

EDUCATION AND SCIENCE IN THE PERIOD OF GLOBAL CRISES AND CONFLICTS IN THE 21st CENTURY



COLLECTIVE MONOGRAPH

**EDUCATION AND SCIENCE
IN THE PERIOD OF GLOBAL
CRISES AND CONFLICTS
IN THE 21st CENTURY**

Compiled by
VIKTOR SHPAK

Chairman of the Editorial Board
STANISLAV TABACHNIKOV

GS PUBLISHING SERVICES
SHERMAN OAKS
2023

ВОЙЦЕХОВСЬКИЙ Валерій Григорович,
доктор медичних наук, професор,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

АВДЄЄВА Лілія Василівна,
доктор медичних наук, професор,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного

БАЛКО Олександр Богданович,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного,

БАЛКО Олена Іванівна,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
Україна

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ СПОРОУТВОРЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ ВІД СПОРИ ДО ВЕГЕТАТИВНОЇ КЛІТИНИ

В теперішній час наука має у своєму розпорядженні велику кількість даних, що характеризують процеси розвитку мікроорганізмів на молекулярно-біологічному, субклітинному, клітинному та популяційному рівнях. Переважна більшість експериментальних даних одержана при вивченні аеробних спороутворюючих бактерій¹.

У короткому огляді неможливо уявити аналіз усіх питань проблеми розвитку спороутворюючих бактерій, у зв'язку з чим у наступних розділах викладатимуться відомості, які стосуються лише найбільш важливих та спірних процесів диференціювання спороутворюючих мікроорганізмів. Але спочатку про поняття «розвиток».

1 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.; Gould G.W. Methods for studying bacterial spores / Methods in microbiology / Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons: Acad. Press. 1971. Vol. 6. P.327-381; Дуда В.И. Особенности цитологии спорообразующих бактерий. Успехи микробиологии. М.: Наука, 1982. Вып. 17. С. 87–117; Смирнов В.В., Осадчая А.И., Кудрявцев В.Д., Сафронова Л.А. Рост и спорообразование *Bacillus subtilis* в различных условиях аэрации. Микробиол. журн. 1993. Т. 55, N 3. С. 38–43; Galperin MY, Yutin N, Wolf YI, Vera Alvarez R, Koonin EV. Conservation and Evolution of the Sporulation Gene Set in Diverse Members of the Firmicutes. J. Bacteriol. 2022. Vol. 204, No. 6, 2440 :e0007922. doi: 10.1128/jb.00079-22; Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. J. Appl Microbiol. 2006. №101. P. 514–525; Khanna K, Lopez-Garrido J, Pogliano K. Shaping an endospore: architectural transformations during *Bacillus subtilis* sporulation. Annu Rev Microbiol. 2020. № 74. P. 361–386; Eichenberger P, Fujita M., Jensen S.T., Conlon E.M., Rudner D.Z., Wang S.T., Ferguson C., Haga K., Sato T., Liu J.S., Losick R. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. 2004. PLoS Biol. № 2. P. 328; Meeske AJ, Rodrigues CD, Brady J, Lim HC, Bernhardt TG, Rudner DZ. High-throughput genetic screens identify a large and diverse collection of new sporulation genes in *Bacillus subtilis*. PLoS Biol. 2016. 14:e1002341. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002341>; Zheng L., Abhyankar W., Ouwering N., Dekker H.L., van Veen H., van der Wel N.N., Roseboom W., de Koning L.J., Brul S., de Koster C.G. *Bacillus subtilis* spore inner membrane proteome. J. Proteome Res. 2016. №15. P. 585–594.

1. Визначення понять «ріст», «диференціація», «розвиток».

Вданий час різні дослідники характеризують проблему розвитку різними, далеко неоднозначними термінами: «ріст», «диференціація», «онтогенез», «розвиток» та ін. Більше того, зазначені терміни широко використовуються представниками різних наук і спеціальностей, проте вкладені в них значення не завжди так тотожні і порівнянні навіть у випадках, коли аналізуються ідентичні системи дослідження. Все це серйозно ускладнює порозуміння та об'єктивну оцінку матеріалів.

Найбільш узагальненим, прийнятним і для мікробіології слід вважати філософське визначення поняття «розвиток» згідно якого будь-який розвиток, незалежно від його змісту, можна уявити як ряд різних щаблів розвитку, пов'язаних один з одним в такий спосіб, що один є запереченням іншого². У біології під розвитком мають на увазі процес формування організму або його частин та органів. Розрізняють індивідуальне розвиток, або онтогенез, та історичний розвиток, або філогенез. У ширшому сенсі розвиток, будучи, як правило, тісно пов'язаний зі зростанням і диференціацією, є процесом переходу від одного стану в інший, більш досконалий³.

Між явищами росту, розвитку та диференціації існують часто умовні межі: ріст, як скоординована реплікація всіх структур, органел і компонентів клітини, супроводжується диференціацією, тобто утворенням морфологічно та функціонально відмінних структур та форм, що загалом характеризується як процес розвитку⁴.

Поняття «ріст», «розвиток» та «диференціація» – це самостійні процеси, при яких легко виявляються чіткі морфологічні переходи з одного стану в інший, але неодмінно в більш досконалий стан.

Близькі до цього міркування, згідно яких онтогенез бактерій завершується утворенням різного роду покоячихся і репродуктивних форм, а до нормального онтогенезу слід відносити тільки перетворення, що відбуваються за природних умов середовища.

2 Джавец Э., Мельник Дж., Эльдерберг Э.А. Морфологические изменения в процессе роста бактерий: Руководство по медицинской микробиологии. М.: Медицина. 1982. Т.1. 363 с.; Данильян О. Г., Дзьобань О. П. Философия : підручник, 3-те вид., переробл. Харків : Право, 2020. 432 с.

3 Данильян О. Г., Дзьобань О. П. Философия : підручник, 3-те вид., переробл. Харків : Право, 2020. 432 с.; Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. М.: Мир. 1968. 452 с.

4 Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. Развитие актиномицетов. М.: Наука. 1977. 287с.

Термін «онтогенез», запропонований у минулому столітті Є. Геккелем та Ф.Мюллером при формулюванні біогенетичного закону, означає в сучасному розумінні комплекс послідовних морфологічних, фізіологічних та біохімічних перетворень в організмі з моменту його народження і до смерті. Нині дедалі більше затверджується правомірність застосування цього терміна до окремої мікробної клітини, проте для повного визнання необхідні нові факти і докази. Долю прокаріотів легше оцінювати в процесі індивідуального розвитку в тому випадку, якщо при цьому можна виявити елементи диференціювання. Значно менше з'ясовано, ймовірно, у зв'язку з відсутністю необхідних методичних прийомів, індивідуальна доля прокаріотів, що розмножуються поділом навпіл⁵.

Таким чином, перед експериментатором, який намагається проаналізувати процес розвитку певної клітини, завжди має стояти нелегке завдання з'ясування ступеня «досконалості» окремих стадій розвитку. Ця складність, як і деякі інші, визнається мікробіологічною літературою.

2. Процеси розвитку під час перетворення спори у вегетативну клітину

Перетворення бактеріальної спори на вегетативну клітину складний, багатоетапний процес, який нині інтенсивно досліджується багатьма лабораторіями світу⁶. Утворення метаболічно активної клітини починається з переривання стану спокою і складається з трьох послідовних стадій – активації, ініціації, виростання. Кожна з них характеризується певними морфологічними, фізіологічними та біохімічними проявами⁷.

5 Калакуцкий Л.В. Место заключения: что в будущем? / Онтогенез микроорганизмов: Сб. докл. Всесоюз. симп. М.: Наука, 1979. С. 295–305.

