

Биополимеры и клетки в измерении архитектуры микроценозов. 1. Феноменология

В. А. Кордюм, С. П. Шпилевая, Е. В. Мошинец, Н. И. Адамчук-Чалая¹,
Д. И. Иродов, В. И. Андриенко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

¹Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины
Ул. Терещенковская, 2, Киев, Украина, 01601

moshynets@gmail.com

В настоящее время представления о микробных ценозах и о состоянии клеток и биополимеров в них быстро изменяются. Наряду с традиционными взглядами стремительно развивается качественно новое направление, связанное с обнаружением в природных субстратах и живых организмах самореплицирующихся объектов невирусной природы, размер которых меньше минимальной теоретически возможной клетки. Приведены и проанализированы материалы традиционных на сегодня и новых направлений исследований.

Ключевые слова: микроорганизмы, микробный ценоз, нанобактерии, почва.

Введение. Мир живого по своей сложности необычен во всех отношениях. Чем больше о нем накапливается информации, тем больше неизвестного. Чем на более высокую степень исследований выходят благодаря все новым и новым поколениям технических совершенств, тем более глубокие уровни обнаруживаются в виде очередного этапа неизвестного. Чем больше открывается возможностей вмешиваться в живой мир, тем выше понимание потенциальных и реальных угроз от такого вмешательства. И так – во всем. «А хочется чего-нибудь такого». И занимаются поэзией биологии – структурно-функциональной организацией ядра, высшей нервной деятельностью, мышечным сокращением, сигнальными путями, механизмами эмбриогенеза и всем таким прочим. Очень хорошо оно зву-

чит. А как единое целое живое становится все более трудным для понимания.

Но есть и другой полюс – максимально простое среди всего максимально сложного. Этим полюсом являются прокариоты. Не потому, что они простые, а потому, что эукариоты, тем более высшие, еще сложнее. И в то время, когда от биохимии и общей генетики наметился переход к молекулярной биологии и молекулярной генетике, начинали с прокариотов и их самых простых (известных на то время) генетических партнеров – бактериофагов. Живой мир при всем его разнообразии удивительно един. Самая простая бактерия, риккетсия, микоплазма – тоже клетка. И ее клеточное строение, ее сигнальные, биологические, энергетические и прочие системы эволюционировали столько же миллионов лет, сколько и вся биосфера. Как – это уже другой вопрос. Но по степени совершенства все эти «простейшие клетки» для своих экологических ниш –

венец творения. Общего у таких прокариотов с клетками высших эукариотов оказывается неправдоподобно много.

Так, геном нашего самого что ни есть обычного прокариотного комменсала – кишечной палочки – по количеству структурных генов всего-то лишь в 10 раз беднее, чем у человека, – «венца творения», «разумного центра Вселенной» и т. д.

Нельзя сказать, что изучению прокариотов уделяют мало внимания. Отнюдь. И публикаций, в которых фигурирует *Escherichia coli*, возможно, не меньше, чем научных статей, посвященных *Homo sapiens*. Но изучается все это очень уж своеобразно. Мир живого обитает в естественных просторах Земли. А изучают его на молекулярном уровне почти исключительно в лабораториях. И если для высших эукариотов это достаточно близко к реалиям (взяли «кусочек» индивидуума – сосны, обезьяны, кита и т. д. и тут же, или предварительно заморозив, перенесли в лабораторию), то для микромира все несоизмеримо сложнее. В то же время понять, познать «начала» живого становится уже абсолютно необходимым для того, чтобы разобраться с «верхними этажами» уровней организации жизни.

В пятом номере журнала «Биополимеры и клетки» за 2008 год опубликована наша вводная статья по этой проблеме. В ней приведена разработанная технология, которая, так же как и для высших эукариотов, позволяет «отщипнуть» кусочек неповрежденного в своей архитектуре микроценоза любого природного субстрата в любой точке Земного (а если понадобится бы, то и внеземного) пространства, изготовить для конкретного исследования (заморозить, зафиксировать, высушить и т. д.) и перенести в лабораторию для анализа всем арсеналом науки. В самом общем виде определено направление, область неведомого (и не более того). Теперь, когда первые контуры такой особой области (эко-био-генно-молекулярно- и т. д.) обозначены, посмотрим же, какие в ней необычности, проблемы, выходящие за рамки общепринятого, «имеют место быть». Даже с учетом того, что необычное сегодня стало нормой повседневности. И осуществить такое «посмотрим» именно на уровне биополимеров и клеток для того, чтобы обеспечить совмещение выходящего за все рамки с рамками известного.

Начиная с последней четверти прошлого столетия, очень круто, «вдруг», «сразу», «взрывообразно» (и т. д.) начали меняться наши представления о живом мире. Живой мир остался, конечно же, таким, каким был и ранее (в основном и пока еще). Но волны новых данных размывали старые понятия и очень быстро, буквально «впопыхах» создавались новые воззрения, концепции, теории, в свою очередь, меняющиеся (и опять радикально) каждые 5–7 лет.

Такие изменения взглядов постепенно вошли и в те науки, которые изучают микромир живого (микроорганизмы) в их природном обитании – в почве, воде, иле, на поверхности и внутри растений, человека, животных и т. д. В конце концов, трансформация представлений оказалась на таком уровне радикализма, что стала психологически все менее и менее воспринимаемой. Хотя длительное время все было относительно спокойно и вполне добропорядочно.

Микроорганизмы – понятие, принимаемое теоретически и используемое практически, согласно которому конкретные объекты, относящиеся к этой группе организмов, включаются в нее только по критерию величины. Поэтому к ним относят (по размерам) и эу-, и прокариоты. Но все они являются клетками со всеми обязательными атрибутами клетки: мембрана, генетический материал в виде ДНК, рибосомный синтез белка и т. д. Клетки как клетки. Ну маленькие очень, ну очень просто организованы, но все равно клетки. Левенгук их впервые описал, Кох научился их индивидуализировать в виде колоний (потомств одной клетки) на твердых питательных средах, Виноградский их визуализировал в природных субстратах (стекла обрастания). После того как основополагающие методы были созданы, началось плавное, спокойное развитие знаний, накопление экспериментального материала, восхищение ролью микроорганизмов в Природе, сопровождаемое возмущением и борьбой при некоторых «вредных» проявлениях (болезни, порча продуктов), и все такое прочее. Очень хорошо тогда было. Ни обнаружение все новых и новых «физиологических групп», ни сложности систематики, ни ставшее почти бесконечным разнообразие пропицей питательных сред, ни все остальное не смогло

поколебать устойчивости «поступательного развития». Первые признаки интеллектуальной неуютности в области изучения микроорганизмов в природе появились примерно в середине прошлого столетия в связи с созданием и достаточно широким введением в лабораторную практику новых поколений методов исследования (электронная микроскопия, техника фракционирования, спектрометрия и т. д.). Тогда впервые относительно полно определили («прямым подсчетом» в природных субстратах) количество образований, которые по форме и размерам соответствовали устоявшимся представлениям о том, что они «клетки». И сравнили подсчитанное с тем, что выросло (из тех же субстратов) на питательных средах (и благодаря этому хоть как-то изучалось). Результаты сравнения оказались очень неприятными. Только одна сотая процента обнаруживаемого непосредственно в субстратах выростала в лабораториях [1]. Это значило, что лишь один представитель микромира из каждых 10000 в нем обитаемых был известен науке. А остальных 9999 не знали ничего. Вообще ничего. И знать не могли, так как в лаборатории они не росли. Если бы только прокариотов.

Содержание генетических партнеров микроорганизмов неклеточной природы, например вирусов, при определении их количества в природных субстратах прямым счетом под электронным микроскопом оказалось на семь (семь!) порядков выше, чем считалось традиционно, т. е. определялось традиционными методами по определению зон лизиса [1, 2]. А тут еще появились картинки «редких форм», которые по своему внешнему виду и вписать ни в какую природную структуру микроценозов не представлялось возможным. Да и для того чтобы понять, как такие невероятные по своим очертаниям «редкие формы» (одна клетка, да еще относящаяся к прокариотам) вообще могли образовываться, не хватало никакой фантазии. Ибо столь сложные пространственные образования неизбежно должны были проходить весьма сложный морфогенез и, пройдя его, каким-то образом поддерживать такую удивительную пространственную конфигурацию (более сложную, чем у многих одноклеточных эукариотов). Поэтому все подобные исследования описывали только как феноменологию

и сопровождалась они пояснениями типа того, что со временем научиться все это выращивать в лаборатории, хорошо изучат, тогда поймут и все такое прочее. Позднее из этого самого «со временем» кое что выделили в культурах, внешне описали, назвали «необычным» и тем ограничились. Объяснений же и «со временем» не дали. Да и дать не могли – ну как объяснить квадратную форму при очень малой (даже для бактерий) толщине [3, 4]? Или бактерию треугольной формы [5]? Плоскую, имеющую форму шестиугольной звезды с радиальной симметрией [6]? Бактерию с очень тонкими (0,15–0,40 мкм), длинными разветвленными нитями («шнурками»), да еще разного цвета [7]? И еще много чего.

