бактериями проводят в первую очередь для того, чтобы регулировать последующие этапы характеристики и идентификации исследуемых штаммов. Определение состава клеточной стенки традиционно считается важным для грамположительных бактерий. При этом анализируются тип пептидогликана и тейхоевые кислоты.

Структура пептидогликана

Тип пептидогликана в клеточной стенке – стабильная дифференцирующая характеристика бактерий, относящаяся к категории “качественных”. Пептидогликан (муреин) представляет собой сложный гетерополимер, обеспечивающий прочность клеточной стенки и состоящий из полисахаридных цепей, в которых

бактерий (например, *Serratia marcescens*) готовят препараты фиксированных клеток и применяют простое окрашивание. Клетки мелких бактерий, имеющих выросты в виде стебельков – простеки (представители почвенных уникальных бактерий родов *Caulobacter*, *Stella*, *Labrys*), целесообразнее исследовать методом фазового контраста.

При идентификации природных изолятов очень важно знание природного источника и условий, в которых штамм был первоначально выделен. Это помогает ограничить круг родов, к которым мог бы относиться новый изолят. Эта информация, а также данные по морфологии, результаты окраски клеток по Граму позволяют исследователю значительно сузить область поиска до небольшой группы родов.

Например, грамположительная, подвижная, спорообразующая палочка, выделенная из почвы путём аэробной инкубации на неизбирательной среде, почти наверняка будет принадлежать к роду *Bacillus*, и нет необходимости применять тесты для дифференциации этого организма от грамотрицательных палочек, облигатных анаэробов, грамположительных кокков и т.д.

Применение морфологических признаков бактерий в значительной степени ограничивается их изменчивостью (вариабельностью). Данные признаки существенно зависят от среды, возраста, условий культивирования микроорганизмов. Тем не менее первым шагом в идентификации бактерий является тщательное морфологическое исследование свежеизолированных микробных культур.

Для видовой дифференциации бактерий используются культуральные (макроморфологические) признаки: это особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах, формы колоний на плотных питательных средах, образование пигмента. На плотных питательных средах микроорганизмы растут в виде колонии, штриха или сплошного газона. Колония – это изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. В зависимости от того, как развивались клетки (на поверхности плотной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности,

отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате.

Дополнительную характеристику бактериального вида составляют такие культуральные признаки, как образование плёнки или кольца на стенках пробирки, равномерное помутнение или выпадение хлопьевидных, иногда пылевидных, осадков.

Макроморфологические признаки не являются устойчивыми, они варьируют в зависимости от состава среды, на которой выращивается организм, скорости его роста, возраста, длительности культивирования в лабораторных условиях и ряда других факторов.

Ограниченные возможности применения морфолого-культуральных признаков объясняются и сходством по ним многих таксонов. Так, на основании морфологии сложно разграничивать роды коринеформных бактерий. Примером этого служит отнесение в разные времена таксона *Corynebacterium glutamicum* к родам *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*. По морфологии клеток трудно различить, например, актинобактерии родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter*, роды *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* и *Nocardia*. Преимущественное использование морфологических признаков для диагностики нокардио- и коринеподобных бактерий в ранний период их изучения привело, например, к описанию видов истинных *Rhodococcus sensu stricto* как *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Corynebacterium* spp.

К началу 60-х гг. в сферу фенотипического анализа включается широкий спектр физиолого-биохимических тестов: это отношение бактерий к различным питательным веществам, к источникам азота и углерода, сахарам, спиртам, к молекулярному кислороду, рН, температуре, отношению к ингибиторам и антибактериальным веществам, образование разнообразных ферментов: как правило, определяются эстеразы (расщепляют сложные жиры), фосфатазы (гидролизуют фосфорные эфиры), галактозидаза (расщепляет лактозу на галактозу и глюкозу), каталаза (катализирует процесс разложения перекиси на воду и кислород), глюкозидаза (гидролизует мальтозу).

Микроорганизмы способны использовать в качестве питательных субстратов самые различные высокомолекулярные соединения: полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды

К концу 70 – началу 80-х гг. классический морфофизиологический подход в диагностической (практической) таксономии, по сути, “синтетический” подход к бактериальной таксономии и филогении, обогатился приёмами хемотаксономии. Интересно отметить, что хемотаксономия вначале обозначалась термином “микроморфология” в соответствии с терминологией Р. Клейна (Klein R.) и Артура Кронквиста (Cronquist A., 1919–1992). По их мнению, микроморфология (хемотаксономия) предполагает тщательное изучение структуры и состава клеточных стенок, химического состава фотосинтезирующего аппарата и всего клеточного содержимого (каротиноидов, липидов, стеролов, углеводов и т.д.). Именно на основе хемотаксономических данных эти учёные сделали один из первых филогенетических выводов – о большей древности и примитивности грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительными бактериями [Klein, Cronquist, 1967].

Лекция 10. ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ

С начала 80-х гг. в систематике прокариотов начинается эпоха хемотаксономии, хемотаксономических исследований. Термин “хемотаксономия” обозначает применение аналитических методов для сбора информации о различных химических составляющих клеточной стенки и наружной мембраны с целью классификации бактерий. Среди исследуемых маркеров – белковые профили целых клеток, дыхательные хиноны, цитохромы, полиамины, аминокислоты, липиды, пигменты, отдельные ферменты и др. Поскольку измеряемые параметры представляют собой прямое отражение экспрессии генетической информации организма, то их следует рассматривать как фенотип.

В это время формируется качественно новая методология, сформулированная в работах американских учёных Беккера (Becker B.), Лешевалье (Lechevallier M.R., Lechevallier H.A.), польских исследователей Мордарских (Mordarska H., Mordarski M.) и основанная на химическом анализе состава дифференцирующих клеточных компонентов – цитоплазмы, мембран, клеточных стенок.

многие имеют жгутики. Характеризуются большим экологическим и метаболическим разнообразием, способностью метаболизировать в экстремальных условиях внешней среды.

В десятом издании Определителя (1994) впервые сделана попытка классифицировать известные археобактерии. В этом издании представлены два царства: *Eubacteria*, включающее 20 групп эубактерий, и царство *Archaeobacteria*, включающее 5 групп археобактерий. В Определителе (как и во всех предыдущих изданиях) не содержится ключей для определения филогенетического родства бактерий.

В новом издании Определителя (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001–2012) в качестве альтернативы фенотипического подхода используется генотипический подход для максимально объективной классификации прокариотов. Это издание Определителя состоит из 5 томов:

Том I. 2001. Археи и глубоко разветвлённые и фототрофные бактерии (The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*).

Том II. 2005. Протеобактерии (The *Proteobacteria*) в трёх книгах:

IIА. Вступительные эссе (Introductory Essays).

IIВ. Гамма-протеобактерии (The *Gammaproteobacteria*).

IIС. Другие классы протеобактерий (Other Classes of *Proteobacteria*).

Том III. 2009. Фирмикуты (The *Firmicutes*).

Том IV. 2010. Бактериоидеты, спирохеты, тенерикуты (молликуты), ацидобактерии, фибробактерии, фузобактерии, диктиогломи, гемматимонадеты, лентисферы, веррукомикробии, хламидии и планктомицеты (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentishaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*).

Том V (в двух частях). 2012. Актинобактерии (The *Actinobacteria*).

В 2015 г. было подготовлено цифровое издание Руководства Берджи по систематике архей и бактерий (Bergey's Manual of Systematic of *Archaea* and *Bacteria*) с частными обновлениями – онлайн-энциклопедия Берджи в 5 томах.

и др. Однако макромолекулы не могут проникать через мембрану клетки. Они подвергаются гидролизу, который осуществляется под воздействием экзоферментов, относящихся к классу гидролаз. Большинство из них катализируют гидролиз полимеров до растворимых продуктов, обычно димеров или мономеров, которые поступают в клетку с помощью специфических транспортных механизмов. Образование экзоферментов широко распространено среди представителей различных групп микроорганизмов.

При поиске продуцентов ферментов гидролаз в лабораторной практике применяют специальные методы. Сущность их состоит в следующем: микроорганизмы выращивают на плотной среде, содержащей макромолекулярный субстрат; если клетки выделяют в среду экзоферменты, гидролизующие данное соединение, то выросшие колонии окружены зоной, в которой обнаруживаются продукты гидролиза. Так, представители различных видов бацилл, псевдомонад, стрептомицетов, мицелиальных грибов являются продуцентами амилаз, под действием которых крахмал подвергается гидролитическому расщеплению. Представители различных видов бацилл, актиномицетов выделяют внеклеточные протеазы (протеолитические) ферменты, катализирующие расщепление белков на фрагменты: поли- и олигопептиды. Активность протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатин, казеин или другие белки. Так, для определения вида бактерий всегда используется признак: разложение желатина.

Для идентификации бактерий рекомендуется использовать обычно 100–120 признаков. Это весьма трудоёмкая и длительная работа. Тестирование по каждому признаку занимает от 14 до 28 дней. В связи с этим в настоящее время разработаны и выпускаются в промышленных масштабах коммерческие тест-системы фенотипического анализа (стандартные наборы и планшеты для экспрессного определения усвоения источников углерода и ферментативной активности), облегчающие и ускоряющие тестирование бактериальных организмов. При этом следует отметить, что результаты отдельного теста (анализа), полученные с помощью серийно выпускаемой системы, и те, что получают классическими процедурами, могут отличаться.

Фенотипические сведения были первыми, анализ которых проводился компьютеризированными методами числового срав-

нения. В 1950-х гг. параллельно с развитием компьютеров появилась числовая таксономия, позволившая проводить сравнительный анализ большого количества фенотипических признаков для большого количества штаммов [Sokal, Sneath, 1963]. Матрицы данных, демонстрирующие степень сходства между каждой парой штаммов, и кластерный анализ, в результате которого получают дендрограммы, выявляют общую картину фенотипической последовательности (связности) индивидуальной группы штаммов. Поскольку большое количество признаков отражает существенное количество генотипической информации, то вскоре стало очевидным, что числовой анализ большого количества фенотипических характеристик действительно имеет таксономическую значимость.

В реестр признаков, позволяющих идентифицировать бактериальные культуры, наряду с морфологическими и, физиологическими, заносятся экологические признаки, т.е. физиологические признаки, имеющие экологическое значение. Это признаки, отражающие особенности местообитания, например, наличие симбиотических или паразитических взаимоотношений микроорганизмов с окружающей природной средой, способность к усвоению нормальных алканов и ароматических углеводов, труднодоступных для многих микроорганизмов, или способность к диауксотрофии, олигокарбофилии и олигонитрофилии – свойства, обеспечивающие приуроченность отдельных групп к специфическим местообитаниям, таким как биотопы с повышенным содержанием минеральных солей, биотопы районов нефтяных загрязнений и нефтепромыслов.

Наиболее полно задача быстрой идентификации прокариотов решается с помощью Определителя бактерий Берджи (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), который играет роль современного пособия для идентификации бактерий, базы данных. Основная идея классификации “по Берджи” – лёгкость идентификации бактерий по совокупности фенотипических и генотипических признаков.

В девятом издании Определителя (1984–1989) бактерии разделены на 4 основные категории (отделы) и 35 групп, выделенные на основании строения “пограничного слоя клетки” и результатов окрашивания по Граму. Эти группы не являются формальными таксономическими рангами, а представляют легко

узнаваемые фенотипические группы, удобные для диагностических целей.

Отдел 1. *Gracilicutes* (от лат. “*gracilis*” – тонкий, “*cutes*” – кожа) – грациликутные или тонкостенные организмы (1–16 группы). Сюда отнесены грамотрицательные эубактерии, имеющие клеточную стенку. Размножение – бинарное деление, почкование или множественное деление. Спор не образуют. Многие подвижные: жгутики или скольжение. Аэробные и анаэробные или факультативно анаэробные. Отдел включает классы *Anoxyphotobacteria*, *Oxyphotobacteria* и 9 секций, сюда относят группы спирохет, спирилл и род *Bdellovibrio* – паразитирующий в клетках других бактерий, палочки и кокки, риккетсии и хламидии.

Отдел 2. *Firmicutes* (от лат. “*firmis*” – прочный) – грамположительные эубактерии, имеющие клеточные стенки (17–29 группы). Толстостенные кокки, палочки или нитчатые формы. Размножаются бинарным делением. Некоторые образуют эндоспоры, у других – споры на гифах или в спорангиях. Передвигаются с помощью жгутиков, но большинство неподвижны. Аэробы, анаэробы, факультативные анаэробы. По морфологии разделены на два класса: *Firmibacteria* (кокки, палочки, неветвящиеся формы) и *Thallobacteria* (ветвящиеся формы).

Отдел 3. *Tenericutes* (от лат. “*tener*” – мягкий, нежный) – мягкостеночные организмы. Эубактерии, лишённые клеточных стенок (30-я группа). Клетки окружены цитоплазматической мембраной, плеоморфны. Размножение – бинарным делением, почкованием, фрагментацией. По Граму окрашиваются отрицательно. Характерно образование мелких, врастающих в агар колоний. Могут быть сапрофитами, паразитами или патогенными формами. Представлены одним классом *Mollicutes*. Входят микоплазмы. К молликутам относят эндосимбионтов простейших грибов.

Отдел 4. *Mendosicutes* (от лат. “*mendosus*” – ошибочный) – архебактерии, клеточные стенки которых отличаются от аналогичных структур прокариотов (31–35 группы). Клетки разной формы – кокки, палочки, нити. Многие плеоморфны. Большинство имеет клеточную стенку, но она не содержит типичного пептидогликана, может быть построена только из белковых макромолекул или гетерополисахаридов. По Граму окрашиваются и отрицательно, и положительно. Большинство – строгие анаэробы,

Все полученные хемотаксономические данные обрабатываются статистически с использованием пакетов компьютерных программ Statistica. В итоге создаются так называемые хемотаксономические профили, сравнение которых является основой для таксономического ранжирования и построения систем прокариотов.

Состав полиаминов

Полиамины представляют собой поликатионные соединения, обнаруживаемые во всех биологических материалах и участвующие в широком спектре биореакций, включая синтез ДНК, РНК и белков. Полиамины используются в качестве хемотаксономических маркеров в систематике ряда групп грамотрицательных бактерий. Среди полиаминов наиболее часто обнаруживаются путресцин (1,4-диаминобутан) и спермидин, а также спермин.

В последнее время эти соединения все чаще используются в таксономической практике грамположительных бактерий, в частности актинобактерий. Например, исследование общего и качественного состава полиаминов позволило успешно разграничить на уровне фенотипа представителей родов *Rathayibacter* и *Plantibacter*.

МАЛДИ масс-спектрометрия

Времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ ТоФ МС, англ. MALDI-ToF MS) – экспрессный высокоселективный метод протеомного профилирования, обладающий хорошей воспроизводимостью результатов исследований по дифференциации филогенетически близких видов и выявлению потенциальных представителей новых видов среди близкородственных организмов.

Первые работы, в которых использовалась технология матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией для анализа профиля рибосомных белков микробной клетки, появились в конце 1980-х гг. XX в., а последние 10–15 лет её применение в таксономии прокариотов увеличивалось экспоненциально. Данный метод обеспечивает прямое профилирование бактериальных белков (без фракционирования и очистки) и получение уникальных масс-спектров

Разнообразие в структуре тейхоевых кислот обусловлено различием остатков полиолов и сахаров (аминосахаров) основной цепи или её боковых ответвлений, связанных с полиолами гликозидными связями разной конфигурации, а также различием в фосфодиэфирной связи. Встречаются цепи без гликозидных или ацильных заместителей (табл. 5). В зависимости от состава основной цепи выделяют четыре типа тейхоевых кислот.

Тейхоевые кислоты I типа содержат в составе основной цепи 5 разных полиолов: глицерин, рибит, маннит, эритрит и арабит. Чаще всего обнаруживаются тейхоевые кислоты, содержащие глицерин и рибит, менее распространены полимеры, содержащие маннит. Среди полимеров II типа известно 5 групп, различающихся полиолами (глицерин или рибит) и сахарами основной цепи. Они менее распространены, чем полимеры I типа и встречаются в основном у бацилл, лактобацилл, стрептококков и ряда актиномицетов. Полимеры III типа выявлены только у стафилококков. Тейхоевые кислоты IV типа обнаружены только у представителей *Nocardia* *dassonvillei*. В зависимости от положения фосфодиэфирной связи, объединяющей компоненты основной цепи, выделяют несколько подтипов тейхоевых кислот (см. табл. 5).

Наличие и особенности структуры тейхоевых кислот являются характерным маркером для разграничения стафилококков и микрококков (у которых отсутствуют эти полимеры), а также бревибактерий и коринебактерий. По структуре тейхоевых кислот достаточно хорошо дифференцируются виды стафилококков внутри рода, выявлена корреляция между структурой тейхоевых кислот, генотипическими характеристиками и группировкой организмов по совокупности культуральных и физиологических признаков представителей рода *Streptomyces*.

Тейхоевые кислоты легко экстрагировать и очистить, а затем анализировать методами газожидкостной хроматографии и ЯМР спектроскопии. Количество тейхоевых кислот может составлять до 60 % веса клеточной стенки. Эти анионные углеводсодержащие полимеры являются жизненно необходимыми для функционирования бактериальной клетки и популяции в целом. Так, мутанты бацилл, лишённые локусов, ответственных

Таблица 5. Типы тейхоевых кислот [по Naumova et al., 2001]

Подтип	Состав основной цепи		Положение атома углерода в полиоле или сахаре, связанного через группы -ОН фосфоэфирными связями	Положение гликозильного заместителя при С полиола ^{1,2}
	Полиол	Сахар		
Тип I, поли(полиол-фосфат)				
I-G 1,3	Глицерин		Глицерин, С-1 и С-3	С-2
I-G 2,3	Глицерин		Глицерин, С-2 и С-3	С-1
I-R 1,5	Рибит		Рибит, С-1 и С-5	С-4
I-R 3,5	Рибит		Рибит, С-3 и С-5	Нет
I-E 1,4	Эритрит		Эритрит, С-1 и С-4	С-2
I-M 1,6	Маннит		Маннит, С-1 и С-6	С-2
I-M 4,6	Маннит		Маннит, С-4 и С-6	Нет
I-A ³	Арабит		Неизвестно	С-4
Тип II, поли(гликозил-полиол-фосфат)				
II-GS 3,3	Глицерин	Сахар	Глицерин, С-3. Сахар, С-3	С-1
II-GS 3,4	Глицерин	Сахар	Глицерин, С-3. Сахар, С-4	С-1
II-GS 3,6	Глицерин	Сахар	Глицерин, С-3. Сахар, С-6	С-1 или С-2
II-RS 5,3	Рибит	Сахар	Рибит, С-5. Сахар, С-3	С-1
II-RS 5,6	Рибит	Сахар	Рибит, С-5. Сахар, С-6	С-1
Тип III, поли(полиол-фосфат-гликозил-фосфат)				
III-GS	Глицерин	Сахар	Глицерин, С-1 и С-3. Сахар, С-1 и С-6	Нет или С-2
Тип IV, поли(полиолфосфат-гликозил-полиол-фосфат)				
IV-GS	Глицерин	Сахар	Глицерин, С-1 и С-3, Глицерин, С-3 и сахар, С-3 или С-4	С-2

Примечание. ¹Наиболее часто встречающиеся заместители: глюкоза, галактоза, рамноза, N-ацетиламиносахар. ²*O*-D-аланин, *O*-L-лизин, *O*-сукцинил или пируватные группы могут присутствовать при определённых атомах углерода. ³Положение фосфоэфирной связи неизвестно.