6 Secaira-Morocho H, Castillo JA, Driks A. Diversity and evolutionary dynamics of spore-coat proteins in spore-forming species of Bacillales. *Microb. Genom.* 2020. № 6:mgen000451. doi: 10.1099/mgen.0.000451; Galperin M.Y., Yutin N., Wolf Y.I., Vera Alvarez R., Koonin E.V. Conservation and Evolution of the Sporulation Gene Set in Diverse Members of the Firmicutes. *J. Bacteriol.* 2022. № 204(6):e0007922. doi: 10.1128/jb.00079-22; Takamatsu H., Watabe K. Assembly and genetics of spore protective structures. *Cell Mol Life Sci.* 2002. № 59(3). P. 434–44; Qin H., Driks A. Contrasting evolutionary patterns of spore coat proteins in two Bacillus species groups are linked to a difference in cellular structure. *BMC Evol. Biol.* 2013. № 13. P.261; Boone T.J., Mallozzi M., Nelson A., Thompson B., Khemmani M., Lehmann D., Dunkle A., Hoeprich P., Rasley A., Stewart G., Driks A. Coordinated Assembly of the Bacillus anthracis Coat and Exosporium during Bacterial Spore Outer Layer Formation. *mBio.* 2018. № 9(6). P.01166-18; Paredes-Sabja D., Setlow P., Sarker M.R. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.* 2011. № 19(2). P. 85–94; Subirana J.A., Messeguer X. Tandem Repeats in *Bacillus*: Unique Features and Taxonomic Distribution. *Int J. Mol. Sci.* 2021. № 22(10). P. 5373; Maayer P.D., Aliyu H., Cowan D.A. Reorganising the order Bacillales through phylogenomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 2019. № 42. P. 178–189.

7 Paul C., Filippidou S., Jamil I., Kooli W., House G.L. et al. Bacterial spores, from ecology to biotechnology. *Adv. Appl. Microbiol.* 2019. № 106. P. 79–111; Suito I., Jōgi E., Talpsep E., Naaber P., Lõivukene K. et al. Protective effect by *Bacillus smithii* TBMI2 spores of *Salmonella* serotype enteritidis in mice. *Benef Microbes.* 2010. № 1. P.37–42;

Виникнення чергової стадії залежить від перебігу попередньої, що відрізняється за своєю природою та механізмом розвитку⁸.

2.1. Спокій

Стан спокою властивий практично всім клітинам будь-якого мікроорганізму. Як правило – це тимчасова перерва у фенотиповому розвитку організму⁹. Для спороутворюючих мікроорганізмів такою перервою є спора. Оскільки спора може бути активованою або перебувати у стані ініціації, для характеристики спокою спороутворюючих виділяють стан так званого конституційного спокою спори, що визначає цитологічні, фізико-хімічні, функціональні та інші відмінності спори від вегетативної клітини¹⁰.

Ендоспори, що покояться, характеризуються високим показником світлозаломлення, слабкою проникністю для основних барвників і фіксаторів надзвичайною стійкістю до тепла, висушування, ультрафіолетового і радіоактивного випромінювання, ультразвукових хвиль, механічних руйнувань, різних хімічних агентів та інших зовнішніх впливів¹¹. В даний

Wells-Bennik M.H.J., Eijlander R.T., den Besten H.M.W., Berendsen E.M., Warda A.K., et al. Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2016. № 7. P.457–482; Nicholson W.I., Munacata N., Horneck G. et al. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial environments. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64. № 3. P.548-572; Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. *Microbes Infect.* 2000. №2. P.189–198; Setlow P. Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know. *J. Bacteriol.* 2014. № 196(7). P.1297-305; Zebrowska J., Witkowska M., Struck A., Laszuk P.E., Raczuk E., Ponikowska M., Skowron P.M., Zylicz-Stachula A. Antimicrobial Potential of the Genera Geobacillus and Parageobacillus, as Well as Endolysins Biosynthesized by Their Bacteriophages. *Antibiotics (Basel).* 2022. № 11(2): P.242. doi: 10.3390/antibiotics11020242.

- 8 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.; 31. Łubkowska B., Jeżewska-Frąckowiak J., Sobolewski I., Skowron P.M. Bacteriophages of Thermophilic 'Bacillus Group' Bacteria. *Microorganisms.* 2021. № 9(7). P.1522; Barlass P.J., Houston C.W., Clements M., Moir A. Germination of Bacillus cereus spores in response to L-alanine to inosine: The role of gerL and gerQ operons. *Microbiology.* 2002. Vol. 148, N 7. P.2089-2095; Gould G.W. Germination / The bacterial spore / Eds G.W.Gould, A.Hurst: Academic Press. 1969. P.39-72; Harry E.J. Coordinating DNA replication with cell division: Lessons from outgrowing spores. *Biochimie.* 2001. Vol. 83, N 1. P.75-81.
- 9 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / *Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press.* 1973. P.85-123.
- 10 Дорошенко Е.В., Лайко Н.Г., Мулюкин А.Л. Биоразнообразие покоящихся форм микроорганизмов / Материалы школы-конф. «Горизонты физ.-хим. биологии». – Пушино. 2000. Т.1. С.195-196; Мулюкин А.Л., Дорошенко Е.В., Лайко Н.Г. и др. К вопросу о механизмах анабиоза микроорганизмов / Материалы shk.-конф. «Горизонты физико-химической биологии». Пушино. 2000. Т. 2. С.104-105; Paredes-Sabja D., Setlow B., Setlow P., Sarker M.R. Characterization of Clostridium perfringens spores that lack SpoVa proteins and dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* 2008. № 190(13). P.4648-59; Setlow P.J. Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J.Appl. Microbiol.* 2006. № 101(3). P. 514-25. doi: 10.1111/j.1365-2672; Yu B., Kanaan J., Shames H., Wicander J., Aryal M., Li Y, Korza G., Brul S., Kramer G., Li Y.Q., Nichols F.C., Hao B., Setlow P. Identification and characterization of new proteins crucial for bacterial spore resistance and germination. *Front Microbiol.* 2023. № 14. P.1161-1164; Korza G., DePratti S., Fairchild D., Wicander J., Kanaan J., Shames H., Nichols F.C., Cowan A., Brul S., Setlow P. Expression of the 2Duf protein in wild-type Bacillus subtilis spores stabilizes inner membrane proteins and increases spore resistance to wet heat and hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.* 2023. № 134(3). :lxad040. doi: 10.1093/jambio/lxad040.
- 11 Krawczyk A.O., de Jong A., Omony J., Holsappel S., Wells-Bennik M.H.J., Kuipers O.P., Eijlander R.T. Spore Heat Activation Requirements and Germination Responses Correlate with Sequences of Germinant Receptors and with the Presence of a Specific spoVA2mob Operon in Foodborne Strains of Bacillus subtilis. *Appl Environ Microbiol.* 2017. № 83(7):e03122-16. doi: 10.1128/AEM.03122-16; Wang G., Yi X., Li Y.Q., Setlow P. Germination of individual

час немає єдиної думки про механізм формування та підтримки спокою бактеріальних спор, а існуючі пояснення хоч і ґрунтуються на наукових фактах, проте залишаються гіпотетичними¹².

Спокій спори частіше пов'язують з наявністю численних покрівів (особливо з такою спороспецифічною структурою, як кортекс), що забезпечують знижену виборчу проникність спори та зневоднення її серцевини¹³. Вважають, що кортекс у процесі спороутворення стискається, внаслідок чого відбувається дегідратація та ущільнення серцевини спори¹⁴.