Но уже в то время при подобных подсчетах и сравнениях обнаружили одну интересную особенность, которую вообще не рассматривали. Слишком уж взрывоопасным потенциалом она обладала. Особенность эта заключалась в том, что с чем большим разрешением проводили прямой подсчет, тем при последующем сравнении большей была разница между общим количеством микроорганизмов в субстрате и тем, которое росло в лабораториях на питательных средах. С применением обычных оптических микроскопов со стандартной оптикой – 99 % [8]. При использовании первых электронных микроскопов с относительно низким разрешением – 99,9 %. С помощью оптики высокого разрешения и очень тщательном приготовлении материала – 99,99 %. Из этого следовало, что основной микромир живого находится в области размеров меньше тех, которые для него «приняты». И как совместить «объективную реальность» с «представлениями» о ней, было абсолютно непонятно. Только значительно позднее, много лет спустя на это обратили внимание и отметили, что основная часть микромира живого находится в нетрадиционно мелкой шкале размеров, хотя формально еще и допускающей клеточное строение [9]. Ниже мы к этому вернемся.

И фактически с середины прошлого столетия наука о микромире живого (и соответственно представления о нем) начала раздваиваться. Инерция мышления и естественное для людей желание «спокойной жизни» обеспечивали традиционное развитие. Конечно же, все происходило с учетом непре-

рывно обновляющихся методических возможностей, с привлечением новых основополагающих концептуальных общепарадигм, с накоплением быстро нарастающих массивов «последующих» (на каждый момент времени) данных и т. д. Но все полученные результаты обобщали и укладывали в рамки традиционных представлений. Одновременно шло накопление и взрывоопасного (для привычных взглядов) материала. До поры до времени это накопление проходило без особых обобщений и анализа, в основном только как феноменология. Рассмотрим оба эти направления.

Традиционно (даже при использовании самых современных методов) микрожизнь в естественных субстратах изучали «обобщенно». Отсутствовали технологические возможности анализа нетронутых и индивидуализированных микроценозов в их естественной архитектуре, т. е. в том виде, в той пространственной организации, в котором все «микро-» реально живет в природе, взаимодействует, функционирует и т. д. Для того чтобы «достать» из субстрата и сделать доступным для изучения то, что в нем находится, его архитектуру надо было нарушить (разбить, размешать, растереть, диспергировать, расфракционировать и т. п.). Поэтому архитектуру микроценозов определяли не экспериментально, а «представляли». Делалось это по аналогии с чем-то, что считалось «близким», при помощи часто применяемого «метода экстраполяции». Соответственно с изменениями представлений в смежных областях исследований, на которые проводили такую экстраполяцию, менялись представления и о пространственной структуре микроценозов естественных субстратов.

Вначале (первая половина прошлого столетия) считали, что микроорганизмы «просто» распространены в субстратах. Затем (вторая половина прошлого столетия) перешли к представлениям о микрозонном их распределении. Принимали как реальность, что существовать микроорганизмы в природе могут только плотными микроколониями, состоящими из идентичных (в каждой такой микроколонии) клеток (вид, популяция, представленная одной экологической формой, клон и т. д.). Полагали, что они противостоят таким образом и неблагоприятным внешним факторам, и конкуренции

других видов. В конце прошлого столетия начали допускать смешанные, но все равно компактные микрозоны. А после того, как в доступных для изучения техногенных и некоторых природных материалах обнаружили сложноорганизованные коллективные структуры, получившие название «биопленок», пришли к выводу, что и в природных субстратах микроорганизмы также существуют в виде биопленок.

Для понимания того, что происходит в природных условиях «на самом деле», нужна технология, обеспечивающая доступ к архитектуре микроценозов в их ненарушенном состоянии. Нами создана такая технология и описаны первые результаты, полученные при ее опробовании [10]. Условия реализации этой технологии очень четко ограничены операционными рамками, исключая «случайность». То, что становится доступным изучению, представляет собой ненарушенную (и только ненарушенную) пространственную организацию всего того, что имеется в микроценозах. По самой процедуре в процессе манипуляций не может быть случайных, самопроизвольных «добавлений» в виде налипших извне клеток, минеральных частиц, органических остатков и т. д. Этим исключаются артефакты. В итоге получают данные, характеризующие реальную архитектуру микроценозов. Результаты экспериментов по критерию новизны и необычности можно разделить (только условно) на прогнозируемые и неожиданные.

Архитектура микроценозов, как и следовало полагать, оказалась в высокой степени динамичной и определялась многими параметрами – самим субстратом, корневой системой растений, расположением изучаемого участка субстрата в общем пространстве субстрата, временем формирования микроценоза (от начала формирования до момента анализа), длительностью его существования, температурой, влажностью и т. д. В зависимости от сочетаний условий менялась архитектурная композиция микроценоза. Возможно, предметом отображения, описания, анализов таких архитектурных композиций мог бы стать некий «Атлас архитектуры микроценозов», составленный для разных субстратов в разное время их изучения, при разных внешних воздействиях на них и т. п. Пока его нет.

Поэтому здесь приведем лишь «архитектурные элементы» подобных композиций как основных его составляющих и только в некоем общем виде, именно как отдельные «элементы», которые в таком «общем виде» достаточно универсальны.

Прямыми наблюдениями показано, что на уровне как архитектурных композиций микроценозов, так и их отдельных элементов, существующих в нарушенном состоянии, т. е. в реалиях, картина практически ни в чем не совпадает с «существующими представлениями». Как она выглядит в случае субстрата, наиболее часто фигурирующего в литературе, – почвы, в предыдущей публикации [10] описано подробно. Для цельности изложения повторим это здесь в тезисном виде.

Первой неожиданностью стали достаточно часто и широко представленные «россыпи» клеток, находящихся не в тесных скоплениях, а расположенные достаточно далеко одна от другой (на расстояниях нескольких таких виртуально проецированных клеток, взятых по длинной оси). Почему так и какие силы (отрицательный тропизм?) обеспечивают подобное распределение, пока объяснить невозможно и приходится ограничиваться лишь чистой феноменологией.

Второй неожиданностью стало практически полное отсутствие биопленок (в их современном понимании). Скопления из разных клеточных построений имеются в изобилии, но организационно это носит у них совершенно иной характер. В отличие от биопленок они представлены двумя иными, чем биопленки, структурами. Одни из них могут быть охарактеризованы как «открытые зоны», в которых клетки собраны относительно компактно, но без общей слизистой капсулы. Вторые – «закрытые зоны» – имеют общую капсулу. Но это капсула, а не сложноорганизованное плотное слизистое образование (как в случае биопленок), в которое включены бактерии. Кроме того, само расположение бактерий в микроценозах в таких общих капсулах часто весьма рыхлое, а иногда и вообще локальное (бактерии находятся только в небольшом участке обширной капсулы). При этом, если судить по форме и размеру клеток, как открытые, так и закрытые зоны могут быть однородными (возможно, за счет того, что представлены одним видом), а могут быть

и весьма гетерогенными. Типичные же биопленки в почве встречаются, скорее, как исключение.

Необычно (если исходить из традиционных представлений) выглядят и обрастания как минеральных частиц, так и органических (остатки корешков растений). На них тоже чаще всего отсутствует плотный сплошной (или дискретно-сплошной, т. е. в скоплениях) рост микроорганизмов. Довольно странным было и то, что объектами обрастания могут служить и сами закрытые зоны, на поверхности которых часто находятся бактерии.

Форма бактерий в архитектуре микроценозов, как правило, обычная. Но уж если появляется что-то необычное, то трактовать его природу исходя из имеющихся представлений часто очень трудно (даже с большими натяжками и допущениями). Некоторые такие (весьма странные) образования описаны нами ранее и мы к ним еще вернемся. Количество подобных примеров можно существенно увеличить. Но многое вообще не поддается однозначному (живое, неживое, «остатки» и т. д.) толкованию. В частности, на рис. 1, а, представлены так называемые кубические «клетки». Это действительно кубические, очень близкие по форме и размерам образования со стороной куба 1,2 мкм. Первое, что приходит как возможное объяснение при взгляде на них, – это отождествление их с кристаллами. Возможно, так оно и есть. Но очень уж они однородные. На некоторых видны (тоже однотипные) весьма необычные «точки роста» (рис. 1, б, в). Иные (и таких довольно много) находятся в состоянии, очень напоминающем деление бактерии (рис. 2). В 1980 г. Волсби описал квадратные бактерии. Их размеры близки к нашим «кубикам», но у Волсби они плоские. Если сравнить эти «достоверные» бактерии с нашими (рис. 1, 2), то внешнее сходство весьма большое (кроме одной из осей – клетки Волсби плоские).