Очерчено 5 типов фосфолипидов, характеризующихся присутствием азотистых компонентов и имеющих диагностическое значение [Lechevalier et al., 1977; Goodfellow, 1989].

Фосфолипиды типа I не имеют азотсодержащих фосфолипидов. Обнаружены среди представителей родов актинобактерий *Agromyces*, *Arachnia*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Dermatophilus*, *Frankia*, *Glycomyces*, *Intrasporangium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Nocardioides*, *Pimelobacter*, *Renibacterium*, *Rothia* и *Stomatococcus*.

Фосфолипиды типа II имеют один азотсодержащий фосфолипид: фосфатидилэтаноламин. Выявлены среди членов родов актинобактерий *Actinomyces*, *Actinoplanes*, *Actinosynnema*, *Ampullariella*, *Amycolatopsis*, *Catellatospora*, *Dactylosporangium*, *Geodermatophilus*, *Kibdelosporangium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pilimelia*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharothrix*, *Streptomyces* и *Streptoverticillium*.

Фосфолипиды типа III характеризуются наличием фосфотидилхолина. Обнаружены среди представителей родов *Actinopolyspora*, *Amycolata*, *Kineosporia*, *Nocardiosis*, *Pseudonocardia* и *Saccharopolyspora*.

Фосфолипиды типа IV характеризуются присутствием неизвестного фосфолипида, содержащего глюкозамин. Характерны для представителей родов актинобактерий *Microbispora*, *Planobispora*, *Planomonospora* и *Streptosporangium*.

Фосфолипиды типа V отличаются присутствием неизвестного фосфолипида, содержащего глюкозамин, и безазотистого фосфолипида – фосфатидилглицерина. Выявлены у членов родов актинобактерий *Cellulomonas*, *Oerskovia* и *Promicromonospora*.

Рассматриваемый признак “тип фосфолипидов” находит всё более широкое применение в систематике актинобактерий. При описании новых таксонов всё чаще указывают полные спектры обнаруживаемых липидов без отнесения их к какому-либо типу. Так, например, у представителей рода *Sphingobacterium* выявлены сфинголипиды, у цианобактерий, метилотрофов, ацетобактерий – гопаиноиды, у представителей родов *Cytophaga* и *Flexibacter* – капнины.

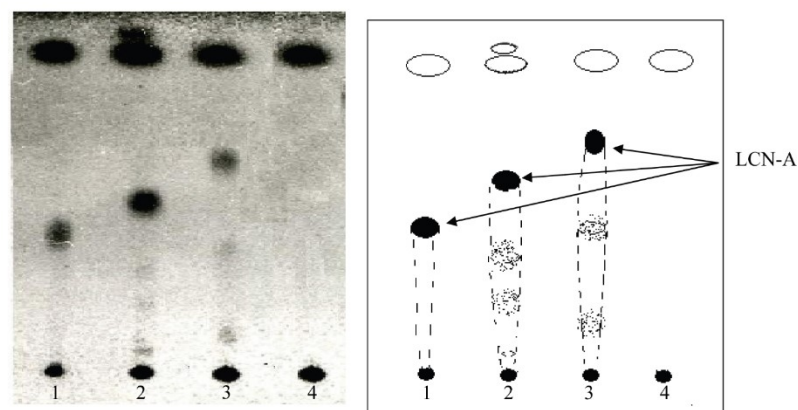


Рис. 17. Тонкослойная хроматограмма метанолизатов целых актино-бактериальных клеток: 1 – *Corynebacterium glutamicum* ИЭГМ 1861; 2 – *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 70^T; 3 – *Nocardia farcinica* ИЭГМ 621; *Micrococcus* sp. ИЭГМ 827. Система растворителей: петролейный эфир – диэтиловый эфир (85:25 по объёму)

и идентификации прокариотов. Наиболее распространённые полярные липиды бактерий – это фосфолипиды, содержащие в своём составе остаток фосфорной кислоты и соединённую с ней добавочную группу атомов различной химической природы. В состав фосфолипидов входят спирт, жирные кислоты, фосфорная кислота и азотистые соединения.

По природе спирта фосфолипиды можно разделить на три группы: фосфоглицериды, фосфосфинголипиды и фосфоинозитиды. Наиболее широко распространены фосфоглицериды (фосфолипиды, производные фосфатидной кислоты). К ним относятся фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины (кефалины), фосфатидилсерины и плазмалогены (ацетальфосфатиды).

При обязательном соблюдении строго контролируемых условий культивирования микробных культур анализ фосфолипидов является быстрым и эффективным методом первичной (вспомогательной) идентификации актинобактерий труднодифференцируемых таксонов на уровне родов и видов.

за синтез тейхоевых кислот, оказываются нежизнеспособными. Тейхоевые кислоты играют роль своеобразного “барьера”, препятствующего проникновению в клетку чужеродной ДНК, переносимой фагами. Это, по-видимому, связано с процессами обособления бактериальных видов в природе и их эволюцией [Naumova et al., 2001].

Клеточные стенки грамотрицательных бактерий не содержат тейхоевых кислот.

Хемотип клеточной стенки

Признак стал быстро входить в практику после 1965 г. XX в., когда в работах М. Лешевалье (Lechevalier M.P.) с соавторами было показано, что “тип клеточной стенки” – признак общий, постоянный, стабильный, не зависящий от среды и условий выращивания микроорганизмов. Как правило, данный признак является общим для большинства представителей актинобактерий, принадлежащих к различным родам [Lechevalier, Lechevalier, 1970; Goodfellow, 1989].

Установлено девять типов клеточной стенки, различающиеся наборами дифференцирующих компонентов клеточных стенок – диаминокислот, в частности изомеров диаминопимелиновой кислоты (ДАПК), входящих в состав пептидогликана, и основных (“диагностических”) сахаров [Lechevalier, Lechevalier, 1970]. Ожидаемый вопрос: “Какой биологический смысл имеет включение в пептидную часть пептидогликана (муреина) той или иной диаминокислоты, например, лизина, мезо-ДАПК или LL-ДАПК, ибо эти аминокислоты являются звеньями одного биосинтетического пути?” На этот вопрос нет ответа. В систематике нередко используются свойства организмов, в основе которых лежат неизвестные до определённого времени механизмы.

Сахара, имеющие диагностическое значение, входят в состав полисахаридов клеточных стенок, некоторые из них цитоплазматической природы. Определяют сахара, как правило, в гидролизатах целых клеток. По профилю диагностических сахаров актинобактерии, содержащие мезо-ДАПК в составе пептидогликана клеточной стенки, разделены на 4 группы: А – виды характеризуются присутствием арабинозы и галактозы и отсутствием ксилозы; В – присутствием мадурозы и отсутствием

арабинозы и ксилозы; С – виды не имеют диагностических сахаров; D – виды характеризуются присутствием арабинозы и ксилозы.

Таксономическое значение придаётся только компонентам, присутствующим в больших количествах. Минорные компоненты не используются. Оценка носит качественный характер.

I хемотип клеточной стенки предполагает наличие LL-формы ДАПК (диаминопимелиновой кислоты) и глицина. Диагностические сахара отсутствуют. Характерен для актинобактерий родов *Arachnia*, *Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Kitasatosporia*, *Nocardioidea*, *Pimelobacter*, *Sporichthya*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*.

II хемотип клеточной стенки предполагает наличие мезо-ДАПК (иногда гидрокси-ДАПК) и глицина (тип сахаров D). Характерен для спороактиномицетов рода *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Catellatospora*, *Dactylosporangium*, *Glycomyces*, *Micromonospora*, *Pilimelia*.

III хемотип клеточной стенки предполагает наличие мезо-ДАПК и мадуросы (3-метил-D-галактозы) (тип сахаров B). Характерен для представителей родов *Dermatophilus*, *Frankia*, *Microbispora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*. Если мадуроса отсутствует – тип сахаров C. Характерен для родов *Actinosynnema*, *Brevibacterium*, *Geodermatophilus*, *Kitasatosporia*, *Microbispora*, *Nocardiosis*, *Saccharothrix*, *Streptoalloteichus*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*.

IV хемотип клеточной стенки предполагает наличие мезо-ДАПК, арабинозы и галактозы (тип сахаров A). Характерен для представителей родов *Actinopolyspora*, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Caseobacter*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Kibdelosporangium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Tsukamurella*.

V хемотип клеточной стенки предполагает присутствие таких аминокислот, как лизин, орнитин. Диагностические сахара отсутствуют. Характерен в основном для представителей рода *Actinomyces*.

VI хемотип клеточной стенки предполагает наличие лизина и аспарагиновой кислоты (иногда глицина). Обнаружен у вида

В 1970 г. в этанол-эфирных экстрактах целых клеток нокардий, но не других актиномицетов, с помощью тонкослойной хроматографии польским учёным Еленой Мордарска с соавторами был выявлен нерастворимый в метаноле липид, названный “липидом, характерным для нокардий” (Lipid Characteristic of Nocardia, LCN-A) [Mordarska et al., 1972]. Было установлено, что он представляет собой комплекс свободных миколовых кислот (числом до 15), экстрагируемых спиртово-эфирной смесью. В дальнейшем многие учёные выявили липид LCN-A у представителей родококков, коринебактерий, но не у микобактерий, более высокомолекулярные (C₆₀–C₉₈) миколовые кислоты которых не извлекаются этанол-эфирным (петролевым) растворителем и не выявляются на хроматограмме. Миколаты микобактерий извлекаются хлороформом.

Нерастворимость миколовых кислот микобактерий в смеси спирт-эфир положена в основу быстрого метода дифференциации микобактерий от других представителей (нокардий, родококков и коринебактерий) с IV хемотипом клеточной стенки. Тест LCN-A помогает разграничить эти труднодифференцируемые таксоны.

Липид LCN-A, выявляемый из актинобактерий родов *Corynebacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus*, имеет на тонкослойных хроматограммах неодинаковое положение: более высокое значение R_f характерно для липида, изолируемого из нокардий, ниже всех на хроматограмме располагается липид из коринебактерий, промежуточное положение между коринемиколовыми и нокардиомиколовыми кислотами занимают миколовые кислоты, выделенные из родококков (рис. 17).

Таким образом, неизменное присутствие миколовых кислот определённого типа у тех или иных актинобактерий делает их надёжным и ценным хемотаксономическим критерием в классификации и идентификации прокариотов с IV типом клеточной стенки.

Полярные липиды

Полярные липиды являются основными компонентами липидного бислоя мембран бактерий, обладают огромным разнообразием структур и часто используются для целей классификации

Более консервативный радикал из 20–25 атомов углерода занимает α -положение. Более переменный радикал из 50–65 атомов углерода (так называемый меромиколат) занимает β -положение. В структуре меромиколатного радикала обычно присутствует до четырех двойных связей, циклопропановые и эпокси-кольца, а также метильные, кето- и метоксигруппы. Миколовые кислоты у актинобактерий группы “*mycolata*” различаются по длине углеродных цепей (от 20 до 80 атомов С), числу двойных связей, природе заместителей (метильные, кето- и метоксигруппы, циклопропановые и эпокси-кольца), соотношению длин алифатических цепей при С₂- и С₃-атомах жирной кислоты. Миколовые кислоты в комплексе “пептидогликан – арабиногалактан – миколовые кислоты” формируют основу внешнего липидного барьера непроницаемости клеточной стенки.

Данные о наличии и структуре миколовых кислот получают с помощью препаративной тонкослойной хроматографии и последующей газовой хроматографии, а также хромато-масс-спектрометрии.

У актинобактерий группы “*mycolata*” миколовые кислоты связаны эфирной связью с арабиногалактаном, который в свою очередь связан с муреином клеточной стенки. Миколовые кислоты присутствуют в клеточных стенках, например, представителей родов актинобактерий *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *No-cardia*, *Rhodococcus* и др. Миколовые кислоты микобактерий – сложная смесь кислот с высоким молекулярным весом – С₆₀–С₉₈. Нокардиям свойственны миколовые кислоты с 40–58 атомами углерода; большинству родококков – с 35–64, коринебактериям – с 20–36 атомами углерода.

На основании хемотипов клеточной стенки не всегда представляется возможным различить, например, истинные нокардии, микобактерии, родококки и коринебактерии. Представители этих родов актинобактерий имеют IV тип клеточной стенки, содержащей мезо-ДАПК, арабинозу и галактозу в больших количествах. Дифференцировать их позволяет метод определения свободных миколовых кислот (англ. “*mycolic acid*”), содержащих от 0 до 4 двойных связей, путём анализа спиртово-эфирных клеточных экстрактов на тонкослойных хроматограммах.

Actinomyces bovis, характерен для родов *Arcanobacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Oerskovia*, *Promicromonospora*, *Renibacterium*, *Rothia*, *Stomatococcus*.

VII хемотип клеточной стенки предполагает наличие 2,4-диаминомасляной кислоты, лизина и аспарагиновой кислоты (иногда глицина). Характерен для представителей родов *Agromyces*, *Microbacterium*, *Clavibacter*.

VIII хемотип клеточной стенки предполагает присутствие орнитина. Характерен для родов *Aureobacterium*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*.

IX хемотип клеточной стенки предполагает наличие мезо-ДАПК и многих других аминокислот. Характерен для представителей рода *Mycoplana*.

Все клеточные стенки содержат аланин, глутаминовую кислоту, глюкозамин и муравовую кислоту. Чаще всего в клеточных стенках мицелиальных актинобактерий обнаруживают мезо- и LL-ДАПК и диаминомасляную кислоты, глицин, лизин, орнитин и аспарагиновую кислоту.

Основные дифференцирующие компоненты бактериальных клеток определяются с помощью хроматографических методов, основанных на различиях в скоростях миграции растворённых веществ в гетерофазной системе.

Моносахаридный и аминокислотный состав устанавливается методом бумажного хроматографического анализа. Фiltroвальная бумага является носителем неподвижной фазы, а система растворителей – подвижной фазой, которая перемещается по хроматограмме под действием капиллярных сил. Аминокислоты, входящие в пептидную часть пептидогликана, определяются в гидролизатах целых клеток методом восходящей хроматографии на бумаге.

Хиноны и терминальные оксидазы дыхательной цепи

Хиноны – это циклические дикетоны, в молекулах которых кетогруппы входят в систему сопряжённых двойных связей. Хиноны склонны к участию в окислительно-восстановительных процессах. Они являются переносчиками электронов (между окисляемым субстратом и восстанавливаемым кислородом) в дыхательной цепи. При соединении (захвате) электронов они образуют ароматические системы, что энергетически выгодно для

прокариотного организма. Образующиеся при этом ароматические двухатомные фенолы легко окисляются с образованием исходных хинонов (обратимые реакции).

Выделяют три класса хинонов: (1) нафтохиноны; (2) бензохиноны; (3) бензотиофенхиноны (рис. 15). Таксономическое значение имеют особенности структуры и свойства хинонов, исследуемые с помощью метода масс-спектрометрического анализа.

Большинство членов доменов *Bacteria* и *Archaea* синтезируют производные нафтохинона: менахиноны (витамины группы К), менатиохиноны, ди- и монометилменахиноны [Collins et al., 1977; Collins, 1985]. Другие производные нафтохинона – хлоробиймихиноны, в частности, обнаружены у фототрофных бактерий семейства *Chlorobiaceae*, метилменахиноны выявлены в клетках экстремально термофильных и ацидофильных архей, принадлежащих к виду *T. acidophilum*. Производные бензохинона – убихиноны (липофильные коферменты) обнаружены среди членов классов *Alpha*- и *Betaproteobacteria*. Бензотиофенхиноны, кальдариеллахиноны и сульфолобусхиноны найдены у представителей порядка *Sulfolobales* [Tindall et al., 2010].

В систематике прокариотов используются терминальные оксидазы дыхательной цепи, в том числе оксидазный тест, основанный на реакции цитохрома *c* с тетраметил-*p*-фенилендиамин. Оксидазоотрицательные и оксидазоположительные бактерии характеризуются различным составом дыхательной цепи. Положительный результат дают, например, представители *Pseudomonas*, отрицательный – *Proteus*. Одной из особенностей дыхательной цепи бактерий является множественность форм терминальных оксидаз. Последние, в зависимости от структуры активного центра, подразделяются на три основные группы: суперсеме́йство “тем-медь” оксидаз, класс дигемовых оксидаз и циа-нидрезистентные оксидазы негемовой природы.

Подавляющее большинство оксидаз представлено суперсеме́йством “тем-медь” оксидаз. Данные ферменты состоят из нескольких субъединиц и имеют два активных центра А и Б. Центр А принимает электроны из дыхательной цепи и передаёт их центру Б, который реагирует с кислородом. Центр А характерен для цитохромоксидаз и содержит два атома меди. В центре Б

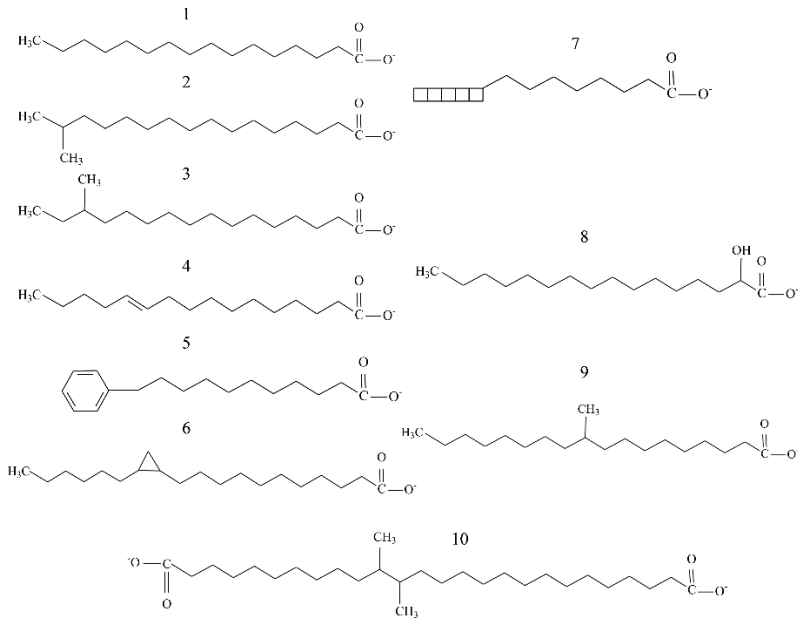
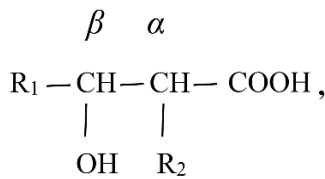


Рис. 16. Примеры жирных кислот бактерий, согласно M.S. da Costa с соавт. [2011]: 1 – насыщенная неразветвленная жирная кислота, 2 – насыщенная изо-разветвленная жирная кислота, 3 – насыщенная антеизо-разветвленная жирная кислота, 4 – ненасыщенная неразветвленная жирная кислота, 5 – циклогексильная жирная кислота, 6 – циклопропановая жирная кислота, 7 – ладдерановая жирная кислота, 8 – 2-гидроксижирная кислота, 9 – насыщенная, разветвленная посередине цепи жирная кислота, 10 – дикарбоновая жирная кислота

Миколовые кислоты (от лат. “*myco*” – гриб) – длинноцепочечные α -разветвлённые жирные β -гидроксикислоты с двумя алкильными радикалами (R_1 -CHОН-CH R_2 -COОН):



где R_1 , R_2 – алкильные группы есть радикалы предельных углеводородов (метил-, этил- и т.д.).