Згідно з іншими спостереженнями, навпаки, кортекс розширюється, внаслідок чого вільні катіони видаляються з спори, що формується, а моновалентні, позитивно заряджені іони врівноважують на відстані негативно заряджені групи пептидоглікану, підтримуючи тим самим кортекс у розширеному та зневодненому стані. Високий осмотичний тиск, що утворився при цьому, надає стискаючу і дегідрувальну дію на протопласт спори.

Пізніші дослідження Gould G.W. вказують на кореляцію стійкості та спокою бактеріальних спор із вмістом у кортексі СООН-груп та діаміно-пімелінової кислоти¹⁵.

Не виключено, що у забезпеченні спокою в ендоспор має значення такий спороспецифічний продукт як дипіколінова кислота (ДПК)¹⁶. Хелатні

Bacillus subtilis spores with alterations in the GerD and SpoVA proteins, which are important in spore germination. *J. Bacteriol.* 2011. № 193(9). P.2301-2311; Berendsen E.M., Boekhorst J., Kuipers O.P., Wells-Bennik M.H.J. Bacterial spores – a mobile genetic element profoundly increases heat resistance. *ISMEJ.* 2016. № 10. P.2633-2642; Berendsen, E.M., Konings, R.A., Boekhorst J., de Jong A., Kuipers O.P., Bennik H.M.J. High-level heat resistance of spores of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* results from the presence of a spoVA operon in a Tn1546 transposon. *Front Microbiol.* 2016. № 7. P.1912; Berendsen E.M., Krawczyk A.O., Klaus V., de Jong A., Boekhorst J., Eijlander R.T., Kuipers O.P., Wells-Bennik M.H.J. Spores of *Bacillus thermoamylovorans* with very high heat resistance germinate poorly in rich media despite the presence of ger clusters, but efficiently upon non-nutrient Ca-DPA exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2015. № 81. P.7791-7801; Berendsen E.M., Zwietering M.H., Kuipers O.P. and Wells-Bennik M.H.J. Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiol.* 2015. № 45. P.18-25; den Besten H.M.W., Wells-Bennik M.H.J., Zwietering M.H. Natural diversity in heat resistance of bacteria and bacterial spores: impact on food safety and quality. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2018. № 9. P. 383–410.

- 12 Paredes-Sabja D., Setlow B., Setlow P., Sarker M.R. Characterization of *Clostridium perfringens* spores that lack SpoVA proteins and dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* 2008. № 190(13). P.4648-59; Nicholson W.I., Munacata N., Horneck G. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial environments. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64, N 3. – P.548-572; Melly E., Setlow P. Heat shock proteins do not influence wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores. *J.Bacteriol.* 2001. Vol. 183, N 2. P.779-784; Popham D.L., Gilmore M.E., Setlow P. Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, N 1. P. 126–132.
- 13 Melly E., Setlow P. Heat shock proteins do not influence wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores. *J.Bacteriol.* 2001. Vol. 183, N 2. P.779-784; Popham D.L., Gilmore M.E., Setlow P. Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, N 1. P. 126–132.
- 14 Popham D.L., Meador-Parton J., Costello C.E. et al. Spore peptidoglycan structure in a cwID dacB double mutant of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* 1999. Vol. 181, N 19. P. 6205–6209.
- 15 Ibid.
- 16 Gould G.W., Ordal Z.J. Activation of spores *Bacillus cereus* by γ -radiation. *J. Gen.Microbiol.* 1968. Vol. 50, N 1. P. 77–84.

комплекси ДПК з іонами Ca²⁺, амінокислотами, зокрема, сірковмісними, та пептидами можливо виступають у ролі «аутоінгібіторів» ферментів метаболізму. Згідно з іншими даними, ферменти метаболізму, в умовах підвищеної концентрації солей, набувають термостабільності та особливої конфігурації молекул, а вихід з неактивного стану передбачає зміну існуючої конфігурації.

Мабуть, стан спокою забезпечується й іншими спороспецифічними компонентами та структурами (оболонковий протеїн, багатий на цистин та ін.), особливе співвідношення яких у ендоспор різних мікроорганізмів забезпечує їх індивідуальність¹⁷. Дуже невелика кількість особин спорової популяції може перебувати в надспокійному стані. Такі спори відрізняються від більшості інших рядом властивостей, у тому числі й особливою реакцією на впливи, що призводять до активації та ініціації спори.

2.2. Активація

Спори, що сформувалися, здатні знову перетворитися на вегетативні клітини. Однак вони проростають відносно повільно, навіть якщо їх помістити в оптимальні умови. Помітно швидше проростають лише старі спори зі зниженою життєздатністю¹⁸. Однак молоді спори, піддані певним фізичним або хімічним впливам, також набувають здатності проростати досить швидко і з більшою синхронністю. Такий вплив, що не викликає ініціацію спори, але дозволяє їй швидше і повноцінніше проростати, називають активацією¹⁹. На відміну від старіння, активація – процес зворотній. Активовану спору можна повернути у вихідний стан, у той час як при старінні колишній рівень спокою не відновлюється. У зв'язку з цим Кейнан А. та Evenchik Z. припустили, що при старінні порушуються механізми, відповідальні за зворотність активації²⁰. Ми вважаємо, що під час активації не включаються всі механізми проростання.

17 Keynan A., Evenchik Z. Activation / The bacterial spore: Eds G.W.Gould, A.Hurst: Academic Press, 1969. P. 359-396.

18 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P. 85-123.

19 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.; Gould G.W. Methods for studying bacterial spores / Methods in microbiology / Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons: Acad. Press. 1971. Vol. 6. P.327-381; Gould G.W., Ordal Z.J. Activation of spores *Bacillus cereus* by γ -radiation. J. Gen.Microbiol. 1968. Vol. 50, N 1. P.77-84; Keynan A., Evenchik Z. Activation / The bacterial spore: Eds G.W.Gould, A.Hurst: Academic Press, 1969. P. 359-396; Keynan A., Evenchik Z., Halvorson H.O., Hastings J. Activation of bacterial endospores. J. Bacteriol. 1964. Vol. 88, N 2. P. 313-318.

20 Keynan A., Evenchik Z. Activation / The bacterial spore: Eds G.W.Gould, A.Hurst: Academic Press, 1969. P. 359-396.

Під час зберігання активованих спор відбувається відновлення (деактивація) їхніх колишніх властивостей. Цикл активація деактивація може повторюватися багаторазово. Встановлено, що для спор *B.cereus* швидкість деактивації корелює зі зниженням температури²¹, у той час, як у інших мікроорганізмів деактивацію взагалі не спостерігалася, що може бути зумовлено відмінностями в ступені активації.

Нині немає способів прямого вимірювання процесу активації (як і спокою), тому її ступінь оцінюють за швидкістю проростання суспензії спор за допомогою приладів, що реєструють зміну оптичної щільності культури. Застосовуються й інші методи: фазово-контрастна мікроскопія спор, що проростають після активації, посів на щільні поживні середовища з подальшим підрахунком кількості колоній.