Еще одним примером могут служить «субстратные звезды». Их обнаружили после очень длительного пребывания полосок нейлона в почве и выглядят они как звездчатые образования в пятне деградации материала (рис. 3). Обращает на себя внимание то, что такие «субстратные звезды» расположены не в виде хотя бы относительно плотных, собранных вместе образований, а распределены на

Рисунки до статті В. А. Кордюма та співавт.

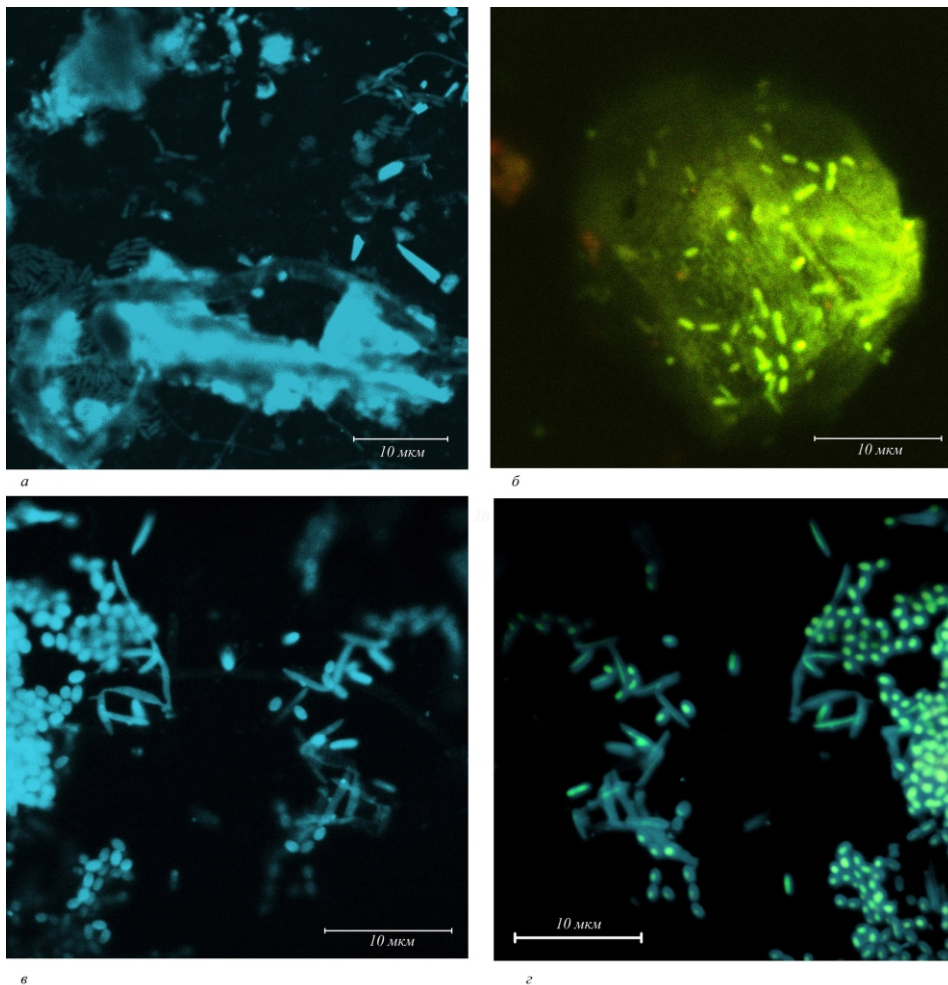


Рис. 4. Почвенный микроценоз. Окраска Hoechst 33342 (а, в, г) и акридиновым оранжевым (б). Конфокальная микроскопия

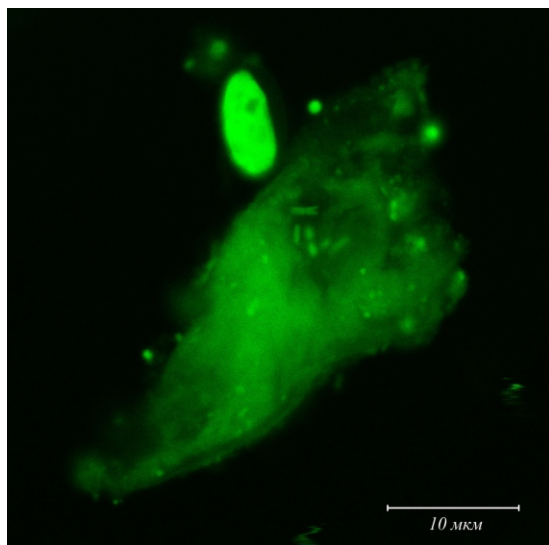


Рис. 5. Почвенный микроценоз. Окраска Syber green. Конфокальная микроскопия

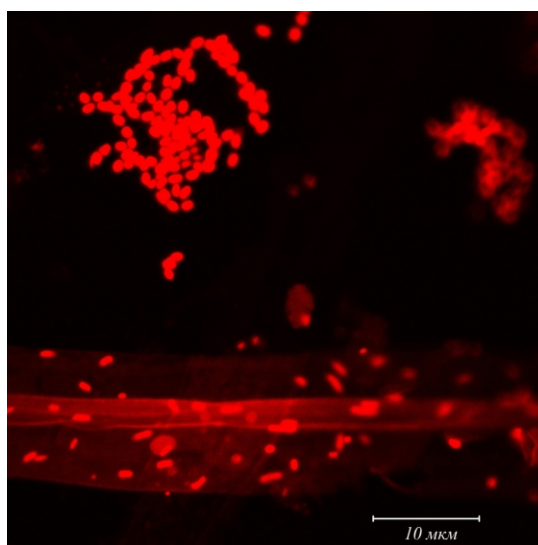


Рис. 6. Почвенный микроценоз. Окраска бромистым этидием. Конфокальная микроскопия

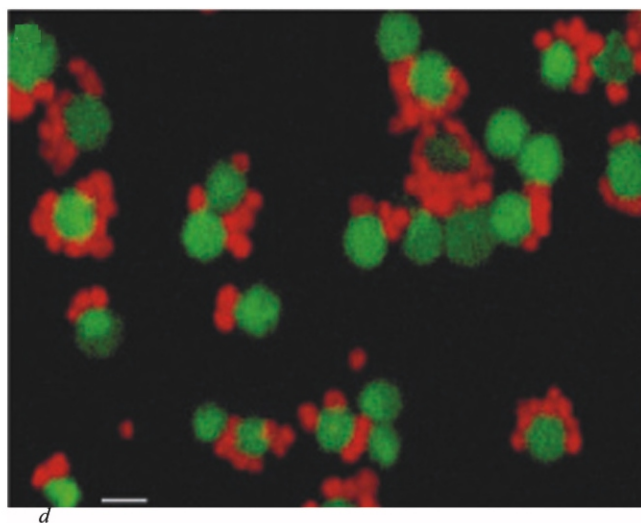
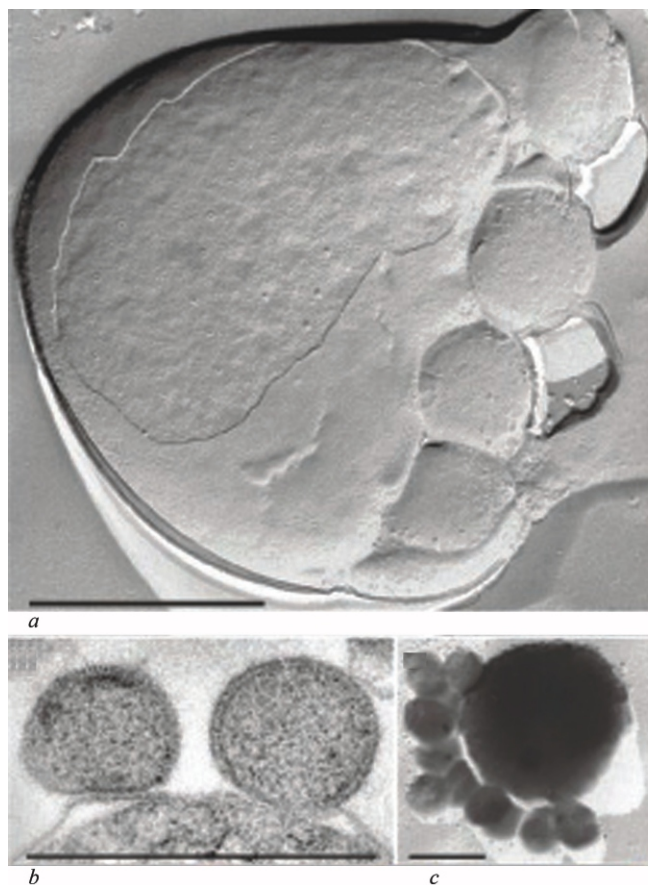
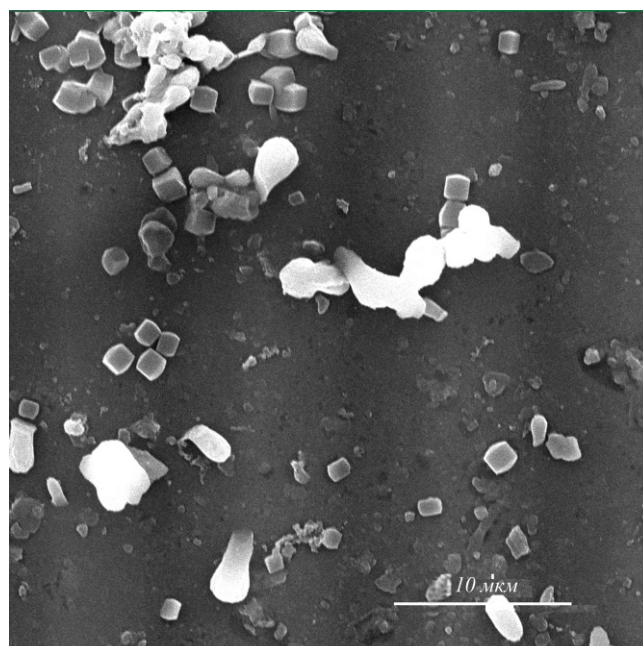