шое количество штаммов с минимальными усилиями и затратами, получать наглядную информацию для характеристики организмов.

В качестве диагностических чаще всего используют следующие жирные кислоты (или их группы): насыщенные (предельные одноосновные кислоты с нормальной цепью, не имеют двойных связей между атомами углерода), например, 16:0 – пальмитиновая, 18:0 – стеариновая и др.; мононенасыщенные (моноеновые), например, 18:1 (*n*-9) – олеиновая и др. и полиненасыщенные (полиеновые), например, 18:2 (*n*-6) – линолевая, 18:3 (*n*-3) – альфа-линоленовая, 18:3 (*n*-6) – гамма-линоленовая, 20:4 (*n*-6) – арахидоновая, 20:5 (*n*-3) – эйкозапентаеновая и др. имеют одну двойную связь или более; изо- и антеизо- разветвлённые жирные кислоты; гидроксикислоты, циклопропановые, ω -циклические, дикарбоновые, ладдерановые жирные кислоты и др. (рис. 16).

Жирные кислоты, обнаруженные в бактериальных клетках, чаще всего имеют чётное (от 12 до 20) число атомов углерода и относительно просты по химической структуре. Наиболее распространёнными являются насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с одной двойной связью, обычно в *цис*-конфигурации. Полиненасыщенные жирные кислоты в небольшом количестве встречаются в бактериальных клетках, растущих при низких температурах, а также цианобактерий. Циклогексановые и циклогептановые жирные кислоты, обычно связанные с сахарами и аминокислотами, обнаружены у представителей рода *Alicyclobacillus* и ряда родов семейства *Microbacteriaceae*, необычные жирные кислоты – у бактерий вида *Gaiella occulta* и видов рода *Rubrobacter*. Дикарбоновые жирные кислоты выявлены в клетках *Thermoanaerobacter ethanolicus* и бактерий порядка *Thermotogales*, ладдерановые жирные кислоты – у анаэробных бактерий.

В классификации и идентификации некоторых представителей актинобактерий с IV хемотипом клеточной стенки надёжным хемотаксономическим признаком является неизменное присутствие в клетках миколовых кислот определённого типа.

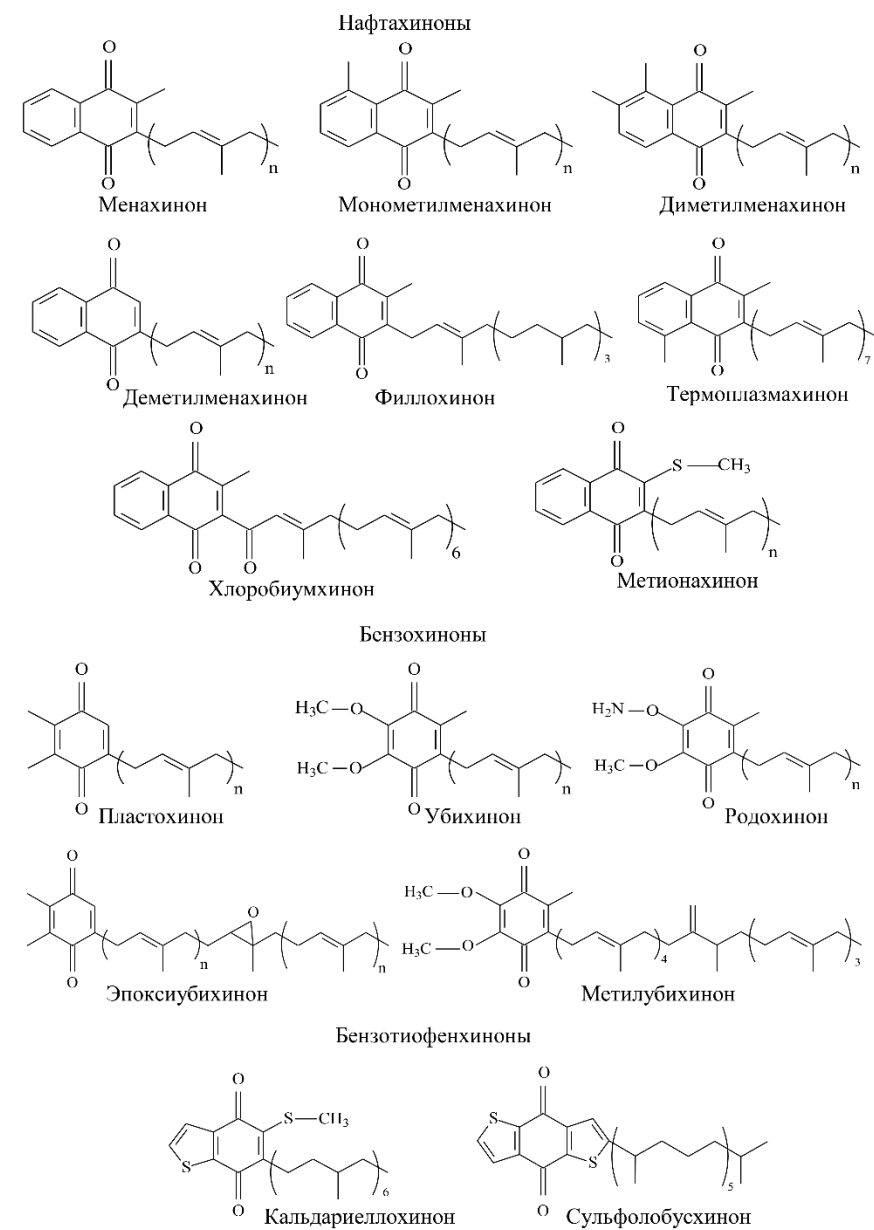


Рис. 15. Структура нафто-, бензо- и бензотиофенхинонов

локализованы два гема и атом меди. Хинолоксидазы не имеют центра А. У всех оксидаз суперсемейства “тем-медь” активный центр локализован внутри цитоплазматической мембраны.

Класс дигемовых оксидаз ограничен ферментами *bd*-типа, которые являются исключительно хинолоксидазами. В активном центре этих оксидаз отсутствует атом меди, а сам центр локализован на внутренней стороне цитоплазматической мембраны.

Цианидрезистентные оксидазы негемовой природы у бактерий изучены недостаточно полно. Исключение составляет цианидрезистентная оксидаза, обнаруженная в клетках *H. pylori* и акцептирующая восстановительные эквиваленты из основной дыхательной цепи на уровне НАДН-дегидрогеназы. Она состоит из двух белков, восстановление дисульфидной связи в одном из них и последующее окисление образовавшихся сульфгидрильных групп обеспечивает функционирование этого фермента. У большинства бактерий цианидрезистентные оксидазы негемовой природы акцептируют электроны на уровне хинон-цитохрома *b*, а их биосинтез происходит в неоптимальных ростовых условиях.

Выделение, очистка и установление структуры оксидаз – весьма трудоёмкий процесс. Для обнаружения оксидаз в бактериальных клетках используются спектрофотометрические и химические методы.

Состав жирных кислот

Жирные кислоты – алифатические карбоновые кислоты с открытой длинной цепью углеродных атомов – являются обязательными компонентами липидов и липополисахаридов большинства прокариотных клеток. В бактериях присутствует свыше 300 жирных кислот и родственных соединений. Жирные кислоты входят в состав сложных липидов, этерифицируют оксигруппы белков, полисахаридов и могут находиться в бактериальной клетке в свободном виде. Анализ жирных кислот признаётся сравнительно простым способом разграничения близкородственных организмов, не имеющих явных отличительных фенотипических характеристик.

Таксономическая ценность этого признака долгое время подвергалась сомнению из-за того, что состав жирных кислот

в значительной мере зависит от возраста культуры, условий её выращивания (состава питательной среды, pH, температурного режима). Несмотря на это, в последние годы он стал одним из ведущих хемотаксономических признаков, в частности актинобактерий. При строгом соблюдении общих требований к выращиванию культур, стандартизации условий культивирования свежесделанных и эталонных штаммов, стандартизации исследуемого материала (для анализа жирных кислот целесообразно использовать клетки, находящиеся в стационарной фазе роста) качественный состав жирных кислот достаточно постоянен. Сегодня определение жирнокислотного состава прокариотных клеток принято обязательным критерием при описании нового таксона [Tindall et al., 2010б; da Costa et al., 2011].

Обыкновенно экстрагируют общую фракцию жирных кислот, но анализируют и отдельные фракции (полярные липиды). Состав метиловых эфиров жирных кислот – устойчивый параметр при условии, что используются высокостандартизованные условия культивирования. Метилированные жирные кислоты обычно разделяют методом газожидкостной хроматографии. При этом широко используются различные инструментальные системы, в частности автоматизированная система микробной идентификации Шерлока (The Sherlock Microbial Identification System, MIS, MIDI Inc., США). Присутствие и относительное содержание метилированных жирных кислот характеризуют жирнокислотные профили бактерий.

Анализ состава жирных кислот пригоден для точной идентификации прокариотов на родовом уровне. Однако спектр жирных кислот отдельных видов бактерий может быть настолько характерным, что определение его не оставляет сомнений в видовой принадлежности культур. Удобными параметрами для дифференциации бактериальных таксонов являются длина углеводородной цепи, степень ненасыщенности, положение двойной связи и наличие замещающих групп (гидрокси-, кето-, эпокси-, циклопропановых, циклопентановых и др.) в жирных кислотах.

В рамках полифазной таксономии анализ клеточных жирных кислот полезен в качестве экспрессного и сравнительно недорогого метода, позволяющего сравнивать и группировать боль-

Карпов С.А. Система простейших: история и современность. СПб.: Тесса, 2005. 72 с.

Красильников Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1949. 838 с.

Красильников Н.А. Лучистые грибки. Высшие формы. М.: Наука, 1970. 534 с.

Кун Т. Структура научных революций / пер. с англ. И.З. Налётова. М.: АСТ, 2009. 310 с.

Кунин Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. М.: ЗАО “Изд-во Центрполиграф”, 2014. 527 с.

Любищев А.А. Проблемы формы, систематики и эволюции организмов. М.: Наука, 1982. 278 с.

Майр Э. Принципы зоологической систематики. М.: Мир, 1971. 454 с.

Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов: учебник: в 3 т. 2-е изд. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2007. Т. 1. 352 с.

Прангишвили Д.А. Молекулярная биология археобактерий. Тбилиси: Мецниереба, 1989. 170 с.

Розанов А.Ю. Бактериально-палеонтологический подход к изучению метеоритов // Вестник Российской академии наук. 2000. Т. 70, № 3. С. 214–223.

Фролов А.О., Костыгов А.Ю. Простейшие, протисты и протоктисты в системе эукариот // Труды Зоологического института РАН. Приложение № 2. 2013. С. 191–201.

Шестаков С.В. Роль горизонтального переноса генов в эволюции. 2003. URL: <http://www.bionet.nsc.ru/live/live-print.php?f=doclad&p=shestakov> (дата обращения: 25.07.2019).

Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экологическая генетика. 2007. Т. 5, № 2. С. 12–24.

Шестаков С.В. Горизонтальный перенос генов у эукариот // Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13, № 2. С. 345–354.

Щёголев С.Ю. Разработка и визуализация больших массивов данных в таксономических и эволюционных исследованиях

с высокой точностью и разрешением. Рибосомные белки (“housekeeping” белки) достаточно консервативны, что обеспечивает их таксономическую специфичность.

Технология MALDI-ToF MS внесла существенные изменения в лабораторный процесс идентификации чистых культур микроорганизмов, проявляющиеся в возможности рекордного сокращения его продолжительности до нескольких минут и использования микроколичеств биомассы, необходимой для анализа [Schmidt et al., 2012].

В основе метода MALDI-TOF MS лежит мягкая ионизация смеси биомассы исследуемых микроорганизмов (или экстракта) с органическим матриксом под воздействием импульсного лазерного излучения. Матрикс представляет собой вещество, обладающее сильной степенью поглощения оптической энергии в диапазоне, излучаемой лазером длины волны. Эффективность метода в значительной мере зависит от природы матрикса, количественного соотношения матрикса и анализируемого соединения, способа пробоподготовки, мощности лазерного излучения. В качестве матрикса используются органические вещества с высокой способностью кристаллизоваться с включением в свою структуру молекул анализируемого вещества и оставаться в твёрдой кристаллической форме при низком давлении, активно поглощать излучение используемого лазера, а также обладать высокой инертностью к анализируемым соединениям (образцам) и хорошей растворимостью в органических растворителях. На практике в качестве матрикса чаще всего применяются α -циано-4-гидроксикоричная (α -CHCA), 2,5-дигидроксibenзойная (DHB), синапиновая (SA), феруловая (FA) кислоты, в качестве растворителей – вода, этанол, ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, хлороформ или их смеси в различных соотношениях.

Поглощение матриксом энергии лазера приводит к десорбции анализируемых веществ с их ионизацией и переходом в газовую фазу. Под воздействием электрического поля образовавшиеся однозарядные ионы движутся в вакуумной трубе от источника ионизации (катода) к аноду-детектору. При этом ионы с малой массой “летят” быстрее, чем большие. Таким образом, время пролёта, необходимое для достижения ионами детектора, зависит

от отношения массы к заряду (m/z), которое в случае однозарядных ионов ($z=1$) равно их массе. Масс-спектр исследуемого вещества на выходе детектора состоит из пиков различной интенсивности, находящихся в диапазоне масс от 2 до 20 кДа. Регистрируемые пики в этом диапазоне масс (2000–20000 m/z) соответствуют рибосомным и конститутивным белкам.

Обычно на спектре наблюдают многочисленные пептиды, такие как те, что получают из рибосомных белковых фракций, которые имеют низкомолекулярную массу и легко ионизируются. Уникальная природа используемых детерминант позволяет не только определять вид микроорганизма, но и устанавливать филогенетическое сходство исследуемых штаммов путём проведения кластерного анализа.

При этом пробоподготовка образца для исследования методом MALDI-TOF MS занимает не более 5–7 мин. Часть изолированной колонии микроорганизмов собирают с плотной питательной среды и наносят тонким слоем на специальный слайд-подложку, после чего добавляют матрикс. После заполнения слайда и полного высыхания матрикса образцы помешаются в камеру масс-спектрометра для проведения анализа. Идентификация микробных культур проводится в масштабе реального времени путём автоматического попарного сравнения полученных масс-спектральных белковых профилей с эталонными спектрами, находящимися в базе данных, при этом указывается уровень достоверности результатов. Для идентификации одного образца требуется не более 2 мин.

Сильные стороны метода – высокая скорость, простота анализа и относительно низкая стоимость расходных материалов, а также возможность автоматической идентификации большого набора штаммов. Недостаток метода – нестабильность при определении до уровня вида, что особенно характерно при анализе целых клеток грамположительных бактерий, когда лазерного излучения недостаточно для разрушения толстостенных клеток и ионизации внутриклеточных белков и белков клеточной стенки. В этом случае применяют предварительную ферментативную обработку клеток лизоцимом или ультразвуком, а также суспензирование клеточной биомассы в разнообразных раство-

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Бурыгин Г.Л., Попова И.А., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В., Матора Л.Ю., Щёголев С.Ю. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupine* IPA7.2 // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52, № 1. С. 105–115.

Вернадский В.И. Биосфера и ноосфера. М.: Айрис-пресс, 2004. 576 с.

Воробьёва Л.И. Археи: учебное пособие для вузов. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2007. 447 с.

Громов Б.В. Удивительный мир архей // Соросовский образовательный журнал. 2007. № 4. С. 23–26.

Гутина В.Н. Макротаксономия / ВИНТИ. М., 1992а. 224 с.

Гутина В.Н. Филогенетическая систематика бактерий / Институт истории естествознания и техники РАН. М., 1992б. 331 с.

Заварзин Г.А. Фенотипическая систематика бактерий. Пространство логических возможностей. М.: Наука, 1974. 142 с.

Заварзин Г.А. Прокариотные системы в связи с филогенией бактерий // Журнал общей биологии. 1979. Т. 40. С. 5–16.

Заварзин Г.А. Становление системы биогеохимических циклов // Палеонтологический журнал. 2003. Т. 6. С. 16–24.

Заварзин Г.А. Естественные классификации бактерий. Лекция на ICOMID-2008, 27 сентября 2008 г. // Какосфера. Философия и публицистика. М.: Ruthenica, 2011а. С. 425–459.

Заварзин Г.А. Какосфера. Философия и публицистика. М.: Ruthenica, 2011б. 460 с.

Заварзин Г.А. Избранные труды / Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. М.: МАКС Пресс, 2015. 512 с.

Заварзин Г.А. Фенотипическая систематика бактерий: Пространство логических возможностей. М.: ЛЕНАНД, 2018. 152 с.

Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Книжный дом “Университет”, 2001. 256 с.

род на основе полифазного подхода. При этом следует отметить, что какой бы подход не применялся в таксономии прокариотов, он всегда будет прагматичным. На настоящий момент “*систематика прокариотов* (как научная дисциплина) *находится в стадии глубокого осмысления своих принципов, а также того, как осуществить её второе возрождение, вызванное наблюдаемым сегодня технологическим прогрессом*” [De Vos et al., 2017]. Соответственно новым задачам должна быть построена и объективная (естественная) система живых организмов.

Работа выполнена в рамках государственных заданий 6.3330.2017/4.6 (ПГНИУ) и 01201353247 (ПФИЦ УрО РАН).

рителях. Для грамотрицательных бактерий достаточно тщательного перемешивания исследуемого образца с растворителем. Метод MALDI-ToF MS успешно использовался для экспресс-идентификации неферментирующих грамотрицательных бацилл, анаэробных бактерий, а также многочисленных возбудителей инфекционных заболеваний *Bordetella* и *Mycobacterium*. Более широкое применение данной технологии для видовой идентификации природных изолятов до сих пор ограничено из-за отсутствия сведений о масс-спектрах белковых профилей типовых штаммов большинства известных видов и, как следствие, использования неполных баз данных.

Таким образом, общепринятая идентификация бактерий по совокупности фенотипических (в том числе хемотаксономических) признаков всё-таки довольно длительна и трудоёмка. Несмотря на это, большинство бактерий в диагностических лабораториях будут продолжать определять классическими методами, поскольку эти методы адекватные, относительно недорогие и легкодоступные.