Активацію спор, що спочивають, можна викликати різними агентами фізичної та хімічної природи: теплом²², механічною обробкою, γ -променнями, водяною парою²³ та гідростатичним тиском²⁴, певним рН середовища²⁵, хімічними факторами: меркаптоетанолом, диметилсульфоксидом, розчинами Са-ДПК та іншими впливами²⁶. Найчастіше для цього застосовують прогрівання за сублетальної температури (60°,70°,90°C) градусів впродовж кількох хвилин. Оптимальний режим теплової активації строго

- 21 Yu B., Kanaan J., Shames H., Wicander J., Aryal M., Li Y., Korza G., Brul S., Kramer G., Li Y.Q., Nichols F.C., Hao B., Setlow P. Identification and characterization of new proteins crucial for bacterial spore resistance and germination. *Front Microbiol.* 2023. № 14. P.1161-1164; Krawczyk A.O., de Jong A., Omony J., Holsappel S., Wells-Bennik M.H.J., Kuipers O.P., Eijlander R.T. Spore Heat Activation Requirements and Germination Responses Correlate with Sequences of Germinant Receptors and with the Presence of a Specific spoVA2mob Operon in Foodborne Strains of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 2017. № 83(7):e03122-16. doi: 10.1128/AEM.03122-16.
- 22 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.; Мулюкин А.Л., Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г. и др. К вопросу о механизмах анабиоза микроорганизмов / Материалы шк.-конф. "Горизонты физико-химической биологии". Пуцзино. 2000. Т. 2. С. 104–105.
- 23 Krawczyk A.O., de Jong A., Omony J., Holsappel S., Wells-Bennik M.H.J., Kuipers O.P., Eijlander R.T. Spore Heat Activation Requirements and Germination Responses Correlate with Sequences of Germinant Receptors and with the Presence of a Specific spoVA2mob Operon in Foodborne Strains of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 2017. № 83(7):e03122-16. doi: 10.1128/AEM.03122-16; Keynan A., Evenchik Z., Halvorson H.O., Hastings J. Activation of bacterial endospores. *J. Bacteriol.* 1964. Vol. 88, N 2. P. 313–318.
- 24 Wang G., Yi X., Li Y.Q., Setlow P. Germination of individual *Bacillus subtilis* spores with alterations in the GerD and SpoVA proteins, which are important in spore germination. *J. Bacteriol.* 2011. № 193(9). P.2301-2311; Berendsen E.M., Boekhorst J., Kuipers O.P., Wells-Bennik M.H.J. Bacterial spores – a mobile genetic element profoundly increases heat resistance. *ISMEJ.* 2016. № 10. P.2633-2642; Berendsen, E.M., Konings, R.A., Boekhorst J., de Jong A., Kuipers O.P., Bennik H.M.J. High-level heat resistance of spores of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* results from the presence of a spoVA operon in a Tn1546 transposon. *Front Microbiol.* 2016. № 7. P. 1912.
- 25 Berendsen E.M., Krawczyk A.O., Klaus V., de Jong A., Boekhorst J., Eijlander R.T., Kuipers O.P., Wells-Bennik M.H.J. Spores of *Bacillus thermoamylovorans* with very high heat resistance germinate poorly in rich media despite the presence of ger clusters, but efficiently upon non-nutrient Ca-DPA exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2015. № 81. P. 7791–7801.
- 26 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.; Berendsen E.M., Zwietering M.H., Kuipers O.P. and Wells-Bennik M.H.J. Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiol.* 2015. № 45. P.18-25; Berendsen E.M., Krawczyk A.O., Klaus V., de Jong A., Boekhorst J., Eijlander R.T., Kuipers O.P., Wells-Bennik M.H.J. Spores of *Bacillus thermoamylovorans* with very high heat resistance germinate poorly in rich media despite the presence of ger clusters, but efficiently upon non-nutrient Ca-DPA exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2015. № 81. P. 7791–7801.

індивідуальний не тільки у спор одного виду, но і у одного віку, а також одержаних в певному поживному середовищі. Реакція у відповідь на активацію може бути різна і у зв'язку з генетичними особливостями особин однієї і тієї ж популяції²⁷.

Встановлено, що за певних умов (присутність O_2 , іонів Mg^{2+} і Ca^{2+} , парів метанолу) активувати спору вдається і відносно низькими температурами ($20^\circ C$), які не є оптимальними для росту^{28,40,41}. Так теплова обробка ендоспор *Thermoactinomyces vulgaris* при $4^\circ C$ протягом 10 діб прискорювала проростання, тоді як прогрівання при 90° 15 хвилин проростання гальмувало.

Активовані спори набувають нових властивостей, зокрема згадуваної вище здатності до більш швидкого і більш синхронного проростання в колишніх або змінених умовах. З'являється здатність окислювати глюкозу, збільшується активність протеаз і деяких інших ферментів²⁹, підвищується проникність, починається виділення ДПК³⁰. Однак вони, як і раніше, залишаються стійкими до зовнішніх впливів, зберігають рефрактерність, погано забарвлюються основними барвниками. Електронно-мікроскопічні дослідження ультра-структури спор, активованих фізичними та хімічними агентами, дозволили виявити в їхніх покритвах виникнення шаруватості та ніздрюватості³¹.

Таким чином, активація розглядається в сучасній літературі як складний фізико-хімічний процес, природа якого не встановлена і потребує вивчення. Немає доказів того, що активація опосередкована метаболізмом, вона не інгібується метаболічними інгібіторами, але може бути інгібована катіонами³². Передбачається, що активуючі чинники, розриваючи

- 27 Nicholson W.I., Munacata N., Horneck G. et al. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial environments. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64, N 3. – P.548-572; den Besten H.M.W., Wells-Bennik M.H.J., Zwietering M.H. Natural diversity in heat resistance of bacteria and bacterial spores: impact on food safety and quality. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2018. № 9. P.383-410; Olguín-Araneda V., Banawas S., Sarker M. R., Paredes-Sabja D. Recent advances in germination of Clostridium spores. *Res. Microbiol.* 2015. № 166. P.236–243; Xiao Y., Francke C., Abee T., Wells-Bennik M. H. J. Clostridial spore germination versus bacilli: Genome mining and current insights. *Food Microbiol.* 2011. № 28. P. 266–274.
- 28 Yu B., Kanaan J., Shames H., Wicander J., Aryal M., Li Y, Korza G., Brul S., Kramer G., Li Y.Q., Nichols F.C., Hao B., Setlow P. Identification and characterization of new proteins crucial for bacterial spore resistance and germination. *Front Microbiol.* 2023. № 14. P.1161-1164; Korza G., DePratti S., Fairchild D., Wicander J., Kanaan J., Shames H., Nichols F.C., Cowan A., Brul S., Setlow P. Expression of the 2Duf protein in wild-type *Bacillus subtilis* spores stabilizes inner membrane proteins and increases spore resistance to wet heat and hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.* 2023. № 134(3). :lxad040. doi: 10.1093/jambio/lxad040.
- 29 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.
- 30 Melly E., Setlow P. Heat shock proteins do not influence wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores. *J.Bacteriol.* 2001. Vol. 183, N 2. P. 779–784.
- 31 Popham D.L., Gilmore M.E., Setlow P. Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, N 1. P. 126–132.
- 32 Popham D.L., Meador-Parton J., Costello C.E. et al. Spore peptidoglycan structure in a cwID dacB double mutant of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* 1999. Vol. 181, N 19. P. 6205–6209.

дисульфідні зв'язки білків спори (і насамперед, ймовірно, білків покривів), спричиняють конфігураційну перебудову в їхній третинній структурі. Очевидно, зміни в покривах спори, що забезпечують кращі умови для проникнення іонів і макромолекул, сприяють тим самим більш швидкій ініціації, що настає після активації.

2.3. Ініціація

Коли на активовані спори впливають певними речовинами, що індукують проростання, то протягом короткого часу настає ініціація спор. Ініціація – це перетворення спори, що спочиває, на метаболічно активну клітину, внаслідок чого відбуваються незворотні, пов'язані з гідролізом, зміни, що супроводжуються зменшенням стійкості спор до зовнішніх впливів, деполімеризацією та екскрецією низки речовин зі спори, здебільшого ДПК, кальцію, магнію і компонентів пептидоглікану, руйнуванням покривів та кортексу, втратою рефрактерності³³.