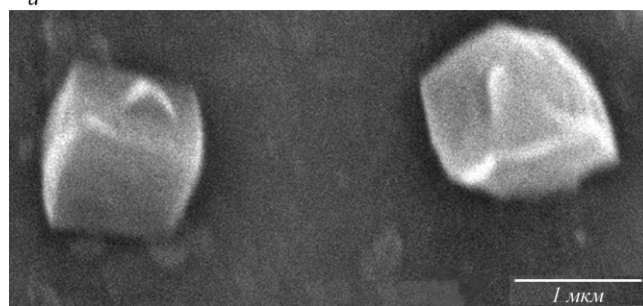
Рис. 7. Электронная микроскопия и флуоресцентная микроскопия *Nanoarchaeum equitans* – *Ignicoccus sp. coculture*: *a* – замороженные клетки *Ignicoccus* и прикрепленные к ним клетки *Nanoarchaeum*, виден кристаллический S-слой с шестилучевой симметрией; *b* – ультратонкий срез двух клеток *Nanoarchaeum*, прикрепленных к наружной мембране *Ignicoccus*; *c* – клетка *Ignicoccus* с несколькими клетками *Nanoarchaeum*, прикрепленными к левой стороне, контрастировано платиной; *d* – гибридизация с SY3-меченной пробой 515mcR (*Nanoarchaeum*) и родамин-меченной пробой (зеленый цвет) CREN449R (*Ignicoccus*). Полоска – 1 мкм. Конфокальная микроскопия [26]



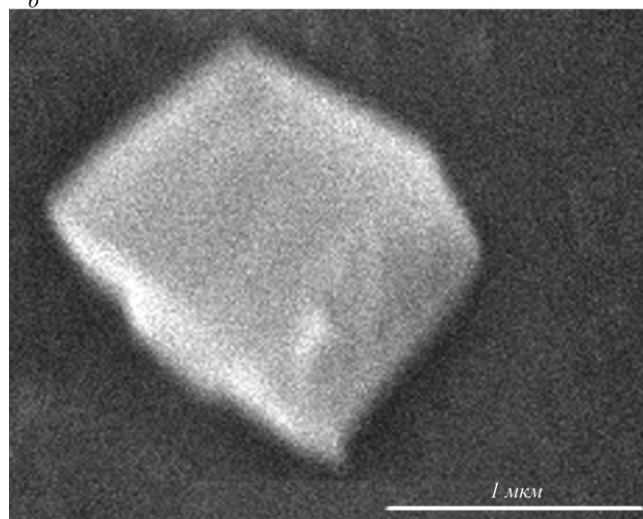
Рис. 15. Минерализованные биопленки, инокулируемые в DMEM, формируются в субкультуре, полученной из человеческой слюны, пропущенной через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Контрольная среда для культивирования – без добавления слюны (слева) и среда для культивирования, инокулированная трехнедельной культурой из отфильтрованной слюны (справа). Оба флакона инкубировали в течение месяца в условиях для культивирования клеток и были наклонены вправо перед фотографированием для лучшей визуализации биопленок (правый флакон) [34]



a



б



в

Рис. 1. Кубические «клетки» из почвенного микробиогеоценоза (*a*) и «точки роста», наблюдаемые на кубических «клетках» (*б, в*). Сканирующая электронная микроскопия

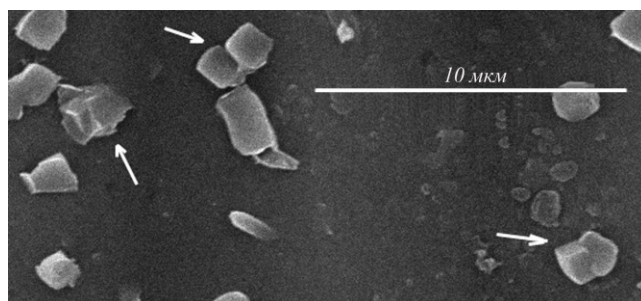


Рис. 2. «Деление» кубических «клеток» (показано стрелками). Сканирующая электронная микроскопия

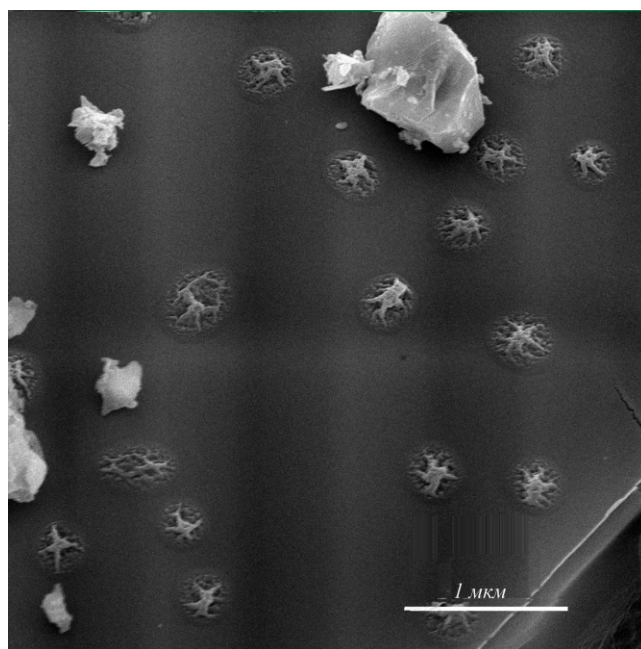


Рис. 3. «Субстратные звезды», появившиеся на лавсане после его экспозиции в почве (лабораторные условия). Сканирующая электронная микроскопия

небольшом (несколько виртуальных диаметров таких пятен) расстоянии друг от друга, хотя и все вместе, на общей площади.

Следующей особенностью подобных необычных образований является то, что по своему виду (по аналогии с известными «редкими» формами) их можно отнести к клеткам. Но исходя из представлений об «органических остатках», кристаллах и т. д. как клетки они не воспринимаются. Это в достаточно острой, явной форме – еще одна особенность архитектуры микроценозов – «что есть что?»

Но самой удивительной является внеклеточная компонента архитектуры микроценозов (те самые «биополимеры»). При любых деструктивных методах извлечения микроорганизмов из субстратов она разрушится (полностью или «до неузнаваемости»). В нетронутой же архитектуре все это сохраняется и становится доступным для анализа. Внеклеточная составляющая может быть, конечно, «какая угодно». Но очень высокий процент ее красится строго специфическими для ДНК красителями (фактически реагентами на ДНК) – Hoechst 33342 и DAPI. Их молекулы специфически укладываются в узкую бороздку ДНК и начинают ярко люминесцировать только после такой укладки. Кроме этих двух красителей, для тонкой идентификации необычного материала использовали и другие, специфически взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами люминесцирующие реагенты Syber green и бромистый этидий. Положительная внеклеточная составляющая Hoechst–DAPI находится на поверхности почвенных частичек, входит в состав капсул «закрытых зон» и для ряда бактерий окружает их клетки. Такая картина визуализирована с помощью всех четырех использованных красителей-реагентов (рис. 4–6, см. вклейку). ДНК как внутриклеточный «полимер» понятен во всех отношениях. Но как внеклеточный, да еще почти вездесущий и обильный он не описан, хотя самих фактов нахождения свободной (внеклеточной) ДНК в природных субстратах в литературе приведено достаточно много. Это все требует особого внимания и будет проанализировано отдельно.