Иммунологические методы, используемые в диагностической микробиологии

Часто для подтверждения предположительной (экспериментальной) идентификации используются серологические методики, если исследуемый организм – один из тех, для которого имеется антисыворотка для типирования.

В качестве одного из перспективных таксономических критериев при видовой дифференциации бактерий часто используются их антигенные характеристики, выявляемые в иммунохимических реакциях с помощью диагностических иммунных сывороток. Основное преимущество иммунохимических методов исследований – их высокая чувствительность и специфичность. Так, выявляемое в реакции иммунодиффузии минимальное количество антител в пересчёте на белковый азот составляет 3–10 мкг/мл, в реакции иммунофлуоресценции – 0,005–0,1 мкг/мл.

Разрешающая способность иммунохимических реакций настолько велика, что позволяет различать не только белки близких в филогенетическом отношении бактерий, но и весьма сходные вещества. Например, *D*-глюкоза и *D*-галактоза отличаются

друг от друга лишь по конфигурации гидроксила у 4-го атома углерода, но в иммунохимических реакциях отмечена чёткая разница этих веществ.

Бактерии в пределах рода и вида отличаются антигенной структурой. Бактериальные клетки содержат мозаику различных антигенов в цитоплазме, оболочке, капсуле. Наиболее богаты антигенами поверхностные структуры бактерий.

Под антигеном понимают чужеродные вещества, индуцирующие в макроорганизме образование антител и способные вступать в специфическую реакцию с гомологичным антителом. Главное в антигене – его иммуногенность, т.е. способность вызывать специфический иммунный ответ макроорганизма (образование гомологичных антител). К антигенам относятся белки, полисахариды, некоторые липополисахариды. Стимулировать образование антител к гаптенам и нуклеиновым кислотам можно при условии присоединения этих соединений в качестве носителей к большой белковой молекуле. Специфичность антигенов заключается в способности реагировать только с соответствующими им гомологичными антителами.

Антитела – это белки иммунной сыворотки, иначе иммуноглобулины, образующиеся в организме под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться.

При постановке иммунохимических реакций необходимо наличие бактериальных антигенов и специфических антител, т.е. специфических иммунных сывороток, получаемых из крови животных-продуцентов после введения им гетерогенного антигенного материала.

Иммунохимические методы исследования широко использовались и используются в медицинской микробиологии для дифференциации патогенных микроорганизмов – возбудителей ряда инфекционных заболеваний, тогда как в общей микробиологии эти методы до сих пор ещё мало привлекательны.

Данные о влиянии различных внешних факторов на антигенную структуру бактерий немногочисленны. Например, антигенная структура клеток *Nocardia asteroides*, имеющих различные (нитевидная, палочковидная, сферическая) морфологические формы, одинакова. Вместе с тем установлено, что клеточные

проведения лишь простых, быстрых и недорогих биохимических анализов [Cowan, 1971]. Идеи Коуэна легко адаптируются в современной методологии. Если подход первого уровня не справляется с поставленной задачей, то можно использовать имеющиеся альтернативные процедуры. По ряду причин, в том числе полнота (обширность) общедоступных баз данных, анализ полных последовательностей генов 16S рРНК – наиболее прямой и очевидный выбор для установления приблизительной идентичности изолята, хотя нередко и он не справляется с дифференциацией близкородственных видов. Его сильная сторона – стабильная способность выявлять филогенетическое соседство исследуемого организма, такую информацию не даёт ни один другой протокол современной идентификации. Эта информация задаст направление дополнительным анализам, необходимым для окончательной идентификации на уровне вида. Поэтому чаще всего точная идентификация на уровне вида – двухэтапный процесс, в котором неизвестный объект классифицируют в определённую группу, после чего его можно точно идентифицировать на уровне вида. Первое достигается посредством сиквенс-анализа генов 16S рРНК с использованием универсальных праймеров, а второе – посредством подходящего подбора обязательных генов и специфичных праймеров после установления предварительной идентичности неизвестного объекта [Thompson et al., 2013; Ramasamy et al., 2014]. Процедуру идентификации свежевыделенного штамма, как правило, проводят путём сравнения фенотипических, хемотаксономических и генотипических/молекулярных характеристик с таковыми типовых штаммов по надёжным, воспроизводимым и информативным таксономическим схемам.

Таким образом, современный этап развития систематики прокариотов характеризуется как период консенсусной таксономии, суть которой в выявлении соответствия филогенетических характеристик организма фенотипическим, получаемым с использованием различных методов. Дальнейшее развитие прокариотной систематики предполагает комплексное изучение геномных и фенотипических характеристик не исследованных ранее и известных организмов, научный поиск и оценку таксономической значимости новых групп относительно стабильных признаков, позволяющих определять сходство геномов на уровне вид–

при описании родов, относятся такие хемотаксономические признаки, как состав аминокислот пептидогликана клеточной стенки или преобладающие менахины дыхательной цепи и др., а также специфические лишь для отдельных родов, рекомендованные в качестве дополнительных.

Операционная таксономическая единица (ОТЕ) бактериальной классификации (вид) также определяется с использованием полифазного подхода. При этом мы знаем, что первостепенную роль играет уровень ДНК-ДНК гомологии около 70 %. Количество и природа фенотипических признаков, характеризующих вид, должны перекрывать спектр внутривидовой изменчивости, т.е. вновь изолируемые представители вида должны быть фенотипически узнаваемы.

С появлением в 1990-х гг. революционно нового метода полногеномного секвенирования и аннотации геномов стал возможным доступ к полной генетической информации штаммов [Ramasamy et al., 2014]. В обобщённой базе данных микробных геномов Объединённого института генома (The Joint Genome Institute's Integrated Microbial Genomes database, <https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>) по состоянию на май 2019 г. представлено 72857 геномов бактерий, архей и эукариотов.

Для таксономических целей разработаны такие дочерние методы, как анализ мультилокусной последовательности (MLSA), средней нуклеотидной идентичности (ANI) и другие [Glaeser, Kämpfer, 2015]. В настоящее время общепринято, что значение 95–96 % средней нуклеотидной идентичности (ANI) приравнивается к величине ДНК-ДНК гибридизации, равной 70 % [Kim et al., 2014]. Следует отметить, что новые методики пока ещё не рассматриваются в качестве широко используемого источника таксономической информации и требуется их верификация.

В заключение необходимо подчеркнуть, что идеальная с точки зрения науки и экономики методика идентификации прокариотов остаётся пока вне пределов досягаемости. Для многочисленных изолятов достаточны интуитивный подход Самуила Коуэна, который используется тогда, “когда идентичность неизвестного объекта предвосхищается, ожидается”, и поэтапный метод (с использованием дихотомных ключей), которые требуют

стенки и растворимые фракции палочковидных клеток *Arthrobacter globiformis* обладают более сложным антигенным составом, чем соответствующие фракции кокковидных форм этих организмов. Сотрудниками лаборатории алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (Пермь, Россия) установлен уникальный факт появления в клетках пропанооксиляющих родококков в условиях перехода их с углеводного на углеводородный тип питания дополнительных специфических антигенов, указывающих на развитие бактериальных клеток за счет конкретного ростового субстрата – газообразных углеводородов пропана и *n*-бутана.

В систематике бактерий существуют два подхода к применению иммунохимических методов. Первый состоит в идентификации штаммов на основании сходства или различия антигенов поверхности бактериальной клетки. Второй, успешно развивающийся в последние годы, состоит в определении иммунохимических различий между белками из различных бактерий.

Среди многочисленных иммунохимических реакций достойное место занимает метод иммунодиффузии в агаровом геле (метод преципитации в агаре), позволяющий проводить анализ сложного набора растворимых антигенов и преципитирующих антител в испытуемых системах. Отличительной чертой иммунодиффузионного анализа является возможность индивидуально исследовать каждую пару “антиген – антитело”, так как при встречной иммунодиффузии в агаре различные антигены образуют независимые линии преципитации с соответствующими антигенами.

В практической бактериологии используется метод флуоресцирующих антител, в котором для индикации образовавшегося комплекса “антиген–антитело” в один из исходных компонентов реакционной системы вводится метка, которую легко можно обнаружить соответствующим высокочувствительным физико-химическим методом. Удобными для этой цели оказались флуоресцентные метки (флуоресцирующие красители), так называемые флуорохромы. Чаще всего используется флуорохром изоционат флуоресцеина, применение которого даёт возможность увеличить чувствительность иммунохимического метода в 100 раз, например, по сравнению с иммунодиффузионным методом анализа.

При использовании меченых флуорохромами специфических антител (иммуноглобулинов) в испытуемом материале находят бактериальные антигены. При соединении меченого антитела с бактериальным антигеном образуется светящийся комплекс, просматриваемый в люминесцентном микроскопе. Окрашенные антигены (бактерии) имеют вид светящихся жёлто-изумрудных образований (цвет наиболее часто применяемого красителя – изоционата флуоресцеина).

Методы иммунохимического анализа, в частности иммунофлуоресцентного анализа, использовались для детекции и идентификации микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам, например, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, а также для выявления и дифференциации отдельных видов экстремофильных бактерий – *T. acidophilum*, *Sulfolobus acidocaldarius*. Вопросам изучения возможности применения иммунохимических методов анализа для дифференциации представителей родов *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и отдельных видов этих бактерий посвящён целый цикл исследований, проведённых в лаборатории алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (ПФИЦ УрО РАН). В связи с этим ИЭГМ УрО РАН является одним из немногих академических учреждений, где методы иммунохимического анализа успешно используются в таксономических исследованиях непатогенных бактерий.

Таким образом, существует большое разнообразие признаков, с большим или меньшим успехом используемых в практике диагностирования бактерий различных таксономических групп. Для характеристики бактерий применяют разнообразные химические вещества, в том числе жирные кислоты, миколовые кислоты, полярные липиды, полисахариды, сахара, полиамины и хиноны, а также огромное количество выраженных признаков (данные, полученные, например, в морфологических, серологических и энзиматических исследованиях). Некоторые из этих подходов использовались в таксономическом анализе практически всех бактерий. Другие (например, секвенирование аминокислот) – лишь ограниченного числа организмов, поскольку они трудоёмкие, требуют много времени или технически сложные, уместные для определённой группы микроорганизмов.

С января 2018 г. Международный комитет по систематике прокариотов и его печатный орган журнал IJSEM требуют представлять данные о полной геномной последовательности при описании нового таксона [Chun et al., 2018].

Если вам не удалось идентифицировать неизвестный организм с первой попытки, рассмотрите следующие возможные варианты, может быть, ваш организм дал “ошибочно” отрицательную реакцию на проведённые тесты по причине неточного приготовления среды, фальсифицированных реактивов для теста или неправильно выбранной методики. Ваш неизвестный организм может не соответствовать в точности описанию, данному в Определителе Берджи. Иными словами, результаты теста, как указано в справочнике, не всегда могут быть приемлемы. Культура, возможно, заражена. Если вы работаете не с чистой культурой, все тесты дают ненадёжные результаты. Проверьте различные таблицы в Определителе Берджи, возможно, есть какой-либо другой тест, пригодный в этой ситуации. И ещё дважды сверьтесь с таблицами, чтобы быть уверенным в том, что вы их правильно поняли.

Безусловно, это всего лишь рекомендации, которым иногда сложно следовать. Адекватная (точная, стабильная, полная) классификация микроорганизмов возможна только при использовании комплексного подхода, сочетающего как можно больше различных методов – от классических (традиционных) до современных (высокоспециализированных). Сейчас разработаны Минимальные стандарты описания новых родов и видов бактерий. Эти стандарты определяют общие требования и набор диагностических характеристик, обеспечивающих “узнаваемость” таксонов вышеупомянутых рангов. В основе всех разработанных сегодня стандартов лежит полифазный принцип выделения и описания таксонов, предусматривающий интегрированное использование различной информации фено- и генотипического характера. Наряду с филогенетическими характеристиками (сравнительным анализом последовательностей гена 16S рРНК и других консервативных генов) стандарты включают фенотипические и генотипические критерии, значимые для описания и дифференциации таксонов на уровне рода и вида. К числу важных фенотипических характеристик, рекомендованных в качестве “обязательных”

память, сделайте запись немедленно. Обычно сведения представляются в бинарном цифровом формате. Положительная реакция (плюс) обозначается 1, отрицательная реакция (минус) – 0.

15. Закодированные сведения подвергаются компьютерной обработке с помощью специализированных программ. Чаще всего используется коэффициент простого совпадения. Анализ сведений выдаёт матрицы сходства, содержащие информацию о взаимоотношениях штаммов. Затем проводятся анализы кластеров с целью получения дендрограммы.

16. Результаты могут быть представлены в виде матриц сходства и в виде дендрограмм, которые дают общую визуальную картину. Надо помнить о том, что дендрограмма обязательно отражает филогенетические взаимоотношения между штаммами, не учитывая этого, можно неверным образом истолковать полученные данные.

17. Таксономический анализ штаммов требует концентрации времени, внимания и усилий. Определение вида культуры – сложный процесс, требующий больших затрат труда и высокой квалификации исследователя. Задача заключается в том, чтобы собрать как можно больше информации, оценить полученные результаты и сделать правильные выводы о принадлежности исследованного изолята к известному или новому таксону.

18. Следуйте правилам Международного кодекса номенклатуры прокариотов. Избегайте труднопроизносимых названий новых таксонов. Итоговым этапом описания нового таксона является обязательное депонирование типового штамма в две общепризнанные коллекции в двух разных странах, а также депонирование нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и полного генома нового штамма в международные базы данных DDBJ/EMBL/GenBank. Валидное опубликование таксона бактерий предусматривает помещение статьи с его детальным описанием в Международном журнале систематической и эволюционной микробиологии (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, IJSEM) или в другом журнале с последующим предоставлением оттиска статьи с его описанием в IJSEM. Если таксон предлагается впервые, после названия нового рода добавляется сокращённая комбинация “gen. nov.”, для нового вида – “sp. nov.” и т.д.

Идентификация прокариотов – весьма трудная задача. В большинстве случаев вы сможете отнести вашу культуру к определённому роду. Отнесение к виду может потребовать помощи специализированной лаборатории.

Основные правила и этапы работы по установлению систематической принадлежности микробных изолятов

Необходимо помнить основные правила работы, связанной с диагностикой бактериальных организмов: (1) используйте всю доступную информацию; (2) на каждом этапе “включайте” здравый смысл и не делайте преждевременных выводов; (3) применяйте минимальное число тестов для идентификации.

При описании и идентификации изолятов исследуют их фенотипические (культуральные свойства, морфологию и организацию клетки, физиолого-биохимические особенности, химический состав клеток) и молекулярно-генетические (содержание гуанина и цитозина в ДНК, последовательность гена 16S РНК, ДНК-ДНК гибридизация, последовательность других генов/MLSA, частичные геномные последовательности) характеристики с использованием объективных, воспроизводимых и информативных таксономических методов (рис. 18).

Практические шаги должны быть следующими [Colwell, Austin, 1981; Roselló-Móra, Amann, 2001; Overmann et al., 2017]:

1. Непременно удостоверьтесь, что имеете чистую живую культуру. Без чистых культур бактериология – занятие безнадёжное.

2. Используйте для инокуляции клетки, находящиеся в активном физиологическом состоянии.

3. Применяйте стандартизованные методики исследования, чтобы избежать субъективных выводов и решить вопрос о воспроизводимости результатов в одной лаборатории или между разными лабораториями.

4. Избегайте проводить описание нового вида на основании одного-единственного штамма, хотя иногда это и невозможно, новые виды и роды нередко описываются на основании лишь нескольких штаммов или даже одного штамма. Постарайтесь собрать адекватное число (минимум 10, лучше 25) штаммов того таксона, который будет исследоваться, и используйте их все

для сравнения. При этом важно идентифицировать один из изолятов в качестве типового или референс-штамма, который будет служить в качестве именного носителя вида и широко использоваться исследователями в качестве референс-образца.

5. На основании процедуры выделения организма из природного образца установите, имеете ли вы дело с хемолитотрофным автотрофом, фотосинтезирующим организмом или хемоорганотрофом.

6. Исследуйте живые клетки с помощью фазового контраста, а клетки, окрашенные по Граму, – с помощью светового микроскопа. Применяйте другие методы окраски, если это представляется уместным. Если бросаются в глаза определённые морфологические особенности, такие, например, как образование эндоспор (или наличие прикреплённых дисков), ограничьте дальнейшие усилия идентификацией группы микроорганизмов, обладающих этими особенностями.

7. Испытайте потребность культуры в кислороде.

8. Исследуйте процесс диссимилиации глюкозы или других простых сахаров и установите, как он развивается – по пути окисления или брожения.

9. Используйте для предварительной идентификации изолята (на уровне рода) методы амплификации и секвенирования (частичной) последовательности гена 16S рРНК, времяпролётную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ ТоФ МС), а также анализ жирнокислотного профиля и коммерческие тест-системы фенотипического анализа.

10. Для выявления филогенетических отношений между исследуемым изолятом и известными видами применяйте анализ полных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, используя два подхода: (1) попарное сравнение последовательности изолята с последовательностями валидно опубликованных видов с помощью баз данных (EzBioCloud, или EMBL, или EzTaxon, в частности) и определение уровня сходства генов 16S рРНК с ближайшими таксонами; (2) множественное выравнивание последовательностей и построение филогенетических деревьев. Это позволит определить круг ближайших видов (родов) для следующего детального сравнительного анализа.

11. При обосновании отнесения изолята к известному или новому виду используйте методы исследования полной генотипической характеристики изолята: ДНК-типирования, мультилокусного анализа генов (MLSA), ГЦ-состава ДНК, ДНК-ДНК гибридизации, вычисления показателей ANI. Организмы, имеющие значения ANI ниже 95–96 % и сходство по ДНК-ДНК гибридизации ниже 70 % с известными видами, могут быть описаны в качестве новых видов.

12. Не используйте показатель сходства ДНК в 70 % как абсолютную границу для ограничения пределов вида. Современная концепция допускает более свободные границы подобия ДНК, позволительна также внутренняя геномная гетерогенность. Отдельный вид может состоять из нескольких геномных групп (геноваров), которые необязательно должны классифицироваться как разные виды. Это станет возможным, когда будет установлен фенотип организмов.

13. Используемые тесты для детальной характеристики фенотипа изолята должны представлять широкий спектр биоактивности свежeweделенной культуры. Оптимальны для цифровой таксономии от 100 до 200 тестов. При этом требуется стандартизация инокулирования и инкубирования сравниваемых штаммов. Включайте в таксономические исследования типовые штаммы близкородственных таксонов.