Численні чинники, що спричиняють ініціацію запропоновано розділяти на три групи³⁴. До першої групи віднесено так звані «фізіологічні ініціатори», які або є, або можуть бути нормальними метаболітами клітини (вуглеводи, амінокислоти, рибозиди, іони металів тощо). До другої групи об'єднано різні хімічні ініціатори (поверхнево-активні речовини, перекиси та ін.), роль яких у обмінних процесах незрозуміла, і, нарешті, третю групу становлять так звані фізичні ініціатори (механічний вплив та ін.).

Дослідженнями Hills V. було вперше показано, що спори *B.subtilis* можуть бути ініційовані водним розчином L-аланіну, а спори *B.anthraxis* – сумішшю аденозину, L-аланіну і D,L-тирозину. Ініціація спор при обробці аланіном, аденозином, глюкозою може наставати так само швидко, як і при поміщенні їх у повноцінне живильне середовище. Інгібуючу дію на L-аланінову ініціацію чинять такі амінокислоти, як D-аланін, гліцин, валін,

33 Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. Развитие актиномицетов. М.: Наука. 1977. 287с.; Berendsen E.M., Krawczyk A.O., Klaus V., de Jong A., Boekhorst J., Eijlander R.T., Kuipers O.P., Wells-Bennik M.H.J. Spores of *Bacillus thermoamylovorans* with very high heat resistance germinate poorly in rich media despite the presence of ger clusters, but efficiently upon non-nutrient Ca-DPA exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2015. № 81. P.7791-7801; Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2000. №2. P.189–198; Setlow P. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J. Bacteriol.* 2014. № 196(7). P.1297-305; Zebrowska J., Witkowska M., Struck A., Laszuk P.E., Raczuk E., Ponikowska M., Skowron P.M., Zylicz-Stachula A. Antimicrobial Potential of the Genera *Geobacillus* and *Parageobacillus*, as Well as Endolysins Biosynthesized by Their Bacteriophages. *Antibiotics (Basel).* 2022. № 11(2): P.242. doi: 10.3390/antibiotics11020242; Nicholson W.I., Munacata N., Horneck G. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial environments. *Microbiol. And Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64. № 3. P. 548–572.

34 Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. Развитие актиномицетов. М.: Наука. 1977. 287с.

цистеїн, метіонін тощо, які, якщо їх використати окремо або в певних співвідношеннях, здатні індукувати ініціацію³⁵.

Колишні уявлення про те, що класична L-аланінова система є головним ініціатором спор, істотно змінилися. Умови, необхідні для проростання спор різних родів, видів і навіть штамів одного виду бактерій, можуть істотно відрізнятись. Так, для деяких штамів *B.megaterium* ініціювальними факторами виявилися глюкоза, іони металів, а для спор кластридій, найкращими ініціаторами D і L-лактат³⁶, різноманітні неорганічні та органічні солі³⁷ та ін. Спори *B.fastidiosus* проростали в присутності сечової кислоти, фосфатів, алантоїна і жоден з відомих стимуляторів проростання не був ефективним^{38,39}.

Вважають, що ініціювальна дія пов'язана з проникненням іонів різних металів у відповідні ділянки покривів спор, а роль складних органічних речовин зводиться до того, що вони сприяють такому проникненню³⁹. Однак ініціація спор може бути спричинена не тільки різними хімічними агентами, а й шляхом механічної обробки. Струшування спор із дрібним скляним намистом, розтирання або вплив гідростатичним тиском спричиняють, так зване, механічне проростання спор⁴⁰.

Процес ініціації залежить не тільки від якості або кількості відповідних гермінантів, а й від низки інших чинників, зокрема від режиму попередньої активації, температури, рН середовища, аерації⁴¹.

Внаслідок дії ініціуючих агентів у спорі, що проростає, послідовно виникає комплекс фізіологічних, хімічних та цитологічних перетворень

35 Keynan A., Evenchik Z., Halvorson H.O., Hastings J. Activation of bacterial endospores. *J. Bacteriol.* 1964. Vol. 88, N 2. P. 313–318.

36 Olguin-Araneda V., Banawas S., Sarker M. R., Paredes-Sabja D. Recent advances in germination of Clostridium spores. *Res. Microbiol.* 2015. № 166. P. 236–243.

37 Bhattacharjee D., McAllister K. N., Sorg, J. A. Germinants and their receptors in clostridia. *J. Bacteriol.* 2016. № 198. P.2767–2775; Xiao Y., Francke C., Abee T., Wells-Bennik M. H. J. Clostridial spore germination versus bacilli: Genome mining and current insights. *Food Microbiol.* 2011. № 28. P. 266–274.

38 Troiano A. J., Zhang J., Cowan A. E., Yu J., Setlow P. Analysis of the dynamics of a *Bacillus subtilis* spore germination protein complex during spore germination and outgrowth. *J. Bacteriol.* 2015. № 197. P. 252–261.

39 Bhattacharjee D., McAllister K. N., Sorg, J. A. Germinants and their receptors in clostridia. *J. Bacteriol.* 2016. № 198. P.2767–2775; Troiano A. J., Zhang J., Cowan A. E., Yu J., Setlow P. Analysis of the dynamics of a *Bacillus subtilis* spore germination protein complex during spore germination and outgrowth. *J. Bacteriol.* 2015. № 197. P. 252–261.

40 Wang G., Yi X., Li Y.Q., Setlow P. Germination of individual *Bacillus subtilis* spores with alterations in the GerD and SpoVA proteins, which are important in spore germination. *J. Bacteriol.* 2011. № 193(9). P.2301–2311; Warda A. K. et al. Analysis of germination capacity and inventarisation of germinant receptor (sub)clusters of genome sequenced *Bacillus cereus* environmental isolates and model strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. № 83(4):e02490–16. doi: 10.1128/AEM.02490-16; Berendsen E.M., Boekhorst J., Kuipers O.P., Wells-Bennik M.H.J. Bacterial spores – a mobile genetic element profoundly increases heat resistance. *ISMEJ.* 2016. № 10. P. 2633–2642.

41 Qin H., Driks A. Contrasting evolutionary patterns of spore coat proteins in two *Bacillus* species groups are linked to a difference in cellular structure. *BMC Evol. Biol.* 2013. № 13. P. 261.

Найбільш ранньою, відомою на даний час ознакою проростання, є зниження температуростійкості⁴².

Слідом за цим спостерігалось підвищення чутливості до ультрафіолетових променів, проте у *ssp* та *tsp* мутантів *B.subtilis* така чутливість, навпаки, зменшувалась, особливо на початку проростання⁴³. Поступово зменшується резистентність до іонізуючої радіації, тиску, хімічних агентів та інших зовнішніх чинників.

Під час ініціації відбувалася досить інтенсивна екскреція іонів кальцію, магнію, калію та інших металів, дипіколінової кислоти, а також амінокислот, пептидів, які, ймовірно, виділялися в результаті деполімеризації муреїну кортекса літичними ферментами спори⁴⁴. Загалом спора, що проростала, втрачала до 30% сухої ваги.

Ініціація супроводжувалася низкою цитологічних змін, що виникали як в оболонках спори, так і в її серцевині. Зовнішній покрив міг відшаровуватися, кортекс набухати або ж ставати волокнистим, гранулярним, а надалі редукуватися. У фазово-контрастному мікроскопі в цей період можна побачити як периферичні шари спори швидко темніють, а серцевина залишається світлою. Надалі деградує внутрішній покрив, на якому з'являються розриви. Серцевина розбухає, у ній досить чітко виявляються рибосомальна та ядерна зони, зачаток клітинної стінки починає потовщуватися. У цей час у фазово-контрастному мікроскопі спора повністю темна⁴⁵. Друга фаза потемніння більш тривала. Найменше

42 Łubkowska B., Jeżewska-Frąckowiak J., Sobolewski I., Skowron P.M. Bacteriophages of Thermophilic 'Bacillus Group' Bacteria. *Microorganisms*. 2021. № 9(7). P.1522; Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P.85-123; Gould G.W. Germination / The bacterial spore / Eds G.W.Gould, A.Hurst: Academic Press. 1969. P.39-72; Harry E.J. Coordinating DNA replication with cell division: Lessons from outgrowing spores. *Biochimie*. 2001. Vol. 83, N 1. P.75-81; Barlass P.J., Houston C.W., Clements M., Moir A. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine to inosine: The role of *gerL* and *gerQ* operons. *Microbiology*. 2002. Vol. 148, N 7. P. 2089–2095.