Так организованы микроценозы в природных субстратах, если их архитектуру изучать в нативном виде, а не по разрушительным технологиям. И хотя это очень сильно отличается от «традиционных представлений», тем не менее, на уровне микробиальных клеток в рамках их принятых размеров, на первый взгляд, ничего кардинально меняющего в представлениях о микробиоте природных субстратов не происходит. Не происходит в том смысле, что микроорганизмы в них, судя по «внешнему виду», являются «обычными» клетками. А то, что необычно, можно представить, не вдаваясь в детали, в некоем абстрактно-общем виде как кристаллы, продукты деградации, остатки микро- и макро-

биоты в почве и так далее. Пространственное же их взаиморасположение ранее не изучали и потому никаких противоречий «существующим представлениям» пока нет. Тем не менее, даже общая картина реальной архитектуры микроценозов ни в какие традиционные рамки не укладывается. Не укладывается потому, что она – пространственное строение, а «представления» основаны на разрушительных методах. Надо формировать новые представления. Они могут быть сгруппированы в три блока – «общая» пространственная организация; необычные (но типично клеточные по своим размерам) формы; взаимодействие между клетками в их естественной и ненарушенной архитектуре.

Но анализ реальной архитектуры микроценозов обнаруживает и нечто принципиально необычное, не вписывающееся ни в какие рамки традиционных представлений. В этом плане он смыкается с тем, что является «взрывоопасным» материалом, интенсивно изучаемым и обсуждаемым в настоящее время.

«Взрывоопасный» материал обнаружили и в последние годы стали тщательно исследовать в области, не являющейся традиционной. И вначале все сводилось к неявно сформулированному, но уже возникшему в результате работ с микоплазмами вопросу – где тот предел размеров объекта, который разделяет «живое» и «неживое»?

Типичная бактерия (некий эталон микромира благодаря почти исчерпанной изученности) *E. coli* имеет размер (в некотором «среднем» состоянии) 1,51 мкм, обладает геномом, состоящим из $4,2 \cdot 10^6$ п. н., кодирующим 4000 разных белков. Ее белок-синтезирующий аппарат включает 15000 рибосом, занимающих четверть всего объема клетки. Если перейти только к отдельным макромолекулам и их комплексам, то масса одной рибосомы *E. coli* равна $2,3 \cdot 10^6$ Да, а ее диаметр 20 нм. Диаметр ДНК – 2 нм, а длина генома *E. coli* 1,4 мм, т. е. примерно в 1000 раз превышает по длине «среднюю» клетку [11]. Собственно если все это минимизировать до предела, то и получится минимальный размер живого, меньше которого уже «быть не может». Долгое время самыми малыми известными животными объектами являлись микоплазмы. Для «средней» микоплазмы длиной 0,3 мкм (принимая

чисто условно ее форму шарообразной) объем составит $0,0135 \text{ мкм}^3$. Его неводная часть содержит $1,5 \cdot 10^8$ атомов в имеющихся $1,5 \cdot 10^7$ молекулах мономеров и $3 \cdot 10^4$ молекулах полимеров. Размер генома определяется величиной $5 \cdot 10^8$ Да в виде молекулы ДНК 700 тыс. п. н., кодирующей 600 белков [12].

Самая маленькая микоплазма (из известных) – *Mycoplasma genitalium* – имеет геном размером всего 580 тыс. п. н., состоящий из 468 белоккодирующих генов [13]. А расчетный минимальный геном некой условно-минимальной микоплазмы не может быть меньше 318 тыс. п. н. и должен включать в себя хотя бы 256 генов [14]. По отношению к приведенной выше «средней» микоплазме геном минимальной составит 45,4 %, а количество белков 26,66 %. Примем, что общий объем будет равен некоему среднему (между геномом и белками) этих двух величин – 44 %. Тогда объем «абсолютно минимальной» клетки составит $0,006 \text{ мкм}^3$ и диаметр – 0,228 мкм. В литературе эту величину «ужимают» до диаметра 0,2 мкм. Структура меньше таких размеров клеткой как единицей живого уже быть не может – в ней не уместится все критично необходимое даже в абсолютном минимуме. А уж о бактериях и говорить не приходится – даже самые маленькие, даже паразитические, даже сверхдревние и сверхмаленькие археи имеют более крупные размеры [15].

Так считали достаточно долго. Но затем произошел «взрыв». «Пусковым эффектом» в этом направлении стало сообщение [30], где утверждалась возможность существования живых объектов «наноразмеров». Хотя впервые, как пишут эти авторы, они обнаружили такие сверхмелкие формы еще в 1992 году. Собственно термин «нано-» был использован как дань моде – массовому увлечению нанотехнологиями. Нано – это 10^{-9} . А объекты, представляемые в данной публикации, балансировали на нижней грани размеров 0,1 мкм, т. е. 100 нм. Но старт был дан и очень быстро стали появляться работы, в которых описывали объекты (называемые «живыми») в более широком диапазоне размеров – от нескольких десятков (начиная с 20) до нескольких сотен нанометров. Однако самым существенным, обеспечившим привлечение и внимания, и си-

лы и средств явилось то, что такие нанообъекты были обнаружены у человека при различных патологиях – от камней в почках до СПИД'а [16–21]. И не только обнаружены а, по мнению наиболее радикальных исследователей, они явились этиологическими факторами этих болезней. Более осторожные авторы идентифицировали их как кофакторы патологий. А критически настроенные ученые считали такие нанообъекты лишь сопутствующими образованиями (не имеющими никакой связи с этиологией). Но сам факт наличия подобных «нано-нечто» не отрицал никто. Это очень сильно подогревало интерес и способствовало стремительному росту как числа тех, кто включался в подобные работы, так и количества публикаций с их результатами. Нанообъекты начали находить везде, где искали, – от метеоритов до культур клеток и приписывать им значение от определяющего все на свете (включая атмосферные явления и климат Земли [22, 23]) до полного отрицания как некоего самостоятельного явления и объяснения всего описываемого не более чем «нанофантазиями» [24]. Что же имеет место, судя по анализу литературы, в действительности?

В большинстве случаев (и даже в их основной массе), особенно при изучении природного материала, все суждения («живое–неживое») основаны лишь на внешнем виде объектов (т. е. их микроскопической характеристике) и представлениях авторов, чем считать наблюдаемое. Были и весьма тщательные, высокоинформативные исследования, но их очень мало.

Наиболее детально изучены нанообъекты у человека при различных патологиях. Хотя к нанообъектам, кроме неидентифицируемых с ними (и никак к ним не сводимых), типичных, хорошо изученных этиологически и сопутствующих («классических») микроорганизмов, относили при подобных исследованиях все, что выявляли. Это «все» при «взгляде со стороны» достаточно четко можно разделить на две группы. В одну входят в высокой степени полиморфные объекты, идентифицируемые как «наша» белково-нуклеиновая жизнь. Они очень часто представляют собой обычные бактерии, но очень маленькие (не микоплазмы) и характерной структуры. И все приставки «нано-» в таких вариантах относятся к типично клеточной организации