14. Сделайте попытку охарактеризовать как можно детальнее фенотип изолята. Он основывается не только на изучении метаболизма, но и применении хемотаксономических маркеров (определении, например, жирных кислот, общих липидов и пр.). Чем исчерпывающе описан фенотип, тем точнее вы определите культуру. Следует учитывать, что исследование морфологических и культуральных характеристик, физиолого-биохимических признаков свежeweизолированных культур в значительной степени ограничивается их изменчивостью в зависимости от состава среды, продолжительности культивирования и ряда других факторов. При этом необходимо использовать стандартные методы и среды. Если у вас появляются сомнения в достоверности результатов определённого теста, повторите его: не полагайтесь на случай. Закончив наблюдения или завершив тест, запишите информацию в описательную таблицу. Не полагайтесь на свою

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Назовите основные разделы систематики прокариотных организмов.
2. Каковы цели искусственной классификации прокариотов?
3. Что понимают под естественными системами и какова их роль в классификации прокариотов?
4. В чём состоят иерархический и эколого-трофический принципы конструирования макросистем?
5. Каково значение международных баз данных, позволяющих аккумулировать и анализировать большие массивы научной информации о микроорганизмах?
6. Назовите основные алгоритмы для построения филогенетических деревьев и факторы, влияющие на их топологию (порядок ветвления).
7. Какова основная задача молекулярной филогенетики и какова роль семантид в филогении прокариотов?
8. Перечислите основные методы, используемые в систематике.
9. Назовите основные таксономические единицы и правила использования бинарной номенклатуры.
10. Почему в классификации прокариотных организмов много спорных вопросов?
11. Назовите принципиальные различия между прокариотами и эукариотами.
12. Является ли одноклеточность признаком прокариотов?
13. Как организованы археи, чем они отличаются от бактерий и эукариотов?
14. Как вы понимаете происхождение прокариотов?
15. Как вы понимаете происхождение эукариотов?

живой природы // Известия Саратовского университета. Сер. Физика. 2016. Т. 16, вып. 3. С. 145–167.

Щёголев С.Ю. О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса // Вестник биотехнологии. 2018. Т. 14, № 1. С. 5–14.

Щёголев С.Ю., Бурьгин Г.Л. Опыт применения современных подходов к геносистематике прокариот в таксономических исследованиях ризосферной микрофлоры // Биомика. 2018. Т. 10, № 2. С. 157–161.

Achtman M., Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species // Nature Reviews Microbiology. 2008. Vol. 6. P. 432–440.

Akiba T., Koyama K., Ishiki Y. et al. On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella* // Japanese Journal of Microbiology. 1960. Vol. 4. P. 219–227.

Amann R., Rosselló-Móra R. Reply to “The Underestimation of Global Microbial Diversity” // MBio. 2016. Vol. 7(5):e01623-16. DOI:10.1128/mBio.01623-16.

Blakemore R.P. Magnetotactic bacteria // Science. 1975. Vol. 190, no. 4212. P. 377–379.

Blakemore R.P. Magnetotactic bacteria // Annual Review of Microbiology. 1982. Vol. 36. P. 217–238.

Blakemore R.P., Frankel R.B., Kalmijn A.J. South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern hemisphere // Nature. 1980. Vol. 286. P. 384–385.

Blakemore R.P., Maratea D., Wolfe R.S. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium // Journal of Bacteriology. 1979. Vol. 140. P. 720–729.

Blakemore R.P., Short K.A., Bazylinski D.A et al. Microaerobic conditions are required for magnetite formation within *Aquaspirillum magnetotacticum* // Geomicrobiology Journal. 1984. Vol. 4. P. 53–71.

Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P. Mesophilic *Crenarchaeota*: Proposal for a third *Archaea* phylum, the *Thaumarchaeota* // Nature Reviews Microbiology. 2008a. Vol. 6, no. 3. P. 245–252.

Brochier-Armanet C., Gribaldo S., Forterre P. A DNA topoisomerase IB in *Thaumarchaeota* testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of *Archaea* and *Eucarya* // *Biology Direct*. 20086. Vol. 3. P. 54.

Brock T.D., Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. nov. and sp. nov., a nonsporulating extreme thermophile // *Journal of Bacteriology*. 1969. Vol. 98, no. 1. P. 289–97.

Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1998. Vol. 73. P. 203–266.

Cavalier-Smith T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002. Vol. 52. P. 7–76.

Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2004. Vol. 271, no. 1545. P. 1251–1262.

Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life // *Biological Reviews*. 2007. Vol. 73, no. 3. P. 203–266.

Cavalier-Smith T. Kingdoms *Protozoa* and *Chromista* and the eozoan root on the eukaryotic tree // *Biology Letters*. 2010. Vol. 6. P. 342–345.

Christensen H., Bisgaard M., Frederiksen W. et al. Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision) // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. Vol. 51. P. 2221–2225.

Chun J., Oren A., Ventosa A. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018. Vol. 68, no. 1. P. 461–466.

Coenye T., Gevers D., Van de Peer Y. Towards a prokaryotic genomic taxonomy // *FEMS Microbiology Reviews*. 2005. Vol. 29. P. 147–167.

Cohan F.M. What are bacterial species? // *Annual Review of Microbiology*. 2002. Vol. 56. P. 457–487.

Microbiology Monographs. Biology of *Rhodococcus*. Series Editor A. Steinbüchel. Ed. H.M. Alvarez. Springer, 2019. 386 p.

Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches. Editors S.K. Sharma, A. Varma. Springer, 2018. 451 p.

Parks D.H., Rinke C., Chuvochina M., Chaumeil P.-A. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life // *Nature Microbiology*. 2017. Vol. 2. P. 1533–1542.

The *Prokaryotes*. Third Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria: *Archaea*. *Bacteria: Firmicutes*, *Actinomycetes*. Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt. Springer, 2006. Vol. 3.

Thompson L.R. et al. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity // *Nature*. 2017. Vol. 551. P. 457–463.

Washburne A.D., Morton J., Sanders J., McDonald D. Methods for phylogenetic analysis of microbiome data // *Nature Microbiology*. 2018. Vol. 3, no. 6. P. 652–661.

Oren A., Garrity G.M. Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014. Vol. 106. P. 43–56.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ К ЛЕКЦИОННОМУ КУРСУ
“БИОРАЗНООБРАЗИЕ И СИСТЕМАТИКА
МИКРООРГАНИЗМОВ”**

Основной

Пиневи́ч А.В. Микробиология. Биология прокариотов: учебник: в 3 т. 2-е изд. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2007. Т. 1. 352 с.

Ивши́на И.Б. Большой практикум “Микробиология”: учебное пособие. СПб.: Проспект Науки, 2014. 112 с.

Дополнительный

Пиневи́ч А.В. Микробиология. Биология прокариотов: учебник: в 3 т. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2007. Т. 2. 331 с.

Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егоров, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А.И. Нетрусова. М.: Изд. центр “Академия”, 2005. 608 с.

Рекомендуемый

Куни́н Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. М.: ЗАО “Изд-во Центрполиграф”, 2014. 527 с.

Chun J., Rainey F.A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. Vol. 64, no. 2. P. 316–324.

Chun J., Oren A., Ventosa A. et al. Proposed minimal standards for the use of genome for the taxonomy of prokaryotes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018. Vol. 68, no. 1. P. 461–466.

Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Applications. Ed. I. Kurtböke. Elsevier. Academic Press, 2017. 330 p.

Cohan F.M., Perry E.B. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity // Current Biology. 2007. Vol. 17. P. R373–R386.

Collins M.D. Analysis of isoprenoid quinines // Methods in Microbiology. Gottschalk G. Ed. Academic Press, Inc, London, LTD. 1985. P. 329–366.

Collins M.D., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin D.E. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacterial // Journal of Genetic Microbiology. 1977. Vol. 100. P. 221–230.

Colwell R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species // Journal of Bacteriology. 1970. Vol. 104. P. 410–433.

Colwell R.R., Austin B. Numerical taxonomy // Manual of Methods for General Bacteriology / Gerhardt P., Murray R.G.E., Costilow R.N., Nester E.W., Wood W.A., Krieg N.R., Phillips G.B. Eds. American Society for Microbiology. Washington. DC. 1981. P. 444–449.

Cowan S.T. Principles and practice of bacterial taxonomy – a forward look // Journal of Microbiology and Genetics. 1965. Vol. 39. P. 143–153.

Cowan S.T. Heretical taxonomy for bacteriologists // Journal of Microbiology and Genetics. 1970. Vol. 61. P. 145–154.

Cowan S.T. Sense and nonsense in bacterial taxonomy // Journal of Genetic Microbiology. 1971. Vol. 67. P. 1–8.

Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. Vol. 99. P. 10494–10499.

Da Costa M.S., Albuquerque L., Nobre M.F., Wait R. The identification of fatty acids in bacteria // Methods in Microbiology. 2011. Vol. 38. P. 183–196.

Dawyndt P., Vancanneyt M., De Meyer H., Swings J. Knowledge accumulation and resolution of data inconsistencies during the integration of microbial information sources // IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering. 2005. Vol. 17. P. 1111–1126. URL: <http://www.straininfo.net/>.

De Smet W., De Loof K., De Vos P. et al. Filtering and ranking techniques for automated selection of high-quality 16S rRNA gene sequences // *Systematic and Applied Microbiology*. 2013. Vol. 36. P. 549–559.

De Vos P., Thompson F., Thompson C., Swings J. A flavor of prokaryotic taxonomy: systematics revisited // *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Applications*. Kurtböke I. Ed. Elsevier. Academic Press, 2017. P. 29–44.

Deloger M., El Karoui M., Petit M.A. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera // *Journal of Bacteriology*. 2009. Vol. 191. P. 91–99.

Euzéby J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet // *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997. Vol. 47. P. 590–592. URL: <http://www.bacterio.cict.fr>.

Fraser C., Alm E.J., Polz M.F. et al. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity // *Science*. 2009. Vol. 323. P. 741–746.

Gaucher E.A., Kratzer J.T., Randall R.N. Deep phylogeny – how a tree can help characterize early life on Earth // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010. Vol. 2:a002238. DOI: 10.1101/cshperspect.a002238.

Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G. et al. Re-evaluating prokaryotic species // *Nature Reviews Microbiology*. 2005. Vol. 3. P. 733–779.

Glaeser S.P., Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy // *Systematic and Applied Microbiology*. 2015. Vol. 38. P. 237–245.

Gogarten J.P., Senejani A.G., Zhaxybayeva O. et al. Inteins: structure, function, and evolution // *Annual Review Microbiology*. 2002. Vol. 56. P. 263–287.

Goodfellow M. Suprageneric classification of *Actinomyces* // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / William S.T., Sharpe M.E., Holt J.G. Eds. Baltimore: The Williams and Wilkins. 1989. Vol. 4. P. 2333–2339.

Woese C.R., Fox G.E. The concept of cellular evolution // *Journal of Molecular Evolution*. 1977. Vol. 10. P. 1–6.

Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya* // *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990. Vol. 87. P. 4576–4579.

Woese C.R., Magrum L.J., Fox G.E. *Archaeobacteria* // *Journal of Molecular Evolution*. 1978. Vol. 11, no. 3. P. 245–251.

Yarza P., Richter M., Peplies J. et al. The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains // *Systematic and Applied Microbiology*. 2008. Vol. 31. P. 241–250.

Zeigler D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003. Vol. 53. P. 1893–1900.

Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., De Vos W.M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota // *Gut*. 2008. Vol. 57. P. 1605–1615.

Zuckerkandl É., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history // *Journal of Theoretical Biology*. 1965. Vol. 8, no. 2. P. 357–366.

Jorgensen J., Landry M, Warnock D., Eds. 10th edition. Vol. 1. Section II: Bacteriology. ASM Press, Washington, DC. 2011. P. 213–227.

Vandamme P.A.R., Pot B., Gillis M. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics // Microbiological Reviews. 1996. Vol. 60, no. 2. P. 407–438.

Wais A.C. *Archaeobacteria*: the road to the universal ancestor // BioEssays. 1986. Vol. 5. P. 75–78.

Wang Y., Jiang Y. Chemotaxonomy of actinobacteria. In: *Actinobacteria – basics and biotechnological applications*. Dhanasekaran D. Ed. In Tech Press. 2016. P. 1–27.

Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R. et al. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // International Journal of Systematic Bacteriology. 1987. Vol. 37, no. 4. P. 463–464.

Wisniewski-Dye F., Borziak K., Khalsa-Moyers G. et al. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments // Public Library of Science Genetics. 2011. Vol. 7(12):e1002430. DOI: 10.1371/journal.pgen.100243.

Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiological Reviews. 1987. Vol. 51. P. 221–271.

Woese C.R. Microbiology in transition // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994. Vol. 91. P. 1601–1603.

Woese C.R. The universal ancestor // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. Vol. 95, no. 12. P. 6854–6859.

Woese C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000. Vol. 97, no. 15. P. 8392–8396.

Woese C.R. On the evolution of cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. Vol. 99, no. 13. P. 8742–8747.

Woese C.R., Fox G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977a. Vol. 74. P. 5088–5090.

Goodfellow M., O'Donnell A.G. Handbook of New Bacterial Systematics. Academic Press, London, United Kingdom, 1993.

Goodfellow M., O'Donnell A.G. Modern Microbial Methods. Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. J. Wiley and Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom, 1994. 602 p.

Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A. et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole genome sequence similarities // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. Vol. 57. P. 81–91.

Gupta R.S. Molecular sequences and the early history of life // Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies. Sapp J. Ed. New York. Oxford University Press. 2005. P. 160–183.

Haeckel E. Generelle morphologie der organismen. In 2 volumes. Berlin. G. Reimer. 1866. 574 p. (vol. 1), 462 p. (vol. 2).

Hahn M.W. Description of seven candidate species affiliated with the phylum *Actinobacteria*, representing planktonic freshwater bacteria // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2009. Vol. 59. P. 112–117.

Hahn M.W., Schmidt J., Taipale S.J. et al. *Rhodoluna lacicola* gen. nov., sp. nov., a planktonic freshwater bacterium with streamlined genome // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. Vol. 64. P. 3254–3262.

Hanage W.P., Fraser C., Spratt B.G. Sequences, sequence clusters and bacterial species // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006. Vol. 361. P. 1917–1927.

Hogg J. On the distinctions of a plant and an animal, and on a fourth kingdom of nature // Edinburgh New Philosophical Journal (New Series). 1860. Vol. 12. P. 216–225.

Huber H., Hohn M.J., Rachel R. et al. A new phylum of *Archaea* // Nature. 2002. Vol. 417, no. 6884. P. 63–67.

Huber J.A., Welch D.B.M., Morrison H.G. et al. Microbial population structure in the deep marine biosphere // Science. 2007. Vol. 318, no. 5847. P. 97–100.

Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K. et al. A new view of the tree of life // Nature Microbiology. 2016. Vol. 1. P. 1–6.

Hugenholtz P., Skaewski A., Parks D.H. Genome-based microbial taxonomy coming of age // *Nature Microbiology*. 2016. Vol. 8(6):a018085. DOI: 10.1101/cshperspect.a018085.

Kandler O. Cell wall biochemistry in *Archaea* and its phylogenetic implications // *Journal of Biological Physics*. 1994. Vol. 20. P. 165–169.

Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014. Vol. 64. P. 346–351.

Klein R.M., Cronquist A. A consideration of the evolutionary and taxonomic significance of some biochemical, micromorphological and physiological characters in the thallophyte // *The Quarterly Review of Biology*. 1967. Vol. 42. P. 105–296.

Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R. et al. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases // *Journal of Molecular Biology*. 1971. Vol. 56. P. 341–361.

Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M. The bacterial species definition in the genomic era // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006a. Vol. 361. P. 1929–1940.

Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006b. Vol. 7. P. 7286–7293.

Konstantinidis K.T., Rosselló-Móra R. Classifying the uncultivated microbial majority: A place for metagenomic data in the *Candidatus* proposal // *Systematic and Applied Microbiology*. 2015. Vol. 18. P. 223–230.

Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. Vol. 102. P. 2567–2572.

Koonin E.V. The logic of chance: the nature and origin of biological evolution. New Jersey: Pearson Education. Inc. 2012. 516 p.

in bacteriology // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002. Vol. 52. P. 1043–1047.

Stackebrandt E., Woese C.R. In: Molecular and cellular aspects of microbial evolution. Carlile M.Y., Collins J.F., Moseley B.E.B. Eds. Cambridge. Univ. Press. 1981. P. 1–31.

Stanier R.Y., van Niel C.B. The concept of a bacterium // *Archiv für Mikrobiologie*. 1962. Vol. 42, no. 1. P. 17–35.

Sunagawa S., Coelho L.P., Chaffron S. et al. Structure and function of the global ocean microbiome // *Science*. 2015. Vol. 348. P. 1261–1359.

The Prokaryotes. Third Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria: *Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* / Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. Eds. Springer. 2006. Vol. 3.

Thompson C.C., Chimetto L., Edwards R.A. et al. Microbial genomic taxonomy // *BMC Genomics*. 2013. Vol. 14. P. 913.

Tindall B.J., Kämpfer P., Euzéby J.P., Oren A. Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010a. Vol. 60. P. 249–266.

Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.-J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010b. Vol. 60. P. 249–266.

Trujillo M.E., Oren A. Avoiding ‘salami slicing’ in publications describing new prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018. Vol. 68. P. 977–978.

Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P. et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment // *Nature*. 2004. Vol. 428. P. 37–43.

Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Computer Applications in the Biosciences*. 1994. Vol. 10. P. 569–570.

Vandamme P.A.R. Taxonomy and classification of bacteria // *Manual of Clinical Microbiology* / Versalovic J., Carroll K., Funke G.,

related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. Vol. 53. P. 631–645.

Schleifer K.-H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // Bacteriological Reviews. 1972. Vol. 36. P. 407–477.

Schmidt V., Jarosch A., März P. et al. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2012. Vol. 31, no. 3. P. 311–317.

Schumann P. Peptidoglycan structure // Methods in Microbiology. 2011. Vol. 38. P. 101–129.

Schwartz R.M., Dayhoff M.O. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts // Science. 1978. Vol. 199, no. 4327. P. 395–403.

Searcy D.G., Whatley F.R. *Thermoplasma acidophilum*: Glucose degradative pathways and respiratory activities // Systematic and Applied Microbiology. 1984. Vol. 5. P. 30–40.

Söhngen N.L. Über bakterien, welche methan als kohlenstoffnahrung und energiequelle gebrauchen // Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1906. Abt. II. Vol. 15. P. 513–517.

Sokal R.R., Sneath P.H.A. Principles of Numerical Taxonomy. San Francisco, CA: W.H. Freeman and Co., 1963.

Spang A., Hatzenpichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing *Archaea* supports the phylum *Thaumarchaeota* // Trends in Microbiology. 2010. Vol. 18, no. 8. P. 331–340.

Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished golden standards // Microbiology Today. 2006. Vol. 33. P. 152–155.

Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M. et al. Report of the *ad hoc* committee for the reevaluation of the species definition

Koonin E.V., Makarova K.S., Arvind L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification // Annual Review of Microbiology. 2001. Vol. 55. P. 709–742.

Krieg N.R., Garrity G.M. On using the manual // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Boone D.R., Castenholz R.W. and Garrity G.M. Eds. Springer-Verlag, New York, NY. 2001. Vol. 2. P. 15–19.

Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. The Yeasts, A Taxonomic Study. 5thed. Amsterdam: Elsevier, 2011.

Kvist T., Ahring B.K., Lasken R.S., Westermann P. Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms // Applied Microbiology and Biotechnology. 2007. Vol. 74. P. 926–935.