43 Barlass P. J., Houston C. W., Clements M. O., Moir, A. Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: The roles of *gerL* and *gerQ* operons. *Microbiology*. 2002. № 148. P.2089–2095; Brunt J., van Vliet A. H. M., van den Bos F., Carter A. T., Peck M. W. Diversity of the germination apparatus in *Clostridium botulinum* groups I, II, III, and IV. *Front. Microbiol.* 2016. № 7. P. 1702.

44 Wang S., Shen A., Setlow P., Li Y. Q. Characterization of the dynamic germination of individual *Clostridium difficile* spores using Raman spectroscopy and differential interference contrast microscopy. *J. Bacteriol.* 2015. № 197. P.2361–2373; Plowman J., Peck M. W. Use a novel method to characterize the response of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B E and F to a wide range of germinants and conditions. *J. Appl. Microbiol.* 2002. № 92. P.681–694; Brunt J. et al. Functional characterisation of germinant receptors in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* presents novel insights into spore germination systems. *PLoS Pathog.* 2014. № 10(9). e1004382; Alberto F., Broussolle V., Mason D. R., Carlin F., Peck M. W. Variability in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003. № 36. P. 41–45.

45 Setlow P. When the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* 2013. № 115. P.1251–1268; Banawas S. et al. The *Clostridium perfringens* germinant receptor protein GerKC is located in the spore inner membrane and is crucial for spore germination. *J.Bacteriol.* 2013. №195. P.5084–5091; Paredes-Sabja D., Torres J. A., Setlow P., Sarke, M. R. *Clostridium perfringens* spore germination: Characterization of germinants and their receptors. *J. Bacteriol.* 2008. № 190. P.1190–1201; Qin H., Driks A. Contrasting evolutionary patterns of spore coat proteins in two *Bacillus* species groups are linked to a difference in cellular structure. *BMC Evol. Biol.* 2013. № 13. P. 261.

схильний до змін екзоспориум. Природно, що після таких структурних перебудов збільшується проникність спори, вона легко забарвлюється простими методами забарвлення.

За допомогою нових методичних прийомів встановлено, що перша фаза проростання індивідуальної спори – «мікролаг» – триває від початку контакту із середовищем росту до появи перших ознак потемніння, друга фаза – «мікропроростання» – до повного потемніння спори. Різниця в часі настання і швидкості проходження обох фаз індивідуальними спорами дуже добре демонструє гетерогенність їхніх властивостей. Особини будь-якої популяції потребують для проростання різних концентрацій гермінантів (так зване фракційне проростання), а деякі з них (ті, які перебували у стані надмірного спокою) не проростають навіть за найоптимальніших для більшості умов⁴⁶.

Проростання ендоспор, як зазначалося вище, опосередковане метаболізмом, що є доказом повної втрати клітинами криптобіотичного стану. Метаболічні процеси, особливо на ранніх етапах ініціації, забезпечуються ферментами, що містяться у спор в стані спокою⁴⁷. Синтез РНК починається за кілька хвилин до синтезу білка і контролюється транскрипцією. Під час проростання спор *B. megaterium* існує дві стадії синтезу білка⁴⁸. На першій стадії (перші 75 хв.) унаслідок протеолізу спори, амінокислоти екскретувалися в навколишнє середовище, використовуючись для синтезу білка і частково піддаючись метаболічним перетворенням. Отже, синтез білка на ранніх стадіях цілком залежав від фонду передіснуючих амінокислот, який утворювався в результаті руйнування власного білкового матеріалу ферментами, що зберігалися в спочиваючій спорі⁴⁹. Під час другої стадії з'являлася здатність синтезувати всі амінокислоти і для синтезу білка використовувалися екзогенні джерела азоту.

46 Francis M. B., Allen C. A., Shrestha R., Sorg J. A. Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog.* 2013. № 9. e1003356; Yu B., Kanaan J., Shames H., Wicander J., Aryal M., Li Y., Korza G., Brul S., Kramer G., Li Y.Q., Nichols F.C., Hao B., Setlow P. Identification and characterization of new proteins crucial for bacterial spore resistance and germination. *Front Microbiol.* 2023. № 14. P.1161-1164; Paidhungat M., Ragkousi K., Setlow P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. *J. Bacteriol.* 2001. № 183. P.4886-4893.

47 Paidhungat M., Ragkousi K., Setlow P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. *J. Bacteriol.* 2001. № 183. P. 4886-4893.

48 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.; Setlow B., Setlow P. Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178, N 12. P. 3486-3495

49 Setlow B., Cowan A. E., Setlow P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *J. Appl. Microbiol.* 2003. № 95. P.637-648; Keynan A. Cryptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // *Spore V: Am. Soc. Microbiol.* 1972. P. 355-362.

Що стосується синтезу ДНК, то коротко можна вказати на таке. Реплікація ДНК, а її може бути в спорі кілька, починається значно пізніше (через годину або інший час, залежно від умов), тобто впорядкована транскрипція генів під час проростання не контролюється реплікацією ДНК. Причина затримки синтезу ДНК не встановлена й існує лише низка припущень, зокрема, відсутність у спорах, які спочивають, ДНК-реплікази або білка-ініціатора реплікації та поступовий синтез їх у процесі проростання, відсутність пулу дезоксирибонуклеотидів, особливий фізичний стан ДНК у спорах, які спочивають⁵⁰.

Механізм, відповідальний за проростання, ймовірно, унікальний. Він розрахований на припинення криптобіозу, утворення метаболічно активної форми і не є частиною метаболічного процесу вегетативної клітини⁵¹. На даний час немає однозначного тлумачення природи ініціації. Існує припущення, що одна спора може володіти безліччю механізмів, що індукують переривання спокою, що підтверджується різноманітністю гермінантів, ефективних для однієї і тієї самої спори, або для різних спор. Багато дослідників у цій галузі вважають, що проростання є багатоступеневою стадією розвитку, в основі якої лежить так звана стартерна (тригерна) реакція, опосередкована ферментами. Літичний фермент, що активується на цьому етапі, викликає руйнування значної частини кортекса. При цьому, останній виділяється в навколишнє середовище, звільняючи тим самим цитоплазму спори⁵².

На думку авторів ферментативна природа стартерної реакції проростання підтверджується тим, що проростання можна пригнічувати стереоспецифічними антагоністами індукторів проростання і деякими метаболічними отрутами⁵³. Крім того, показано, що індуктори руйнуються ферментами спор, що проростають, а в разі відсутності у спор відповідних

50 Setlow B., Cowan A. E., Setlow P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *J. Appl. Microbiol.* 2003. № 95. P.637–648; Keynan A. Criptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // *Spore V: Am. Soc. Microbiol.* 1972. P. 355–362.

51 Ibid.

52 Keynan A. Criptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // *Spore V: Am. Soc. Microbiol.* 1972. P.355-362; Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / *Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press.* 1973. P. 85–123.