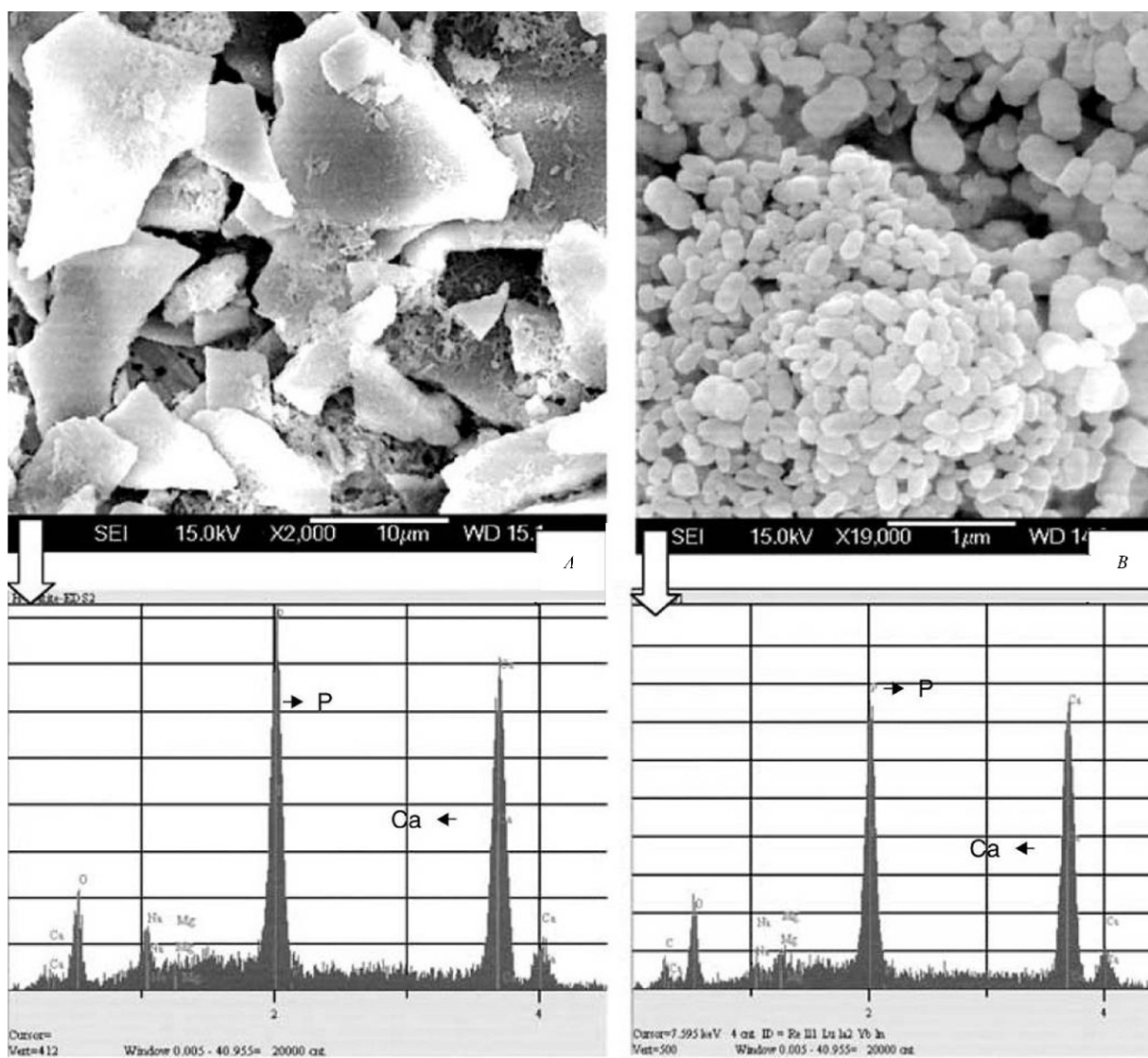


Рис. 8. Пики Ca и P, полученные при анализе гидроксилатапата (*A*) и культуры нанобактерий (*B*). Энергодисперсионная рентгенофлуоресцентная спектроскопия. Изображения сверху получены сканирующей электронной микроскопией [31]

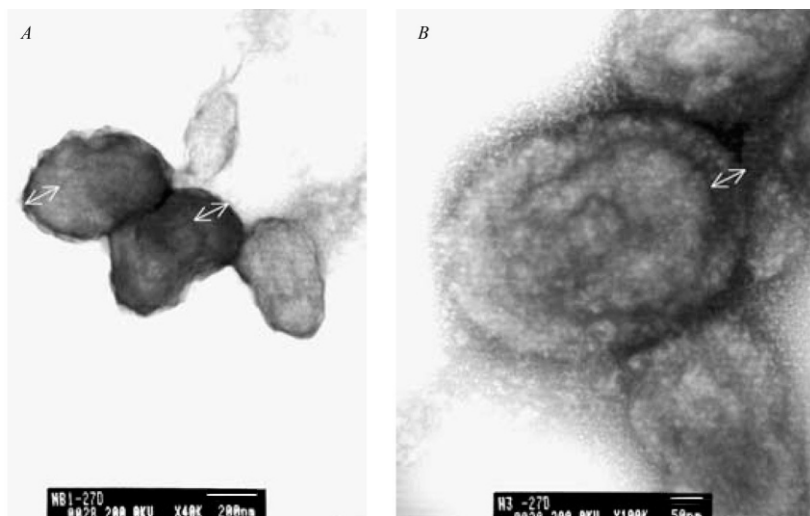


Рис. 9. Трансмиссионная электронная микроскопия нанобактерий, культивируемых в стационарных флаконах (*A*), и в HARV-режиме (*B*). Стрелками показана толщина апатитной клеточной стенки нанобактерии [33]

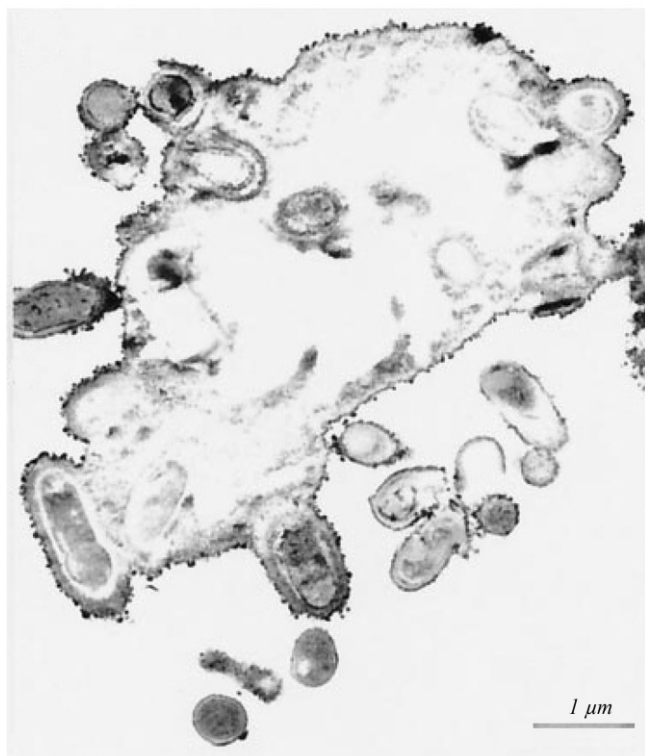


Рис. 10. Нанобактерия, погруженная в апатитный слой после культивирования в течение 3 месяцев. Трансмиссионная электронная микроскопия [30]

вполне допустимых размеров. Такие «нано-» в природе обнаруживают в естественных субстратах в виде свободноживущих форм [25]. Обнаруживаются они и как мельчайшие паразитические «нано-» (рис. 7, см. вклейку) [26]. Иногда же вообще вывод о том, что это «нано-» (при взаимодействии с клетками в культуре тканей, угнетающей их ростобразование), делается скорее «по инерции», так как описываемые формы имеют вполне клеточные размеры [27].

Сложнее дело обстоит в медицине. Но и здесь к нанообъектам во многих случаях такие структуры относят, фактически, только вследствие некой «гетероразмерности» и сопутствующих процессов, связанных с кальцификацией. Микроорганизмы (действительно, очень мелких размеров) образуют вокруг себя настолько мощные отложения фосфатов кальция, что при спектроскопическом анализе они неотличимы от чисто минеральных образований, которые воспроизводили как контроль (гидроксилapatит) (рис. 8). Но при определенном культивировании хорошо видны структуры, соответ-