Lapage S.P., Sneath P.H.A., Lessel E.F. et al. (Eds.). International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). Bacteriological Code. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992. URL: <http://www.bacterio.net/-code.html>.

Lechevalier M.P., De Bievre C., Lechevalier H. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition // Biochemical Systematics and Ecology. 1977. Vol. 6. P. 249–260.

Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes // International Journal of Systematic Bacteriology. 1970. Vol. 20, no. 4. P. 435–443.

Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity // Nature. 2006. Vol. 444. P. 1022–1023.

Lovelock J. The vanishing face of Gaia: a final warning: enjoy it while you can. Allen Lane. London. 2009. 192 p.

Lovelock J.A. Rough ride to the future. Allen Lane. London. 2014. 208 p.

Ludwig W., Klenk H.-P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Boone D.R., Castenholz R.W., and Garrity G.M. Eds. Springer-Verlag, New York, NY. 2001. Vol. 2. P. 49–65

Martin W.F., Garg S., Zimorski V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015. Vol. 370. P. 2014–2030.

Mayr E. Systematics and the origin of species – from the viewpoint of a zoologist. Harvard Univ. Press. Cambridge, 1942.

Moore W.E.C., Moore L.V.H. (Eds.). Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 Approved Lists of Bacterial Names (1 January 1980 to 1 January 1989). American Society for Microbiology. Washington, DC, 1989.

Mordarska H., Mordarski M., Goodfellow M. Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria // Journal of General Microbiology. 1972. Vol. 71, no. 1. P. 77–86.

Mullis K.B. The polymerase chain reaction. Nobel Lecture. December 8, 1993. LEX PRIZ NOBEL. The Nobel Prizes. Almqvist & Wiksell International. Stockholm. Sweden.

Naumova I.B., Shashkov A.S., Tul'skaya E.M. et al. Cell wall teichoic acids: structural diversity, species specificity in the genus *Nocardioopsis*, and chemotaxonomic perspective // FEMS Microbiology Reviews. 2001. Vol. 25. P. 269–284.

Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation // Nature. 2000. Vol. 405. P. 299–304.

Overmann J., Abt B., Sikorski J. Present and future of culturing bacteria // Annual Reviews of Microbiology. 2017. Vol. 71. P. 711–730.

Owen R. Paleontology // Encyclopedia Britannica. 8th edition. 1858. Vol. 17. P. 91–176.

Pace N.R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology // American Society for Microbiology News. 1996. Vol. 62. P. 463–470.

Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences // American Society for Microbiology News. 1985. Vol. 51. P. 4–12.

Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C. et al. A proposal for a standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny // BioRxiv. 2018. 256800.

Pennisi E. Modernizing the tree of life // Science. 2003. Vol. 300. P. 1692–1697.

Poyart C., Quesne G., Trieu-Cuot P. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (sodA) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002. Vol. 52. P. 1247–1255.

Raghunathan A., Ferguson H.R., Bornarth C.J. et al. Genomic DNA amplification from a single bacterium // Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71. P. 3342–3347.

Rainey F.A., Oren A. In: Taxonomy of *Prokaryotes*, 1st edition. Harwood C., Wipat A. Eds. // Methods on Microbiology. 2011. Vol. 39. P. 486.

Ramasamy D., Mishra A.K., Lagier J.-C. et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. Vol. 64. P. 384–391.

Roesch L.F.W., Fulthorpe R.R., Riva A. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity // International Society for Microbial Ecology Journal. 2007. Vol. 1. P. 283–290.

Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D. et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms // Applied and Environmental Microbiology. 2000. Vol. 6. P. 2541–2547.

Rosselló-Móra R., Amann R. The species concept for prokaryotes // FEMS Microbiology Reviews. 2001. Vol. 25. P. 39–67.

Rosselló-Móra R., Amann R. Past and future species definitions for *Bacteria* and *Archaea* // Systematic and Applied Microbiology. 2015. Vol. 38, no. 4. P. 209–216.

Santos S.R., Ochman H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins // Environmental Microbiology. 2004. Vol. 6. P. 754–759.

Schlegel L., Grimont F., Ageron E. et al. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and

остатков рибозы и фосфата. Кроме четырёх главных (мажорных) оснований в РНК присутствуют несколько редких (минорных) – псевдоурацил, диметиладенин, диметилгуанин и другие, которые не могут участвовать в комплементарных взаимодействиях. Молекулы РНК прокариотов и эукариотов являются одноцепочечными. Только в отдельных участках цепь РНК может образовывать петли (“шпильки”) с двуцепочечной структурой, которая стабилизируется за счёт взаимодействия оснований в парах аденин-урацил и гуанин-цитозин, а иногда гуанин-урацил (“неправильные” пары). Различают три основных вида РНК: информационные РНК (иРНК) или матричные РНК (мРНК); транспортные РНК (тРНК; рибосомные РНК (рРНК).

Сведберг (S) – единица скорости седиментации (осаждения) частиц при центрифугировании.

Симбиоз – совместное длительное существование различных организмов в условиях тесного и длительного контакта в рамках единого сообщества.

Спора – репродуктивная структура в бесполом размножении организмов.

Стенобионты – организмы, способные существовать лишь в относительно узких пределах изменений экологического фактора (температуры, солёности, влажности и т.д.).

Спора – репродуктивная структура в бесполом размножении организмов.

Структурный ген – ген, кодирующий структуру какого-либо белка.

Таксон – единица классификации организмов. Таксономическая категория в систематике, объединяющая группу организмов, обладающих определённой степенью однородности.

Теория – научное объяснение экспериментально установленных фактов.

16. Раскройте проблему анцестора в хронологической последовательности.

17. Назовите и охарактеризуйте основные методы генотипического анализа прокариотов.

18. Дайте определение терминам “таксономия”, “классификация”, “диагностика”, “номенклатура”.

19. Какими методами можно идентифицировать бактериальный изолят на уровне рода и вида?

20. Какова роль коллекций культур микроорганизмов в сохранении и изучении микробного разнообразия в период стремительного развития биотехнологии?

21. Как провести границу между видами прокариотов?

22. Какова роль горизонтального переноса генов в образовании видов прокариотов и их поддержании?

23. Назовите события в систематике микроорганизмов, создавшие предпосылки для формирования естественной систематики бактерий.

24. Что составляет предмет геносистематики бактерий?

25. Какова разрешающая способность методов генотипического и фенотипического анализа прокариотов?

26. Какое значение имела работа Р. Стениера и К. ван Ниля “Концепция бактериум” в развитии систематики прокариотов?

27. Назовите уникальные биохимические особенности архей.

28. В чем специфика генома архей?

29. Назовите известных отечественных и зарубежных исследователей, внесших существенный вклад в становление и развитие систематики прокариотных организмов.

СЛОВАРЬ НЕКОТОРЫХ ТЕРМИНОВ

Автотрофы – от греч. “autos” – сам и “trophe” – пища (питание). Организмы, синтезирующие органическое вещество из неорганического. Строят вещества своего тела из углекислоты и воды.

Адаптация – совокупность сложных физиологических и биохимических процессов, обеспечивающих приспособление организма к условиям внешней среды или отдельным факторам (рН, температура, солёность и др.).

Аденин – пуриновое основание, комплементарное тимину и урацилу, одно из четырёх азотистых оснований, входящих в состав РНК и ДНК.

Аденозин – нуклеозид, состоящий из аденина и *D*-рибозы, связанных через β -гликозидную связь.

Азотистые основания – азотсодержащие гетероциклические органические соединения, производные пиримидина и пурина, входящие в состав нуклеотидов и нуклеиновых кислот. К азотистым основаниям относят аденин, гуанин, цитозин, которые входят в состав как ДНК, так и РНК. Тимин входит в состав только ДНК, а урацил встречается в РНК. Аденин и гуанин являются производными пурина, а цитозин, урацил и тимин – производными пиримидина.

Азотфиксация – усвоение азота атмосферы (N_2) и перевод его в биологически доступную растворимую форму.

Аллель – альтернативная форма одного и того же генного локуса гомологичной хромосомы или один из пары генов, занимающих определённую позицию (локус) на гомологичной хромосоме и детерминирующий альтернативный признак.

Аминокислоты – органические соединения, содержащие аминогруппу ($-NH_2$) в α -положении и карбоксильную группу. Являются мономерными единицами белков.

протеома. Протеомный анализ заключается в исследовании структуры белков, их экспрессивных профилей, а также белок-белковых взаимодействий, включая и взаимодействия с другими небелковыми молекулами.

Психроактивные организмы – прокариоты, способные развиваться при 0 °С и даже минусовых температурах, но в отличие от облигатных психрофилов имеющие температурный оптимум в пределах 25–30 °С при максимальной температуре роста 35 °С. В основном водные организмы, заселяющие зону холодного и умеренного климата.

Психрофилы – холодолюбивые микроорганизмы, имеющие температурный оптимум в области низких температур – близких к 4 °С, а порой и ниже 0 °С. Психрофилы занимают до 7 % земной поверхности и подразделяются на облигатные и психроактивные организмы.

Размножение – увеличение числа клеток микроорганизмов в популяции.

Рекомбинация – включение участка хромосомы прокариотов, транспозонов, инсерционных последовательностей или других мобильных генетических элементов одного микроорганизма в хромосому другого в результате естественного биологического процесса или в ходе лабораторного манипулирования; обмен участками хромосом между разными прокариотными штаммами. Рекомбинация приводит к новым комбинациям генетического материала в пределах конкретной группы сцепления и обеспечивает изменчивость прокариотов.

РНК (рибонуклеиновая кислота) – линейные полинуклеотиды с определённой нуклеотидной последовательностью, в которых остатки нуклеотидов соединены между собой 5', 3'-фосфодиэфирными связями. Каждый из четырёх видов нуклеотидов включает азотистое соединение (аденин, гуанин, цитозин и урацил), пентозу (рибоза) и фосфорный остаток. Центральная ось полинуклеотидной цепи построена из чередующихся

(Beyerinck M.W., 1856–1931) первым понял, что изменчивость бактерий может быть вызвана генными мутациями.

Полиморфизм – от греч. “polymorphos” – многообразный, где “poly” – много и “morphē” – форма. Многообразие форм особей в пределах одного вида организмов, резко различающихся по своему облику (без наличия переходных форм).

Полипептид – цепь аминокислот, соединённых между собой пептидными связями.

Полифилия (полифилетический) – от греч. “poly” – много и “phyle” – род. Предполагаемое происхождение какой-то биологической группы от нескольких предковых групп, не связанных близким родством. Например, полифилетическая гипотеза происхождения жизни. Противоположный по значению термин – монофилия.

Поллютант – от лат. “*pollutum*” – пачкать, марать. Вещество, нарушающее чистоту продукта, среды обитания, загрязнитель, оказывающий нежелательное действие. В общем смысле поллютант – нежелательная примесь.

Популяция – совокупность способных к самовоспроизводству генетически родственных прокариотных клеток одного вида в пространстве и временном интервале, находящихся в относительной изоляции от других популяций и формирующих собственную экологическую нишу.

Прокариоты – организмы, не имеющие ограниченного цитоплазматическими мембранами ядра и органелл. Члены домена *Bacteria* и *Archaea*.

Протеом – от греч. “protos” – первый (протеины). Термин появился в 1994 г. как лингвистический эквивалент термина “геном” и описывает совокупность белков, экспрессируемых геномом на протяжении жизни клетки. Иными словами, это полный набор белков в отдельной клетке или в отдельном организме.

Протеомика – раздел геномики, призванный проводить широкомасштабный, а в перспективе глобальный анализ белков

Аминокислоты незаменимые – аминокислоты, которые не синтезируются живым организмом, но необходимы для его жизнедеятельности, например, валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан, лизин. Поступают в организм извне.

Анаэробное дыхание – реакция распада глюкозы без участия кислорода.

Анаэробы – от греч. частицы отрицания “an”, “a-” – воздух и “bios” – жизнь. Организмы, способные жить в бескислородной среде.

Антибиотик – вещество микробного, животного или растительного происхождения, способное подавлять рост микроорганизмов или вызывать их гибель.

Антиген – вещество, преимущественно белковой природы, вызывающее при введении в организм позвоночных образование антител и способное реагировать с антителами в различных реакциях.

Антигены видовые – антигены, характерные для отдельных штаммов одного вида бактерий, по которым их разделяют на серовары.

Антитело – защитный белок, который продуцируется в организме в ответ на введение антигена, способный реагировать с антигеном.

АТФ (аденозинтрифосфат) – фосфаген, выполняющий роль универсальной формы химической энергии в клетке. Составлен из аденина, *D*-рибозы и трёх фосфатных групп. Образуется в реакциях фосфорилирования АДФ на уровне субстрата и фосфорилирования мембранного.

Аэроб – организм, живущий в присутствии кислорода.

Аэробное дыхание – реакция распада глюкозы в присутствии кислорода.

Бесполовое размножение прокариотов – способ размножения прокариотов за счёт образования специальных репродуктивных структур (экзоспоры, гормогонии, бациллы и др.).

Бинарная номенклатура – система наименования организмов, использующая два названия (родовое и видовое).

Биосфера – живая оболочка Земли.

Биотоп – относительно однородный по абиотическим факторам среды участок суши или водоёма, занятый определённым микробным сообществом.

Биполярные монотрихи – прокариоты, имеющие по одному жгутику.

Биполярные политрихи – прокариоты, имеющие на каждом полюсе клетки более чем по одному жгутику.

Вид – категория, ограничивающая генотипически связанную группу популяций, имеющих высокую степень подобия по независимым признакам, проверенным при строго стандартизированных условиях. В качестве молекулярных критериев вида рассматривают секвенирование гена 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизацию, секвенирование белок-кодирующих генов.

Видообразование – образование новых видов организмов.

Галотолерантные организмы – прокариоты, приспособившиеся к резким колебаниям солёности в местах обитания и способные переносить концентрацию NaCl до 10 %.

Галофилы – организмы, развивающиеся при солёности, существенно превышающей солёность морской воды. К умеренным галофилам относятся организмы, имеющие верхний предел солёности до 15 %. Экстремальные галофилы развиваются при 30%-ной солёности воды. Солёность выше 10–15 % исключает развитие эукариотов, кроме зелёной водоросли *Dunaliella*.

Гаплоид – особь (клетка) с одинарным набором хромосом (n-число хромосом).

а также в митохондриях эукариотных клеток. Различают трансмиссивные (способные переходить из клетки в клетку) и нетрансмиссивные плазмиды. Наиболее характерная особенность бактериальных плазмид заключается в том, что они способны к бесконечно долгому поддержанию и воспроизведению в автономной, независимой от остального генетического материала форме. У бактерий различные плазмиды обеспечивают метаболические и вирулентные свойства, а также устойчивость к антибиотикам. Типичные и наиболее хорошо изученные плазмиды – это фактор F (и его варианты), факторы лекарственной резистентности (иначе, факторы R), а также факторы бактериоциногении, факторы, контролирующие синтез энтеротоксина (Ent) и определяющие гемолитическую активность (Hly). Термин “плазида” введён в 1952 г. американским генетиком Джошуа Ледербергом (Lederberg J., 1925–2008), получившим Нобелевскую премию в 1958 г. В 50–60-е гг. XX в. плазмиды называли эписомами.

Плейоморфизм (плеоморфизм) – от греч. “pleios” – более многочисленный, “morphē” – форма. Интересное только с исторической точки зрения устаревшее учение, объясняющее разнообразие типов бактерий, согласно которому бактерии обладают огромной биологической пластичностью и могут принимать любую из множества морфологических форм, а также приобретать любую физиологическую функцию. После того, как микробиологи научились получать чистые культуры из отдельных бактерий, представления о высокой пластичности бактерий исчезли, и плеоморфизм уступил место мономорфизму, постулировавшему неизменность каждого типа бактерий. Однако практические бактериологи постоянно сталкивались с внезапными изменениями свойств у бактерий, что породило представления о феномене диссоциации. Для примирения представлений о диссоциации с мономорфизмом в конце 20-х гг. была выдвинута теория о циклогенной, или онтогенной, форме развития в жизненном цикле бактерий. Голландский ботаник и микробиолог Мартин Виллем Бейеринк

Ортологи – от греч. “orthos” – прямой и “logos” – слово. Гомологичные гены в составе разных геномов или гены, одинаковые у разных организмов. Термин применяется также к белкам из разных организмов, имеющих гомологию в аминокислотных последовательностях.

Пангеном (супрагеном) – англ. “pan-genome, pangénome, supragenome”. Совокупность всех генов рассматриваемой группы организмов, как правило, монофилетической, для которой возможно генетическое разнообразие между близкородственными штаммами или экотипами.

Паразит – организм, живущий за счёт другого организма, использующий в качестве среды обитания и источника питания другие организмы.

Пептид – две или более аминокислоты, ковалентно связанные между собой пептидными связями (амидными связями между α -аминогруппой одной аминокислоты и α -карбоксильной группой другой аминокислоты).

Плазмиды – от греч. “plasma” – вылепленное и “eidos” – вид, подобие. Небольшие внехромосомные мобильные генетические элементы, присутствующие в цитоплазме прокариотной клетки и стабильно наследующиеся во внехромосомном состоянии. Представляют собой двуцепочечную ДНК либо в виде кольцевых, либо линейных молекул. Имеют размеры от 2 до 300 т.п.н. и более. В отличие от хромосом, в плазмидах отсутствуют гены информационные и гены домашнего хозяйства. Плазмиды могут циркулировать в пределах одной клетки и от одного хозяина к другому, преодолевая межвидовые и даже родовые барьеры. Плазмиды варьируют по величине и по численности в клетке от одной до многих десятков. Крупные плазмиды могут содержать сотни генов. Плазмиды относятся к экстрахромосомным носителям генетической информации. Эти дополнительные детерминанты наследственности обнаружены у бактерий, отдельных видов высших животных и растений, у дрожжей и водорослей,

Ген – сегмент ДНК, контролирующий синтез одного полипептида.

Генетическая информация – наследственная информация, закодированная в молекулах ДНК или РНК.

Геном – от англ. “genome”, от греч. “genos” – род и “nomos” – закон. Термин впервые был введён в 1920 г. немецким биологом, профессором ботаники Гансом Винклером (Winkler, 1877–1945) для описания гаплоидного набора хромосом с локализованными в нём генами. В настоящее время под геномом подразумевают совокупность наследственного материала, заключённого в клетке организма. Геномом можно назвать полный набор генов, всю совокупность нуклеиновых кислот организма. Геном бактерий включает несколько тысяч генов, расположенных линейно на макромолекуле ДНК, называемой хромосомой. Различают совокупный геном отдельной клетки, геном организма, геном вида. Геном образно сравнивают с книгой, только эта книга способна сама себя копировать и читать. Буквы нуклеотиды (символы А, Т, G и C) в геноме равнозначны, значение и смысл имеют только их комбинации. Отдельные геномы различаются последовательностями символов и длиной текстов. Прочтение этих текстов, их расшифровка (секвенирование) – задача, которой призвана заниматься геномика – новое высокотехнологичное направление в современной биологии.