53 Moriyama R., Fucuoka H., Miyata S. et al. Expression of a germination-specific amidase, SleB, of bacilli in the forespore compartment of sporulating cells and its localization on the exterior side of the cortex in dormant spores. *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, N 8. P.2373-2378; Ванек З., Вінтер В. Процеси регуляції при поділі, споруляції та синтезу метаболітів у мікроорганізмів. *Мікробіол.журн.* 1977. Т. 39, N 1. С. 683-695; Verachedu V. R. & Setlow P. Role of SpoVA proteins in release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by dodecylamine or lysozyme. *J. Bacteriol.* 2007. № 189. P. 1565–1572.

ферментів (мутанти) проростання або не настає, або здійснюється частково⁵⁴. Багатоступінчастість проростання, включно з тригерною реакцією, підтверджується наступним прикладом: D-аланін пригнічує L-аланінову ініціацію у *V.cereus* тільки в тому разі, якщо його додавати до або разом з L-аланіном, але не впливає при внесенні в середовище після L-аланіну⁵⁵.

При цьому, останній виділяється в навколишнє середовище, звільняючи тим самим цитоплазму спори⁵⁶. В індукції проростання певна роль належить ДПК, оскільки спори з малим вмістом ДПК проростають значно гірше, а додавання ДПК відновлює здатність проростати⁵⁷. Припускається, що необхідний якийсь пороговий рівень ДПК для порушення дримаючого стану⁵⁸. Важливим є також факт, що ДПК вивільняє споролітичний фермент з уламків спори, до яких він прикріплений. Хелатні комплекси ДПК з катіонами, що беруть участь у забезпеченні спочиваючого стану, доволі інтенсивно екскретуються під час проростання⁵⁹.

Важлива роль іонів у реакції проростання, їхній вплив на стан спорової протоплазми підтверджується низкою експериментів. Невеликі зміни проникності спори можуть спричинити проникнення іонів та інших молекул, необхідних для активації деяких спорових ферментів, у тому числі літичних⁶⁰.

54 Ванек З., Вінтер В. Процеси регуляції при поділі, споруляції та синтезу метаболітів у мікроорганізмів. Мікробіол. журн. 1977. Т. 39, N 1. С. 683–695.

55 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P.85-123; Keynan A. Criptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // Spore V: Am. Soc.Microbiol. 1972. P.355-362; Setlow B., Cowan A. E., Setlow P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. J. Appl. Microbiol. 2003. № 95. P. 637–648.

56 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P. 85–123.

57 Setlow B., Cowan A. E., Setlow P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. J. Appl. Microbiol. 2003. № 95. P.637–648; Keynan A. Criptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // Spore V: Am. Soc.Microbiol. 1972. P.355-362; Paidhungat M., Ragkousi K., Setlow P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca^{2+} -dipicolinate. J. Bacteriol. 2001. № 183. P. 4886–4893.

58 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P.85-123; Setlow B., Cowan A. E., Setlow P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. J. Appl. Microbiol. 2003. № 95. P.637–648; Keynan A. Criptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // Spore V: Am. Soc. Microbiol. 1972. P. 355–362.

59 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P.85-123; Keynan A. Criptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // Spore V: Am. Soc.Microbiol. 1972. P.355-362; Paidhungat M., Ragkousi K., Setlow P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca^{2+} -dipicolinate. J. Bacteriol. 2001. № 183. P.4886 –4893.

60 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P.85-123; Keynan A. Criptobiosis: a review of the mechanisms ametabolic state in bacterial spores // Spore V: Am. Soc.Microbiol. 1972. P.355-362; Paidhungat M., Ragkousi K., Setlow P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca^{2+} -dipicolinate. J. Bacteriol. 2001. № 183. P. 4886–4893.

Підбиваючи підсумок аналізу зазначених факторів та гіпотез, можна констатувати наступне. Хімічний ініціатор дає старт ряду метаболічних реакцій, в результаті чого звільнюється дипіколоїнова кислота⁶¹. Отання хелює катіони, що забезпечують стан цитоплазми, що покоїться, а також може активувати споролітичні ферменти, що руйнують пептидоглікан кортексу. Хелати ДПК та продукти распаду пептидоглікану екскретуються, а проникність спори значно зростає. Проте, як і раніше, залишається загадковим пусковий механізм проростання, власне природа первинного поштовху.

2.4. Виростання спор

Активация та ініціация, описані вище, це процеси розкладання, відповідальні за припинення криптобіотичного стану спори⁶². В результаті проростання утворюється метаболізуюча клітина, яка хоч і зберігає деякі властивості спори, наприклад, має типову для спори форму оболонки, ферменти, але набуває ряд нових властивостей, зокрема, стає менш стійка до зовнішніх впливів, не рефрактильна, легко забарвлюється. Якщо така клітина перебуватиме в середовищі, що містить воду і необхідні їй поживні субстрати, вона інтенсивно поглинатиме їх і почнеться виростання. Виростання – це ростовий процес, протягом якого ініційована спора перетворюється на типову вегетативну клітину. Він характеризується активним синтезом нових макромолекул, особливо РНК і білка, формуванням клітинної стінки та інших нових структур⁶³.

Найбільш ранньою морфологічною ознакою, що розмежовує проростання та виростання, є набухання спори. Набухання може інгібуватися специфічними інгібіторами, що не впливають на проростання та наступні за набуханням етапи виростання⁶⁴. У результаті інтенсивної гідратації

61 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P.85–123.

62 Ibid.

63 Gould G.W., Hurst A. The bacterial spore. / London-New York: Acad. Press. 1969. 715 p.; Дорошенко Е.В., Лайко Н.Г., Мулюкин А.Л. Биоразнообразие покоящихся форм микроорганизмов / Материалы школы-конф. «Горизонты физ.-хим. биологии». – Пушино. 2000. Т.1. С.195-196; Yu B., Kanaan J., Shames H., Wicander J., Aryal M., Li Y, Korza G., Brul S., Kramer G., Li Y.Q., Nichols F.C., Hao B., Setlow P. Identification and characterization of new proteins crucial for bacterial spore resistance and germination. Front Microbiol. 2023. № 14. P.1161-1164; Paredes-Sabja D., Setlow B., Setlow P., Sarker M.R. Characterization of Clostridium perfringens spores that lack SpoVA proteins and dipicolinic acid. J. Bacteriol. 2008. № 190(13). P.4648-59; Setlow P.J. Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. J.Appl. Microbiol. 2006. № 101(3). P. 514-25. doi: 10.1111/j.1365-2672; Мулюкин А.Л., Дорошенко Е.В., Лайко Н.Г. и др. К вопросу о механизмах анабиоза микроорганизмов / Материалы шк.-конф. «Горизонты физико-химической биологии». Пушино. 2000. Т. 2. С. 104–105.

64 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P.85-123; Paredes-Sabja D., Setlow P. & Sarker M. R. Germination of

серцевини об'єм клітини збільшується у 2–3 рази порівняно з розмірами спори у стані спокою. Стадія набухання, наприклад, спор *B.subtilis* виникає через 30 хвилин⁶⁵. До цього часу в покритвах спор з'являються розриви, кортекс зменшується, а навколо серцевини починає потовщуватися клітинна стінка. Надалі, покритви деградують, а набрякла серцевина займає ділянку кортексу.

Під час проростання спори, як зазначалося вище, значна частина пептидоглікану кортексу руйнується й екскретується в навколишнє середовище, а залишки розташовуються між цитоплазмою та покритвами спори. Дослідження долі кортекса, міченого радіоактивним вуглецем, показало, що продукти розпаду муреїну можуть бути використані для синтезу нової клітинної стінки, формування якої починається на етапі набрякання. Утворення функціональної клітинної стінки, здатної стабілізувати спорову цитоплазму, відбувається протягом наступних, приблизно, 40 хвилин.