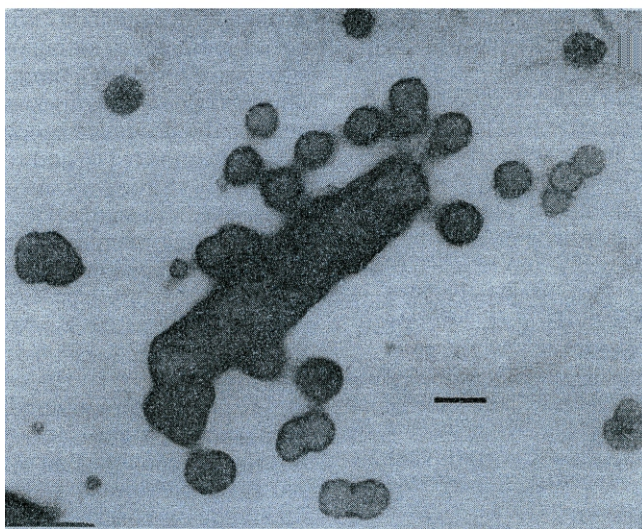
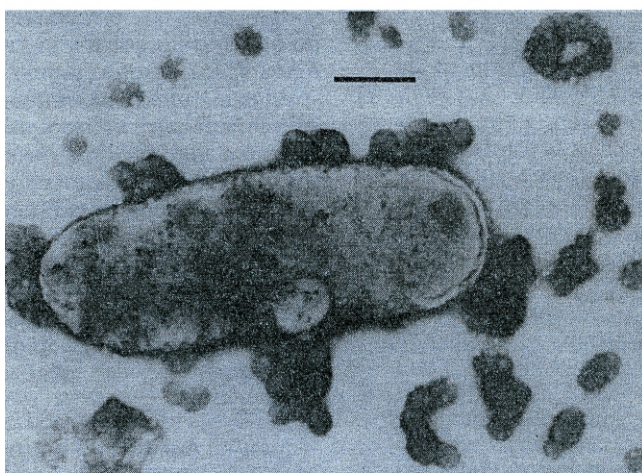
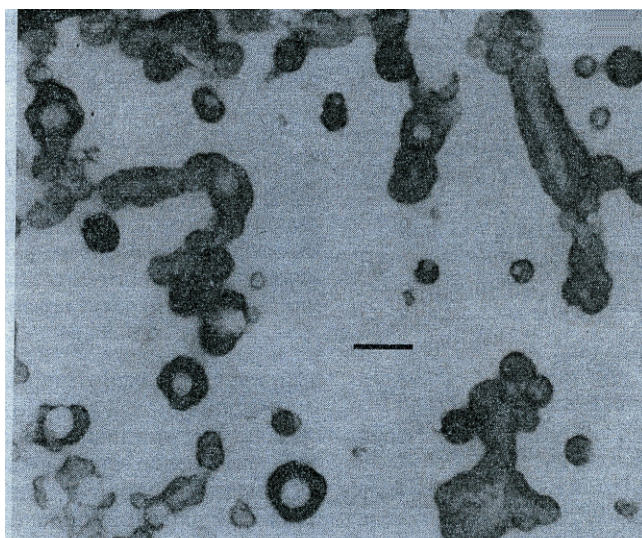


Рис. 11. Нанобактерии на кристалле в почве. Полоска – 1 мкм. Сканирующая электронная микроскопия [32]

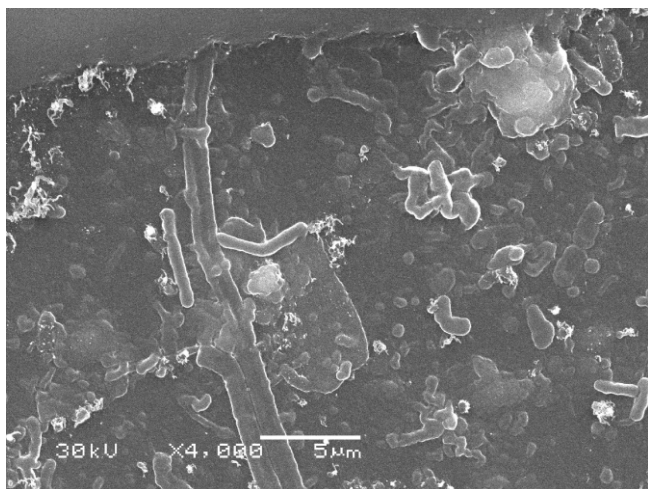


Рис. 12. Нанобактерии и обычные бактерии в почвенном микроценозе. Сканирующая электронная микроскопия

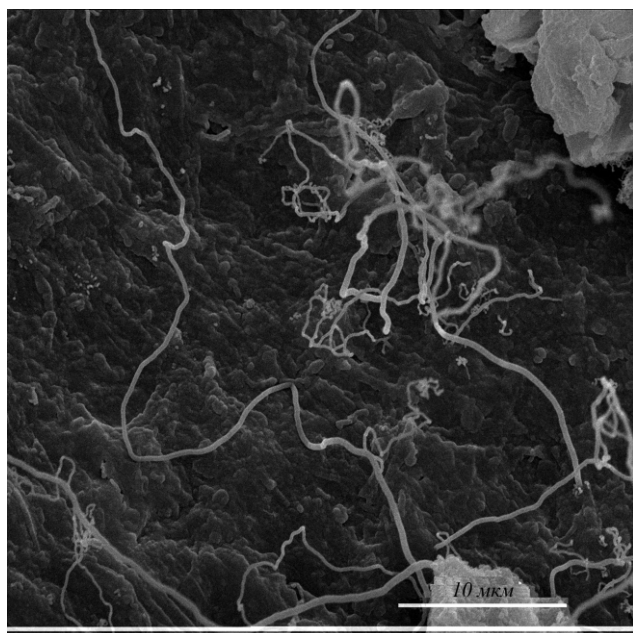


Рис. 13. Нитевидные «наноформы» в почвенном микроценозе. Сканирующая электронная микроскопия

тствующие вполне допустимым мелким клеткам (рис. 9). Неудивительно, что тетрациклин, ЭДТА и цитрат подавляли эти процессы – антибиотик угнетает бактерии, а хелаторы – осаждение кальция [28, 29].

Анализируя подобные примеры, можно видеть, что существуют формы (типично клеточной организации), по размерам вполне «походящие» на бактерии и/или микоплазмы. Но одновременно имеет

место интенсивное (и равномерно переходящее по всему диапазону размеров через промежуточное в совсем не клеточное, крохотное) образование действительно очень мелких «нечто». Такое «нечто» по размерам (100 и менее нанометров) клеткой в ее даже минимальном, но полном «клеточном комплекте» быть не могло. Однако при этом наблюдалась ярко выраженная полиразмерность, при которой даже визуально видна некая преемственность, отпочкование некоторых нановезикул от типичных клеток (рис. 10). И остается только удивляться, почему никто не исследовал механизм, динамику и т. д. этих «нечто». Тем более что образование такого «наноразмера» везикул, фрагментов, отпочкований и прочих производимых клетками ряда микроорганизмов продуктов хорошо известно и многократно описано. А при определенных воздействиях – вообще все хорошо воспроизводимо (рис. 11). Никто и никогда такие продукты нанобактериями (ранее, пока на них не пришла мода) не считал. И они на самом деле ими не являются. Поэтому в ряде случаев то, что в порыве моды называют нанобактериями, относится к типично «нашей» жизни и при всей значимости таких находок (особенно при патологиях человека) их изучение следовало бы продолжить в традиционных направлениях. А вопрос, действительно требующий особого внимания, – это то, что связано с механизмами, лежащими в основе появления подобных «нечто», – как клеточных производных и их роли в возникновении и течении болезни.

Аналогичная ситуация имеет место и в природе. Там также находят некие объекты во всем диапазоне размеров. И тоже часть их можно спокойно отнести к «нашей» жизни. В природных субстратах описано (как приведено выше) значительно большее разнообразие (сугубо по внешнему виду) форм. Но при исследовании ненарушенной архитектуры микроценозов картина выглядит еще более удивительной. Так, кроме разной плотности скоплений нанобактерий, можно наблюдать и их диффузное распределение. А происхождение тех образований, размеры которых с клеткой несовместимы, в ряде случаев может быть от «типичных» клеток (рис. 12). Но, пожалуй, наиболее необычно смотрятся нитевидные формы «наноразмеров». Так, на рис. 13 видны три группы нитей. Самая толстая из них в ди-

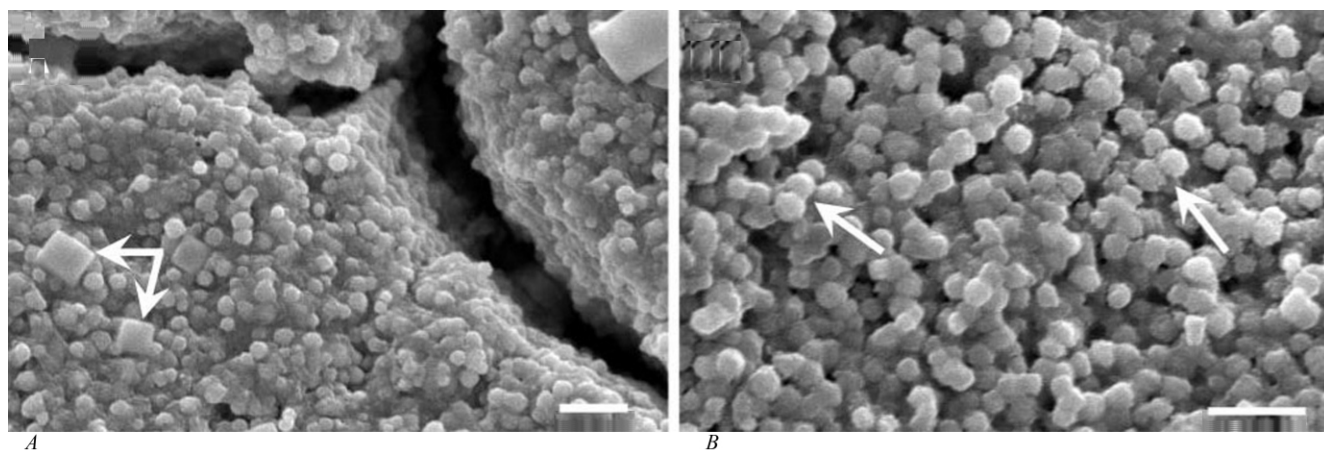


Рис. 14. Карбонатно-кальциевые наночастицы, приготовленные *in vitro*, очень похожи на гидроксилapatит нуклеина: *A* – наночастицы CaCO_3 , полученные диффузией паров кристаллов $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ в 1 М раствор CaCl_2 (наблюдаются как коккоидные структуры с размерами в узких пределах, похожие на бактерий, так и кристаллы кальцита (показано стрелками); сканирующая электронная микроскопия); *B* – наночастицы CaCO_3 , полученные разведением 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ и 1 М CaCl_2 в пропорции 1:100 в DMEM (сканирующая электронная микроскопия). Полоска – 1 мкм [33]