Геномика – от греч. “genos” – род и “nomos” – закон. Раздел молекулярной генетики, посвящённый анализу полных нуклеотидных последовательностей в любых геномах, исследованию генов живых организмов. Сформировалась как особое направление в 1980–90-х гг. с возникновением первых проектов по секвенированию геномов некоторых видов живых организмов. Первым был полностью секвенирован геном бактериофага Ф-Х174 (5368 нуклеотидов) в 1977 г.

Генотип – совокупность генов организма, определяющих всю сумму наследуемой информации о его свойствах и признаках. Генотип определяет потенциальную способность организма к фенотипическому выражению признаков. Пространство генотипов (даже если рассматривать только относительно простые, небольшие геномы) огромно. Для прокариотов с геномом в 1 миллион пар оснований имеется $4^{1000000}$ возможных последовательностей – число, значительно превосходящее по величине, например, общее число протонов или электронов.

Гены “домашнего хозяйства” – от англ. “housekeeping genes”. Генетически стабильные гены, которые экспрессируются в клетках всех типов. Универсальность, функциональная эквивалентность и гомологичность этих генов делает их надёжными филогенетическими маркерами. К ним относятся гены, кодирующие белки и РНК, необходимые для выполнения центральных, жизненно важных функций, например, таких как транскрипция и трансляция, или энергетический метаболизм. Синонимы – “хаускипинг гены”, “обязательные гены”.

Гетеротрофы – организмы, нуждающиеся в энергии и углероде (не способные к синтезу органического вещества).

Гетеротрофия – субстратное питание, при котором в конструктивном метаболизме используются экзогенные органические соединения.

Гипотеза – предположение, пробное объяснение или утверждение, которое нуждается в экспериментальном доказательстве.

Гистоны – группа основных белков, связанных с ДНК эукариотов и характеризующаяся высоким уровнем аргинина и лизина. Участвуют в образовании нуклеосомы, являющейся основной структурной единицей хроматина эукариотов.

Гомология – наличие у двух таксонов общего свойства, ведущего происхождение от одного и того же свойства или эквивалентного свойства у ближнего общего предка; сходство структур

Нуклеиновые кислоты – от лат. “*nucleus*” – ядро. Представляют собой простые молекулы в виде нити из пентоз (дезоксирибоз для ДНК и рибоз для РНК), соединённых фосфодиэфирной связью. К остаткам пентоз присоединены азотистые основания – пурины – аденин (А), гуанин (Г) и пиримидины – цитозин (Ц), тимин (Т). Нить может оканчиваться либо фосфатом (5’ конец), либо пентозой (3’ конец).

Окислительно-восстановительная реакция – реакция ферментативного превращения АДФ в АТФ, сопровождаемая одномоментным переносом электронов от субстрата к молекулярному кислороду.

Оксигенная фототрофия – тип фототрофии, при котором донором электронов для нециклической электрон-транспортной цепи служит H_2O , а побочным продуктом является O_2 . Оксигенная фототрофия характерна для цианобактерий (фила *Cyanobacteria*).

Олигонуклеотид – короткий (6–10 нуклеотидов) сегмент одноцепочечной ДНК или РНК, получаемый либо химическим путём, либо расщеплением более длинных полинуклеотидов. Олигонуклеотиды используются в качестве зондов или праймеров.

Операционная таксономическая единица – обозначение объекта классификации в нумерической таксономии, как правило, штаммы, виды.

Оперон – единица координированной экспрессии генов. Оперон обычно контролирует синтез ферментов, характеризующих отдельные этапы одного метаболического пути. Экспрессия оперона, гены которого отвечают за биосинтез, репрессируются конечным продуктом биосинтетического пути, а экспрессия генов оперона, определяющего катаболический процесс, активируется субстратами данного процесса.

Миксотрофы – от англ. “mix” – смешивать и “trophe” – питание. Организмы со смешанным типом питания – автотрофным и гетеротрофным. Миксотрофы способны в условиях полной темноты выживать в течение длительного периода времени. При глобальных катастрофах на Земле с резким изменением климата и падением солнечной освещённости миксотрофы могут играть роль амортизаторов, смягчающих негативные последствия в биосфере.

Митоз – процесс деления эукариотных клеток. Обеспечивает идентичную редупликацию генетического материала, удвоение числа хромосом и передачу полного набора хромосом каждому из дочерних ядер.

Митохондрии – хемотрофные ксеносомы, ассимилирующие энергию в процессе аэробного и, редко, анаэробного дыхания. Неспособны к автотрофной ассимиляции углерода.

Монофилия – от греч. “mono” – один и “phyle” – род. Предполагаемое происхождение какой-то биологической группы от одной предковой группы. Например, монофилетическая гипотеза происхождения жизни.

Морфогенез прокариотной клетки – морфологические превращения клетки, неразрывно связанные с процессами роста.

Морфология – форма и структура организма.

Мутация – структурные изменения генов: выпадение или вставка одной или нескольких пар нуклеотидов, их замена, перестановка и т.д. Мутации в дочерних молекулах ДНК могут возникать, если фермент (или ферменты), регулирующий копирование (удвоение) материнской хромосомы, допускает “ошибку” в порядке чередования нуклеотидов. Мутации приводят к изменению функций тех или иных генов и целых геномов. Вероятность мутаций очень мала. У некоторых микроорганизмов мутация возникает в одной клетке из десяти тысяч, у других – в одной из миллиардов клеток.

по характеру их развития, возникающее в результате сходства в происхождении. Структуры могут иметь различные функции.

Гуанин – пуриновое основание, комплементарное цитозину, одно из четырёх азотистых оснований, входящих в состав РНК и ДНК.

Дальтон (Да) – единица измерения массы одного атома водорода ($1,661 \times 10^{-24}$ г). Единица названа в честь английского физика и химика Джона Дальтона (Dalton J., 1766–1844).

Дивергенция – расхождение признаков организмов в процессе эволюции, приводящая к образованию новых видов и надвидовых систематических групп и возникновению разрывов между ними.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – природный полимер (полинуклеотид), содержащийся в клетках живых организмов и обладающий функцией видоспецифического носителя генетической информации.

ДНК-полимераза – фермент, катализирующий синтез ДНК из дезоксирибонуклеотид-5’-трифосфатов.

ДНК-полимераза Taq – термостабильная ДНК-полимераза (сохраняет активность при температуре 95 °С) экстремальной термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Применяется в ПЦР.

Дрейф генов – явление ненаправленного изменения частот аллельных вариантов генов в популяции в результате случайных скрещиваний.

Дрожжи – неподвижные одноклеточные грибы (*Fungi*), типичным способом бесполого размножения которых является почкование и редко бинарное деление. Клетки после почкования могут оставаться соединёнными, образуя псевдомицелий. Дрожжи не составляют единого таксона, встречаются среди аскомицетов, базидиомицетов и анаморфных (несовершенных) грибов. Дрожжи являются хемоорганогетеротрофами с окислительным или бродильным типами метаболизма, имеют разную форму

клетки: овальную, стреловидную, цилиндрическую, треугольную, серповидную и т.д.

Дыхание – расщепление молекул питательного вещества путём их окисления, сопровождаемого освобождением энергии.

Естественный отбор – сохранение наиболее благоприятных индивидуальных различий, обеспечивающих выживание организмов и их приспособление к среде.

Иерархическая структура – структура, в которой каждая категория в восходящих рядах объединяет постепенно возрастающее число единиц на основе постепенно уменьшающегося числа общих признаков.

Изоляты – культуры микроорганизмов, выделенные из какого-либо конкретного источника (материала).

Клон – вегетативное потомство одной особи, возникшее бесполом путём.

Колония бактериальная – изолированное скопление бактериальных клеток одного или нескольких видов, сформированное на поверхности или внутри плотных или полужидких питательных сред в результате размножения одной или нескольких клеток.

Конвергенция – схождение признаков в процессе эволюции неблизкородственных групп организмов, приобретение ими сходного строения в результате существования в сходных условиях и одинаково направленного естественного отбора.

Конъюгация – однонаправленный перенос между прокариотными клетками генетического материала при непосредственном контакте клетки-донора и клетки-реципиента. Осуществляется при участии плазмид и конъюгативных транспозонов.

Кофактор – низкомолекулярное органическое или неорганическое соединение, необходимое для проявления активности фермента.

Кофермент – специфические низкомолекулярные органические соединения небелковой природы, входящие в состав активного центра ряда ферментов.

Латеральный – от лат. “*lateralis, latus, lateris*”, от англ. “lateral” – боковой.

Литосфера – подразделение биосферы (поверхность Земли).

Макромолекула – молекула, молекулярная масса которой составляет от нескольких тысяч до сотен миллионов дальтон (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и т.д.).

Макроэволюция – крупномасштабные генетические изменения организмов во времени, ведущие к новым уровням сложности и появлению организмов, принадлежащих к более крупным таксономическим единицам по сравнению с видом.

Мейоз – редукционное деление ядер клеток репродуктивных органов, сопровождающееся уменьшением числа хромосом в ядре.

Метаболизм – совокупность клеточных процессов превращения энергии и субстратов, протекающих в организме и обеспечивающих его существование.

Метаболиты – конечные или промежуточные продукты (интермедиаты), образующиеся в клетке в процессе метаболизма.

Микробные маты – от англ. “mat” – ковёр. Особые биоценозы, состоящие из прокариотов и располагающиеся на дне водоемов или в их прибрежной зоне.

Микроорганизмы – от греч. “mikros” – малый и “arganon” – живое существо. Термин охватывает не только прокариотные одноклеточные организмы, но и эукариотные (дрожжи, грибы, простейшие и микроводоросли).

Микроэволюция – мелкие генетические изменения, ведущие к видообразованию.

Учебное издание

Ившина Ирина Борисовна
Криворучко Анастасия Владимировна
Куюкина Мария Станиславовна

Биоразнообразие и систематика микроорганизмов

Учебное пособие

Редактор *Л. Г. Подорова*
Корректор *Л. И. Иванова*
Компьютерная вёрстка *К. Н. Смарцалова*

Подписано в печать 26.12.2019. Формат 60×84/16.
Усл. печ. л. 17,67. Тираж 100 экз. Заказ 749/2020

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета.
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии издательства Пермского национального
исследовательского политехнического университета
614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, к. 113.
Тел.: (342) 219-80-33

Термин – от лат. “*terminus*”. Слово или сочетание слов, точно обозначающее понятие, используемое в научной литературе.

Термофилы – прокариоты, растущие при температуре выше 50 °С. Собственно термофилы имеют максимум при температуре ниже 70 °С и минимум – выше 40 °С. Экстремальные термофилы имеют максимум при температуре около 90 °С и не растут при 60–70 °С. Гипертермофилы имеют максимум при температуре выше 100 °С и являются обитателями гидротерм и нагретой подземной гидросферы. Термофильные эукариоты отсутствуют. Для них температура 60 °С оказывается предельной. Многоклеточные организмы обычно отсутствуют при температуре выше 50 °С.

Трансдукция – от лат. “*transductio*” – перемещение, где “*trans*” – сквозь, через и “*ductus*” – проводник. Перенос веществ, например, макромолекул через биологическую мембрану. Термин также используется для обозначения процесса передачи сигнала от лиганда через трансмембранный и цитоплазматический домены рецептора в цитоплазму клетки. В специальном значении трансдукция – перенос при участии бактериофага генетического материала из одной бактериальной клетки (донор) в другую клетку (реципиент), приводящий к трансформации бактерии. Это так называемый асексуальный процесс переноса генетического материала. Фаг, осуществляющий перенос, носит название трансдуцирующего и играет роль вектора. Его геном содержит как собственные гены, так и гены клетки-хозяина. В основе трансдукции лежит процесс рекомбинации генетического материала между вирусным и клеточным геномами, в результате которого происходит включение определённого клеточного гена(ов) в геном вируса. В более узком смысле трансдукция – третья система рекомбинации у бактерий (наряду с трансформацией и конъюгацией). Различают несколько типов трансдукции: (1) генерализованная (неспецифическая) трансдукция, при которой происходит перенос практически любого гена или нескольких несцепленных

между собой генов; (2) специализированная трансдукция, когда фаговые частицы переносят только определённые локусы (гены), примыкающие к месту включения фага. Например, фаг трансдуцирует только локусы *gal* или *bio* на *E. coli*; (3) abortивная трансдукция, при которой наблюдается автономное поведение фрагмента донорского генома. При этом трансдуцируемый локус не включается в геном клетки-реципиента, а существует в виде так называемого “экстра-гена”. Процесс трансдукции открыт в 1952 г. Н. Зиндером (Zinder N.) и Дж. Ледербергом (Lederberg J.) в экспериментах на ауксотрофных штаммах *Salmonella typhimurium*, не сбраживающих арабинозу и мальтозу, которые приобретали способность усваивать эти углеводы после обработки бесклеточными экстрактами (содержащими фаг P22), полученными из сальмонелл, сбраживающих эти сахара.

Транскрипция – от лат. “*transcriptio*” – буквально, переписывание, где “*trans*” – сквозь, через и “*scribo*” – писать. Процесс синтеза иРНК с использованием ДНК в качестве матрицы. При транскрипции генетическая информация, содержащаяся в одной цепи ДНК, используется для синтеза комплементарной нуклеотидной последовательности в цепи иРНК. Транскрипция катализируется ферментом РНК-полимеразой, которая движется по матричной цепи ДНК в направлении 3’ к 5’ концу. Транскрипция состоит из стадий – инициации, элонгации и терминации. У бактерий транскрипция подавляется антибиотиками из группы рифамицинов, а антибиотики из группы стрептолидигинов подавляют элонгацию транскрипции.

Трансляция – синтез полипептидной цепи из аминокислот на рибосоме в соответствии с генетической информацией, записанной в виде последовательности нуклеотидов в молекуле иРНК. Осуществляется при участии тРНК.

Транспозиция – перемещение гена или группы генов из одного места генома в другое; перемещение мобильных гене-

Thaumarchaeota, 175, 257, 258, 266
Thermoactinomyces, 228
Thermoanaerobacter ethanolicus, 234
Thermococcus, 175
Thermomonospora, 228
Thermoplasma, 91, 189
Thermoplasma acidophilum, 182, 188, 230, 246, 266
Thermotoga maritima, 109
Thermotogales, 234
Thermus aquaticus, 16, 17, 258, 279

Thiobacillus, 246
Thiodendron lateens, 19
Thiomicrospira arctica, 9
Thorarchaeota, 175
Treponema pallidum, 109
Treponema spirochetes, 160
Tsukamurella, 228
Verrucomicrobia, 218
Vibrio, 62, 63, 74, 99, 259
Vibrio cholerae, 39, 259
Vibrio parahaemolyticus, 259
Williamsia, 104

Rhodococcus luteus, 39, 46
Rhodococcus rhodochrous, 47
Rhodococcus ruber, 48, 51, 238
Rhodoluna ladicola, 261
Rickettsia, 99, 119, 149
Rickettsia prowazekii, 109
Rothia, 229, 239
Rubrobacter, 234
Saccharomonospora, 228, 239
Saccharomyces, 12, 152
Saccharomyces cerevisiae, 181
Saccharopolyspora, 228, 239
Saccharothrix, 228, 239
Saccliaromonospora, 208
Salinispora, 98
Salmonella, 40, 115, 132
Salmonella typhimurium, 290
Sarcina, 172
Sarcina lutea, 39
Sarcina ventriculi, 62, 172
Schizomyceae, 62
Schizophyta, 136
Serratia marcescens, 213
Shigella, 257
Sinorhizobium, 35
Solanum tuberosum L., 255
Sphaerobacteria, 63
Sphingobacterium, 240
Spirillaceae, 66
Spirillospora, 228
Spirillum, 62, 63, 211
Spirillum volutans, 62
Spirobacteria, 63
Spirochaeta, 62, 63
Spirochaeta plicalitis, 62
Spirochaetes, 99, 218

Sporichthya, 228
Staphylococcus, 98
Staphylococcus succinus, 56
Stella, 213
Stenotrophomonas maltophilia, 126
Stomatococcus, 229, 239
Streptoalloteichus, 228
Streptococcus, 98
Streptococcus bovis, 95, 265
Streptococcus equinus, 265
Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus*, 266
Streptococcus gallolyticus subsp. *macedonicus*, 266
Streptococcus gallolyticus subsp. *pasteurianus*, 266
Streptococcus infantarius subsp. *coli*, 95, 265
Streptococcus lutetiensis, 95, 265
Streptococcus pasteurianus, 95, 265
Streptomyces, 98, 104, 126, 207, 225, 228, 239
Streptosporangium, 228, 239
Streptovercillium, 228, 239
Sulfolobales, 230
Sulfolobus, 40, 91, 189
Sulfolobus acidocaldarius, 246
Sulfolobus solfataricus, 8
Synechocystis sp., 109
Tenericutes, 217, 218
Tessaracoccus, 104
Thallobacteria, 217
Thallophyta, 63

тических элементов (транспозоны и др.) из одного локуса в другой внутри репликона или между репликонами (плазмида, хромосома прокариотов).

Транспозоны прокариотов – от лат. “*transpositio*” – перестановка. Повторяющиеся подвижные элементы генома, которые долго относили к так называемому “генетическому хламу” и считали молекулярными паразитами. Мобильные фрагменты ДНК, способные к самостоятельной транспозиции как единая структура. Мобильные элементы (Tn) бактерий двух типов: сложные (“composite”) и несложные. Первые имеют центральный район, содержащий гены, в том числе гены устойчивости к антибиотикам (например, к тетрациклину), и на концах IS-элементы одного типа – “правый” и “левый”, которые кодируют транспозазу и фланкированы собственными инвертированными повторами (IR, аббревиатура от англ. “Inverted Repeats”). Несложные транспозоны не терминируются IS-элементами, а имеют инвертированные правый и левый повторы, необходимые для транспозиции.

Транспорт электронов – переход электронов от субстрата к кислороду в дыхательной цепи.

Трансформация – от лат. “*transformatio*” – преобразование, превращение, “*transformo*” – преобразовывать (буквально, возникновение другой формы). В общем смысле – передача ДНК через внеклеточную среду или, другими словами, изменение свойств одних бактериальных клеток под влиянием ДНК, выделенной из других бактериальных клеток. В её основе лежит включение фрагментов ДНК клеток-доноров в “хромосому” бактерий-реципиентов (для трансформации донорская ДНК должна быть двуцепочечной, а в клетках реципиента она становится одноцепочечной и рекомбинирует с геномной ДНК). Трансформация – одна из систем рекомбинации у бактерий. Наряду с трансдукцией, плазмидами и эписомами трансформация – это односторонний перенос генетического материала (обычно небольшой части генома). Явление трансформации открыто в 1928 г. английским микробиологом Фредериком Гриффитом (Griffith F.,

1879–1941) при исследовании *Diplococcus pneumoniae* двух типов – вирулентного капсульного (S-форма, от англ. “smooth” – гладкий) и авирулентного бескапсульного (R-форма, от англ. “rugose” (“rough”) – шероховатый, грубый). Гриффит наблюдал, что при смешивании перед заражением мышей убитой капсульной формы с живой бескапсульной у погибших животных выявляются активные капсульные бактерии. Позже, в 1944 г., сотрудники Рокфеллеровского института в Нью-Йорке Освальд Эвери (Avery O.T.), Колин МакЛеод (McLeod C.M.) и Маклин МакКарти (McCarty M.) дали объяснение его результатам. Они установили, что одной из систем рекомбинации у бактерий является трансформация. Одновременно их исследования показали, что у бактерий генетическим материалом служит ДНК. В 1952 г. американские микробиологи Альфред Херши (Hershey A.) и Марта Чейз (Chase M.) в экспериментах по заражению бактерий вирусами (T2 фагами), мечеными радиоактивными серой и фосфором (у одного штамма вируса белки капсида были мечены серой, а у другого – фосфором ДНК), окончательно убедили научное сообщество, что нуклеиновые кислоты являются генетическими макромолекулами.