Серцевина, що набрякає, створює тиск на внутрішній і зовнішній покритви спори, що призводить до їхнього розриву і виходу вегетативної клітини. Екзоспориум при цьому не є суттєвою перешкодою. При дослідженні виростання *B.acidocaldarius* було описано таку послідовність подій, що відбувалися при цьому. У внутрішній оболонці спори з'являвся обмежений вузький розрив. Цитоплазма впритул прилягала до області цього розриву, що призводило до розчинення спочатку внутрішньої, а потім зовнішньої оболонки і виходу клітини⁶⁶. Таким чином, автори вважають, що в цього мікроорганізму вихід клітини відбувається не шляхом розриву оболонки спори, а шляхом обмеженого ферментного розчинення.

Якщо умови для росту оптимальні, то вихід клітини відбувається через 50–60 хвилин, а потім настає наступний етап зовнішнього росту – подовження. Залежно від виду мікроорганізмів оболонка спори під час

spores of Bacillales and Clostridiales species: Mechanisms and proteins involved. Trends Microbiol. 2011. № 19. P.85–94; Paredes-Sabja D., Bond C., Carman R. J., Setlow P., Sarker M. R. Germination of spores of *Clostridium difficile* strains, including isolates from a hospital outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). Microbiology. 2008. №154. P.2241–2250; Santo L.Y., Doi R.H. Ultrastructural analysis during germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. J. Bacteriol. 1974. Vol.120, №1. P.475–481; Strange R.E., Hunter J.R. Outgrowth and the synthesis of macromolecules. /In: The bacterial spore / Eds. G.W.Gould, A.Hurst / London-New York: Acad. Press. 1969. P. 445–483.

65 Santo L.Y., Doi R.H. Ultrastructural analysis during germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. J. Bacteriol. 1974. Vol.120, №1. P. 475–481.

66 Handley P.S., Knight D.G. Ultrastructural changes occurring during germination and outgrowth of spores of the thermophil *Bacillus acidocaldarius*. Arch. Microbiol. 1975. Vol. 102, N 2. P. 155–161; Clauwers C., Vanoirbeek K., Delbrassinne L., Michiels C. W. Construction of nontoxicogenic mutants of nonproteolytic *Clostridium botulinum* NCTC 11219 by insertional mutagenesis and gene replacement. Appl. Environ. Microbiol. 2016. № 82. P. 3100–3108.

виростання може або залишатися, або поглинатися клітиною⁶⁷. Залишки оболонки спори довгий час можуть бути прикріпленими до подовженої клітини, а на ранніх етапах зовнішнього росту вони здатні виконувати захисну функцію, наприклад, запобігати антибіотиковій блокаді синтезу клітинної стінки. Приблизно через одну годину у рухливих форм можна спостерігати утворення джгутиків. Під час виходу клітини та подовження спостерігався поділ хроматинових тіл, і якщо умови зовнішнього росту залишалися сприятливими, то через 1,5–2,5 години відбувався поділ клітини, а потім і подальше розмноження.

Динаміку виростання, подальшого росту і розмноження суспензії мікроорганізмів можна вивчати методом вимірювання оптичної щільності, яка поступово збільшується. У зв'язку з цим виникає необхідність синхронізувати розвиток культури, але навіть в ідеальному варіанті синхронізація вдається тільки протягом кількох поколінь. Тому для вивчення процесів виростання та розмноження вельми доцільно розробити такі методи мікрокультивування із застосуванням фазово-контрастної та інтерференційної мікроскопії, які дозволяли б простежити долю окремих особин популяції.

Вимоги до умов культивування на стадії виростання здебільшого такі самі, як і за вегетативного росту, але іноді вони можуть бути специфічними. Слідом за набуханням, виходом клітини та подовженням збільшувалася інтенсивність дихання і, на відміну від стадії ініціації, клітина ставала чутливішою до відсутності кисню. У ході виростання відбувалося послідовне збільшення кількості ферментів, а також поява нових, характерних для вегетативної клітини⁶⁸.

Синтез РНК і білка, як і раніше, випереджав синтез ДНК, який можна було зареєструвати приблизно тільки через годину після початку проростання⁶⁹. Послідовний і впорядкований синтез білка контролювався транскрипцією, що призводило до своєчасної появи різних видів іРНК. Припускається, що

67 Strange R.E., Hunter J.R. Outgrowth and the synthesis of macromolecules. /In: The bacterial spore / Eds. G.W.Gould, A.Hurst / London-New York: Acad. Press. 1969. P. 445–483.

68 Weedmark K. A. et al. Clostridium botulinum group II isolate phylogenomic profiling using whole-genome sequence data. Appl. Environ. Microbiol. 2015. № 81. P.5938–5948; Weedmark K. A. et al. Clostridium botulinum group II isolate phylogenomic profiling using whole-genome sequence data. Appl. Environ. Microbiol. 2015. № 81. P.5938–5948; Thaskray P.D., Behravan J., Southworth T.W., A.Moir GerN an antiporter homologue important in germination of Bacillus cereus endospores. J. Bacteriol. 2001. Vol. 183, N 2. P. 476–482.

69 Strange R.E., Hunter J.R. Outgrowth and the synthesis of macromolecules. /In: The bacterial spore / Eds. G.W.Gould, A.Hurst / London-New York: Acad. Press. 1969. P. 445–483.

транскрипція контролювалася змінами в РНК-полімеразі, яка перебувала в спочиваючій спорі і функціонувала в процесі її проростання⁷⁰.

Таким чином, перетворення спочиваючої спори на первинну вегетативну клітину складалося з трьох послідовних і впорядкованих у часі стадій: активації, ініціації та виростання. Остання стадія складається з етапів набрякання, виходу клітини, подовження до розмірів типової вегетативної клітини і закінчується в момент її поділу. Перші дві стадії, на думку Кейнан А. відповідальні за закінчення криптобіотичного стану, за активацію реакцій, що дають початок процесам розвитку та диференціації, а виростання є власне процесом диференціації⁷¹.

Проросла спора володіє широким діапазоном можливостей до диференціації і за відповідних умов може давати потомство вегетативних клітин, здатних перетворитися на нові спори або утворити цистоподібні клітини.

Анітрохи не применшуючи значення поділу, якому присвячено багато спеціальних оглядів⁷², як однієї з найскладніших функцій клітини, нам видається доцільним проаналізувати тут процес спороутворення, яким завершується життєвий цикл розвитку, а продукт якого (спора) слугує початком нового циклу розвитку. Зробити це необхідно тому, що, як і раніше, залишається незрозумілим місце і значення спори і спороутворення в долі мікроорганізму, з одного боку, а з іншого – найбільш дискусійним є питання про можливість перетворення на спору первинної вегетативної клітини. Вони будуть розглянуті нами в наступній роботі.

70 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P. 85–123.

71 Keynan A. The transformation of bacterial endospores into vegetative cells / Microbial. differentiation: 23 symposium soc. gen. microbiol. Cambridge univ. press. 1973. P. 85–123.

72 Евгеньева Т.П. Межклеточные взаимодействия и их роль в эволюции. М.: Наука, 1976. 224 с.; Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. “Quorum sensing”, или как бактерии “разговаривают” друг с другом. Молекул. биол. 2001. Т. 35, № 2. С. 268-277; Sidashenko O. I., Voronkova O. S., Sirokvasha E. A., Vinnikov A. I. Biofilm as a Special Form of Bacteria and its Role in Infectious Processes. Herald of problems of biology and medicine. 2013. Volume 2 (103). P.36-41; Олексин А.В., Ботвиненко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов. Микробиология. 2000. Т. 69, № 3. С.309-327; Мулюкин А.Л., Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г. и др. К вопросу о механизмах анабиоза микроорганизмов. Материалы шк.-конф. “Горизонты физико-химической биологии”. Пушино. 2000. Т. 2. С. 104-105.