Штамм – микробная культура, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим признакам.

Факультативные анаэробы – прокариоты, которые при контакте с кислородом не погибают, а выбирают альтернативный путь развития, переключаясь с одного способа получения энергии на другой, с анаэробного дыхания на аэробное дыхание (и наоборот).

Факультативный – от лат. “*facultatis*” – возможность. Термин, определяющий состояние или условия, необязательные для организма. Например, факультативные анаэробы способны расти не только в бескислородных условиях, но и в присутствии кислорода.

Mollicutes, 217, 218
Monas, 62
Monera, 136, 166, 167
Mycobacterium, 66, 74, 98 104, 214, 228, 236, 239, 243, 246
Mycobacterium luteum, 39
Mycobacterium tuberculosis, 51, 109
Mycoplasma, 35, 229
Mycoplasma, 98
Mycoplasma pneumoniae, 109
Nanoarchaeota, 175
Neisseria, 99
Nitrobacter, 246
Nitrospirae, 105
Nocardia, 98, 104, 214, 228, 236, 237, 239, 246
Nocardia asteroides, 245
Nocardia farcinica, 238
Nocardioidea, 228, 239
Nocardiosis, 228, 239, 264
Nocardiosis dassonvillei, 225
Ochrobactrum, 35, 95, 96
Ochrobactrum lupine, 255
Oerskovia, 229, 239
Ornithinococcus, 104
Oxyphotobacteria, 217
Palaeolyngbya, 55
Paracoccus denitrificans, 105
Paramecium, 161
Paramecium aurelia, 155
Pelomyxa, 160
Picrophilus torridus, 183
Pilimelia, 228, 239
Pimelobacter, 228, 239
Planctomycetes, 218

Planobispora, 228, 239
Planomonospora, 228, 239
Plantae, 134, 138, 164, 166
Plantibacter, 240
Primigenum, 135, 164
Procaryotae, 139
Prokaryotae, 137, 166
Prokaryotes, 28, 265, 267, 271
Promicromonospora, 229, 239
Proteobacteria, 46, 52, 99, 105, 178, 218
Proteus, 230
Protista, 135, 136, 138, 164, 165, 166, 167
Protoctista, 135, 164, 165
Protozoa, 164, 165, 258
Pseudomonas, 66, 230
Pseudomonas migula, 66
Pseudomonas putida, 46
Pseudomonas sp., 41
Pseudomonas stutzeri, 70
Pseudomonas subtilis, 109
Pseudonocardia, 228, 239
Pyrococcus, 114
Pyrococcus horikoshii, 109
Pyrococcus occultus, 40
Pyrococcus wosei, 40
Ralstonia solanacearum, 126
Rathayibacter, 240
Renibacterium, 229, 239
Rhizobium, 35
Rhodobacter, 106
Rhodobacter capsulatus, 105
Rhodococcus, 9, 10, 47, 98, 104, 208, 214, 228, 236, 237, 239, 246, 271

Eukaryotae, 137, 166
Eukaryotes, 22
Euryarchaeota, 105, 175, 177
Fibrobacteres, 218
Firmibacteria, 217
Firmicutes, 46, 98, 217, 218, 267, 271
Flavobacterium, 210
Flexibacter, 240
Frankia, 228, 239
Frankia spp., 98
Fungi, 138, 166, 279
Fusobacteria, 218
Gaiella occulta, 234
Gammaproteobacteria, 99, 218
Gelidium corneum, 64
Gemmatimonadetes, 218
Geodermatophilus, 228, 239
Gillevinia straata, 57
Gloeotheca, 204
Glycomyces, 228, 239
Gordonia, 228
Gracilicutes, 217
Halobacteria, 105
Halobacterium, 91, 182
Halobacterium halobium, 185
Halomonas titanicae, 9
Helicobacter, 99
Helicobacter pylori, 109, 232
Holdemania, 222
Ignicoccus, 175
Intrasporangium, 228, 239
Kibdelosporangium, 228, 239
Kineosporia, 228, 239
Kitasatosporia, 228
Klebsiella, 40

Korarchaeota, 175
Kribbella, 126
Labrys, 213
Lactobacillus, 98, 126
Lactobacterium, 40
Legionella, 52, 99
Legionella pneumophilla, 52
Legionella pneumophilla subsp. *pneumophilla*, 52
Legionellaceae, 52
Legionellales, 52
Lentishaerae, 218
Lokiarchaeota, 175
Mendosicutes, 217
Mesorhizobium, 35
Methanobacterium, 40
Methanobacterium thermoautotrophicum, 182
Methanococci, 105
Methanococcus jannaschii, 109
Methanopyrus kandleri, 183
Methanosarcina, 163, 172
Methylococcus, 40
Microbacteria, 63
Microbacteriaceae, 126, 164, 222, 234
Microbacterium, 214, 229, 239
Microbispora, 208, 228, 239
Micrococcus, 63, 229, 239, 246
Micrococcus luteus, 209
Micrococcus sp., 238
Micromonospora, 98, 126, 207, 228, 239
Micropolyspora, 208
Microtetraspora, 104, 208
Mixotricha paradoxa, 160

Фенотип – от греч. “phaino” – являю и “typos” – отпечаток, форма, образец. Категория или группа, в которую могут быть объединены особи (индивидуумы) на основании одного или большего числа признаков. Совокупность всех признаков и свойств организма, сформировавшихся в процессе онтогенеза как результат взаимодействия генотипа и внешней среды. Другими словами, фенотип – это внешнее проявление генотипа, зависящее от имеющихся генов и от взаимодействия их аллелей, которое, в свою очередь, зависит от внутренней и внешней среды, влияющей на активность генов и обуславливающей регуляторные процессы и их модификации. Известно, что при разных генотипах часто наблюдается одинаковое проявление фенотипов, т.е. фенотип может включать в себя несколько генотипов.

Филогенез – путь эволюционного развития какой-либо группы организмов.

Фингерпринтинг (ДНК-фингерпринтинг) – от англ. “finger” – палец (руки) и “printing” – печатание. Буквально, генетический “отпечаток пальца”. Метод, позволяющий выявлять различия в геномной ДНК. Основывается на выявлении распределения длин фрагментов – продуктов расщепления ДНК рестриктазой или длин продуктов ПЦР. Точные размеры коротких повторяющихся последовательностей (микросателлитов), присутствующих в различных геномах, являются их индивидуальными характеристиками. Наличие у двух индивидуумов идентичных паттернов последовательностей говорит об их генетическом родстве (и наоборот).

Фотосинтез – синтез углеводов под действием солнечного света.

Фототрофы (фотосинтетики) – организмы, использующие энергию света.

Хемосинтез – процесс, в котором энергия для синтеза органических питательных веществ образуется в результате окисления простых неорганических соединений. Тип метаболизма,

основанный на ассимиляции организмами CO₂ и других неорганических соединений углерода (углеродная автотрофия) за счёт энергии, получаемой при ферментативном окислении неорганических субстратов (хемолитотрофия).

Хемотаксис – способность клеток к определению направления их движения вдоль градиента химических веществ (аттрактантов и репеллентов).

Хемотрофы – организмы, использующие энергию химических реакций.

Хлоропласт – клеточная органелла, содержащая хлорофилл.

Хромосома – структурное образование ядра клеток, содержащее гены.

Хлорофиллы – фотосинтетические пигменты растений и цианобактерий, имеющие в основе порфириновое ядро, состоящее из четырёх пиррольных колец, замкнутых в макроцикл с помощью метинильных мостиков (-CH=). Четыре атома азота пиррольных колец связаны с ионом Mg²⁺. Идентифицировано несколько видов хлорофиллов (a, a₂, b, b₂, c₁, c₂, d), среди которых выделяют главные (a, b) – входят в состав реакционных центров, и вспомогательные (a₂, b₂, c₁, c₂, d) – включены в светособирающие комплексы. Главные хлорофиллы (у цианобактерий – хлорофилл a, у цианобактерий-прохлорофитов – хлорофиллы a и b) в возбуждённом состоянии передают электроны в электрон-транспортную цепь. Хлорофиллы в составе фотосинтетического аппарата формируют с полипептидами пигмент-белковые комплексы.

Цитоплазма – содержимое клетки, отграниченное от внешней среды цитоплазматической мембраной. Состоит на 70–80 % из воды и содержит структурные элементы (органеллы, включения, запасные вещества, эндоспоры); растворимые РНК; ферменты; продукты и субстраты различных реакций и т.д.

Цитохромы – окислительно-восстановительные ферменты белковой природы, имеющие в качестве простетической группы

Bacteriaceae, 66
Bacterium, 62, 63
Bacteroides, 99
Bacteroidetes, 46, 99, 178, 218
Bdellovibrio, 211, 217
Beggiatoa, 8, 69
Betaproteobacteria, 99, 230
Beutenbergia, 104
Bifidobacterium, 98
Bifidobacterium spp., 98
Bordetella, 99, 243
Brevibacterium, 214, 228, 239
Brevibacterium spp., 214
Brucella, 35, 99, 119
Burkholderia, 99
Calothrix, 57
Campylobacter, 85
Candidatus, 41, 99, 100, 175, 262
Capnocytophaga, 85
Caseobacter, 228
Catellatospora, 228, 239
Caulobacter, 213
Cellulomonas, 229, 239
Chlamydia trachomatis, 109
Chlamydiae, 99, 218
Chlamydomonas, 152
Chlorella, 161
Chlorobiaceae, 230
Chlorobium, 91
Chloroflexi, 178
Chloroflexus, 203
Chromista, 167, 258
Citrobacter freundii, 41
Clavibacter, 126, 229, 239
Clostridium, 69, 98
Clostridium pasteurianum, 41

Coccaceae, 66
Corynebacterium, 66, 91, 98, 214, 228, 236, 237, 239, 246
Corynebacterium glutamicum, 214, 238
Corynebacterium spp., 214
Crenarchaeota, 105, 174, 257
Curtobacterium, 229, 239
Cyanobacteria, 178, 283
Cytophaga, 240
Dactylosporangium, 228, 239
Deltaproteobacteria, 99
Dermatophilus, 228, 239
Desmobacteria, 63
Desulfurococcus, 40
Dictyoglomi, 218
Dietzia, 228
Diplococcus pneumoniae, 292
Dunaliella, 276
Ectothiorhodospira halochloris, 40
Ehrlichia, 99
Ensifer, 35
Enterobacteriaceae, 99
Enterococcus, 85, 98
Eosynococcus, 204
Epsilonproteobacteria, 99
Erysipelothrix, 222
Escherichia coli, 40, 88, 91, 109, 115, 132, 181, 209, 290
Eubacteria, 22, 36, 91, 218
Eucarya, 22, 29, 53, 56, 91, 97, 106, 174, 258, 269, 297
Eucaryotae, 36, 139
Euglena, 12, 152
Eukarya, 26, 27, 163, 167

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ
НАЗВАНИЙ ТАКСОНОВ

“ <i>Candidatus</i> Caldiarchaeum subterraneum”, 175	<i>Anoxyphotobacteria</i> , 217
“ <i>Candidatus</i> Calditenuis aerorheumensis”, 175	<i>Aphanocapsa</i> , 91
“ <i>Candidatus</i> Scalindua brodae”, 41	<i>Aquaspirillum magnetotacticum</i> , 257
“ <i>Candidatus</i> Scalindua sorokinii”, 41	<i>Aquifex aeolicus</i> , 109
<i>Acetobacter xylinum</i> , 62	<i>Arachnia</i> , 228, 239
<i>Achromatium oxaliferum</i> , 13	<i>Arcanobacterium</i> , 229
<i>Acidianus infernus</i> , 40	<i>Archaea</i> , 8, 22, 26, 27, 29, 53, 56, 91, 97, 105, 127, 161, 163, 168, 174, 177, 183, 218, 230, 257, 258, 262, 265, 267, 269, 270, 271, 286
<i>Acidobacteria</i> , 218	<i>Archaeobacteria</i> , 22, 36, 174, 218, 268, 269
<i>Actinobacteria</i> , 9, 46, 82, 98, 119, 218, 261, 268	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> , 109, 175
<i>Actinomyces</i> , 66, 228, 239, 260	<i>Archezoa</i> , 156, 167
<i>Actinomyces bovis</i> , 229	<i>Arthrobacter</i> , 214, 229, 239
<i>Actinomycetales</i> , 99	<i>Arthrobacter globiformis</i> , 245
<i>Actinomycetes</i> , 267, 271	<i>Aureobacterium</i> , 229, 239
<i>Actinoplanes</i> , 228, 239	<i>Azospirillum</i> , 111, 112, 268
<i>Actinopolyspora</i> , 228, 239	<i>Azotobacter</i> , 246
<i>Actinosynnema</i> , 228, 239	<i>Bacillus</i> , 63, 70, 74, 91, 98, 213, 246
<i>Aeromonas</i> , 99	<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>mycoides</i> , 42
<i>Aeropyrum pernix</i> , 109	<i>Bacillus</i> sp., 56
<i>Agrobacterium</i> , 35	<i>Bacillus subtilis</i> , 40, 109, 209
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , 126	<i>Bacteria</i> , 22, 26, 29, 52, 53, 56, 91, 97, 98, 99, 105, 106, 127, 163, 167, 168, 174, 183, 218, 230, 265, 267, 269, 270, 271, 286
<i>Agromyces</i> , 229, 239	
<i>Aigarchaeota</i> , 175	
<i>Alicyclobacillus</i> , 234	
<i>Alphaproteobacteria</i> , 52, 99, 230	
<i>Ampullariella</i> , 228, 239	
<i>Amycolata</i> , 228, 239	
<i>Amycolatopsis</i> , 228, 239	
<i>Animalia</i> , 59, 134, 138, 164, 166	

железопорфиноиды или гемы. В цитохромах геминовое железо лигандируется атомами азота порфиринового кольца. При работе цитохромов за счёт изменения валентности атома железа в геме в реакции $Fe^{3+} + e \leftrightarrow Fe^{2+}$ осуществляется перенос электронов. Последние поступают к цитохромам от пула хинонов. Цитохромы обозначают по типу гема – а, аз, b, с, d и ряд других. В зависимости от степени гидрофобности и характера распределения гидрофобных остатков по длине полипептидной цепи выделяют цитохромы растворимые и мембранные.

Эволюция – от лат. “*evolutio*” – развёртывание. Естественный процесс развития организмов и преобразования их во времени.

Экзоны – от англ. “*expression*” – выражение, выразительность (экспрессия). Кодирующие последовательности ДНК в гене (фрагменты гена, несущие информацию), разделённые некодирующими участками (интронами). Первичный транскрипт содержит полную копию гена, включающую экзоны и интроны. В результате созревания (процессинга и сплайсинга) интроны удаляются, а экзоны ковалентно сшиваются, что приводит к образованию укороченной информационной РНК (иРНК). Считается, что экзоны соответствуют отдельным доменам (структурно автономные области в молекулах белков) в кодируемых белках и являются первичными генетическими единицами, рекомбинация которых и лежит в основе возникновения новых белков. Разные гены сильно различаются по числу экзонов.

Экологическая ниша (экониша) – от греч. “*oikos*” – дом, “*logos*” – учение и лат. “*nidus*” – гнездо. Понятие включает совокупность условий среды, в границах которых возможно существование вида. Другими словами, физическое пространство, занимаемое данным организмом в экосистеме.

Экологическая система (экосистема) – от греч. “*oikos*” – дом, жилище и система. Функционирующая экологическая еди-

нища биосферы в виде совокупности живых организмов и их физического и химического окружения. Полная экосистема состоит из первичных продуцентов и консументов, потребляющих произведённую продуцентами органику, а также деструкторов (минерализующих организмов). Абиотические компоненты экосистемы обычно называют окружающей средой, хотя в это понятие могут входить и биотические компоненты.

Экотипы – совокупность особей одного вида микроорганизмов, адаптированных к условиям окружающей среды и обладающих наследуемыми признаками, экологически обусловленными.

Экспрессия гена – от лат. “*expressi*” – выжимать, выражать, изображать. Термин, обозначает процесс перевода последовательности нуклеотидов ДНК в последовательность аминокислотных остатков в полипептиде (белке). Экспрессию обеспечивают три фундаментальных молекулярно-биологических процесса: (1) транскрипция гена в пре-мРНК (первичный транскрипт); (2) процессинг и сплайсинг пре-мРНК в матричную РНК (мРНК); (3) трансляция (перевод) мРНК на рибосомах в полипептид. Экспрессия генов чаще всего регулируется на транскрипционном уровне и многие гены экспрессируются только в определённых типах клеток. В каких клетках и на каком этапе онтогенеза экспрессируется тот или иной ген, зависит от так называемых “генетических переключателей” – регуляторов, определяющих при участии транскрипционных факторов “нужное место и нужное время”. Следует отметить, что экспрессия многих генов, а следовательно, и биохимическое состояние организма, зависит также от событий, происходящих в окружающем мире.

Экстремофилы – от лат. “*exremus*” – крайний и “*phileo*” – любить. Одноклеточные организмы, способные существовать в крайне неблагоприятных для жизни условиях (экстремально высокие или низкие значения температуры, давления, кислотности, кислорода и т.п.). К экстремофилам относятся, например,

микроорганизмы, обитающие в толще ледников. Обладают особенной структурой ДНК, переносящей полное высушивание и замораживание без разрушения.

Электрофорез – метод разделения заряженных молекул (ДНК, РНК или белки), основанный на разной скорости их перемещения в электрическом поле.

Эндосимбионт – микроорганизм, живущий внутри другого организма (хозяина) и приносящий ему пользу. Другими словами, организм, который находится с хозяином во взаимовыгодных взаимоотношениях.

Эписомы – от греч. “*epi*” – на, над и “*soma*” – тело. Плазмиды, способные интегрироваться в бактериальную ДНК. Другими словами, внехромосомные (автономные) генетические факторы.

Эукариоты – организмы, в клетках которых присутствуют оформленное ядро и уникальный мембранный аппарат, состоящий из двух обособленных частей – цитоплазматической мембраны и эндомембран, представляющих собой систему топологически замкнутых микрокомпартментов (ядерная оболочка, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, микросомы и т.д.). Эндомембраны взаимодействуют между собой и с цитоплазматической мембраной при помощи системы везикулярного транспорта. Эукариоты составляют филогенетический домен *Eucarya*, к которому относятся растения, животные и человек.