аметре имеет 0,4–0,5 мкм (400–500 нм), средняя по размерам – уже всего 0,2 мкм (200 нм), а самые тонкие, начиная с 80 нм, доходят до 20 нм. И очень похоже, что иногда они как-то связаны с более толстыми (происходят от них), а иногда – автономны. Но здесь уже начинается неопределенность в оценке возможных минимальных размеров, так как значительная длина (по отношению к диаметру) даже самых тонких нитей позволяет теоретически разместиться в них всему минимально необходимому набору компонентов, чтобы считаться еще клеткой. Но как в такой «трубе» могут происходить процессы клеточного метаболизма (по крайней мере, исходя из обычных представлений), понять невозможно.

Приведенные примеры – абсолютно ничтожная часть в сравнении с наблюдаемыми картинами. Но даже имеющейся феноменологии достаточно для понимания необычности микромира. Тем не менее, это все еще по своей организации клетки. И только то, что свести к «клетке» уже невозможно, изучать надо как самостоятельное явление, как то самое «нано-нечто» – вторую группу нанообъектов.

Наиболее существенным (и фундаментально значимым) здесь видится то, что такое «нано-нечто» действительно существует как некое явление, не укладывающееся в общепринятые рамки представлений. И оно тоже наиболее детально изучено у человека при достаточно широком круге патоло-

гий, хотя лучше всего – в случаях заболеваний, связанных с отложением солей. С самого начала при изучении подобных объектов появилась противоречивость в оценке экспериментальных данных, носящая двойственный характер. С одной стороны, это «внутренние» (фундаментальные) противоречия, при которых воспроизводимые и подтверждаемые разными исследователями результаты экспериментов место имели как таковые, но не укладывались в существующие представления о «живом». С другой стороны, существовали противоречия, которые условно можно назвать «внешними» (субъективными), т. е. касающимися достоверности данных. Суть их сводилась к тому, что разные группы исследователей получали (кроме некоторых базовых, воспроизводимых) разные результаты. И не просто «разные», а противоречащие друг другу. И, собственно, каждая группа ученых считала свои «правильными», а то, что описывали другие, – ошибочными. Разберем эти два типа «противоречий».

К «внутренне» противоречивым данным относилось то, что обнаруживаемые «нано-нечто» мультиплицировались (вначале даже использовали термин «размножались»), а по своим размерам относились к тем «типичным» нанообъектам, которые уже клеткой назвать невозможно. После долгих дискуссий и развития соответствующих методических приемов было показано, что такие же формы (даже с картинами «деления») можно получить в

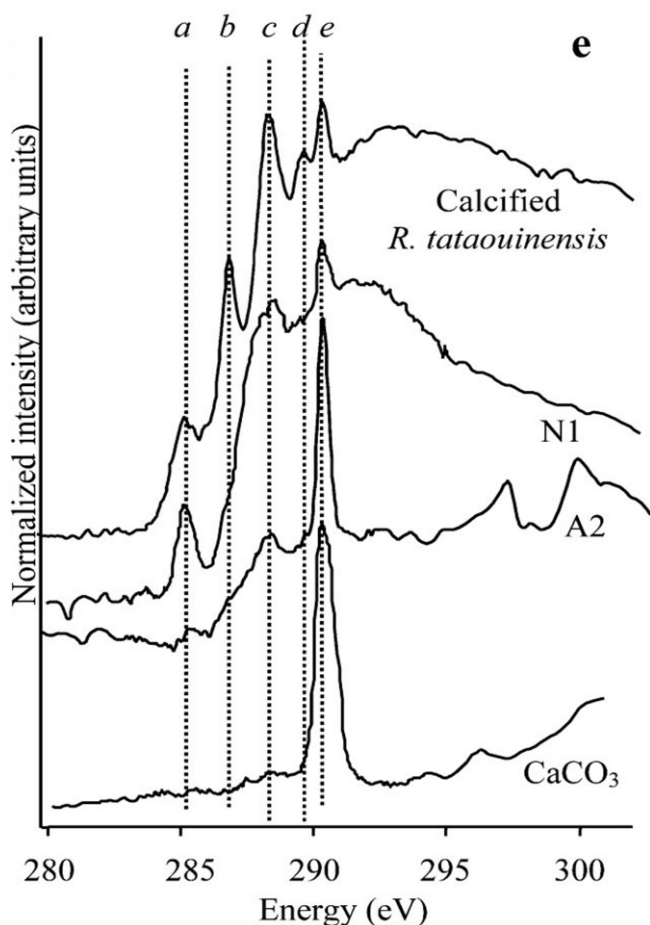


Рис. 16. Углеродный К-фронт. Околофронтная рентгеновская адсорбция кальцифицированных наночастиц из образцов A2 и N1 человеческих кальцифицированных клеток в сравнении с типичными спектрами кальцифицированных клеток *Ramlibacter tataouinensis*. Спектры кальцита показаны для сравнения. Буквами *a*, *b*, *c*, *d* и *e* обозначены соответственно пики 285,2; 286,5; 288,2; 289,5 и 290,3 эВ [35]

чисто химических условиях или добавляя (специальным образом) в среду соли кальция (рис. 14). И все бы было просто и понятно, если бы имели место только такие данные, а никаких других не было бы. Но все авторы (в том числе и те, рисунки которых приведены) своими руками получили мультипликацию такого материала. Мультипликацию только при инокуляции, без которой «все было», а ничего не происходило (рис. 15, см. вклейку). Но и в чистой среде без солей кальция при любой инокуляции тоже «процесс не шел». Стабильно же «рост» воспроизводился (и «пересевался» по всем канонам микробиологии) в достаточно сложных питательных средах, применяющихся для выращивания кле-

ток млекопитающих. И тонкий спектроскопический анализ показывал наличие в таких образованиях белков, но не «своих», а только тех, которые присутствовали в питательных средах (рис. 16). А сами структуры при этом приобретали строение, идентичное обнаруживаемому в кальций-содержащих образованиях («камнях») у больных людей (рис. 17). Что же касается присутствия ДНК и специфических белков (описываемых другими авторами как признак нанобактерий), то их в приведенных выше работах не выявлено.

И опять же все признают (независимо от того, кто и чем их считает), что такие «нано-нечто» способны к затравочной мультипликации, т. е. феноменологически по этому показателю они сходны с бактериями, основное свойство которых – это накопление себе подобного. Их, такие нанообъекты, можно переносить в ничтожном количестве (в строго стерильных условиях) на свежие питательные среды («пересевать») и в них, этих свежих питательных средах, образовывались (и накапливались в значительных количествах!) те же «нано-нечто». Можно было даже заразить живое (чаще всего это делали на клетках в культуре) и в нем тоже воспроизводилось такое же «нано-нечто» [30]. Это значило, что выполнялась триада Коха, считавшаяся долгое время абсолютно необходимой и единственно полностью достаточной для доказательства того, что найден инфекционный агент, являющийся этиологическим началом данной болезни. Но при этом такие «нано-нечто» (в пределе утверждений критиков) не содержали «своих» белков и вообще никаких (ни своих, ни чужих) нуклеиновых кислот.

Только в таком пределе видят «нано-», мягко говоря, далеко не все. Это и есть «внешние» субъективные противоречия – отрицание одними исследователями результатов других. И они тоже базировались на экспериментах – в основном на том, что некоторым исследователям удавалось у «нано-нечто» при помощи ПЦР обнаружить специфическую ДНК, а иммуноанализом – идентифицировать «поверхностные белки». И кто прав: те, кто находит все это у «нано-», или другие, проводящие такие же исследования в особо чистых и защищенных от любого несанкционированного попадания чего-угодно извне условиях и ничего подобного не обнаружива-

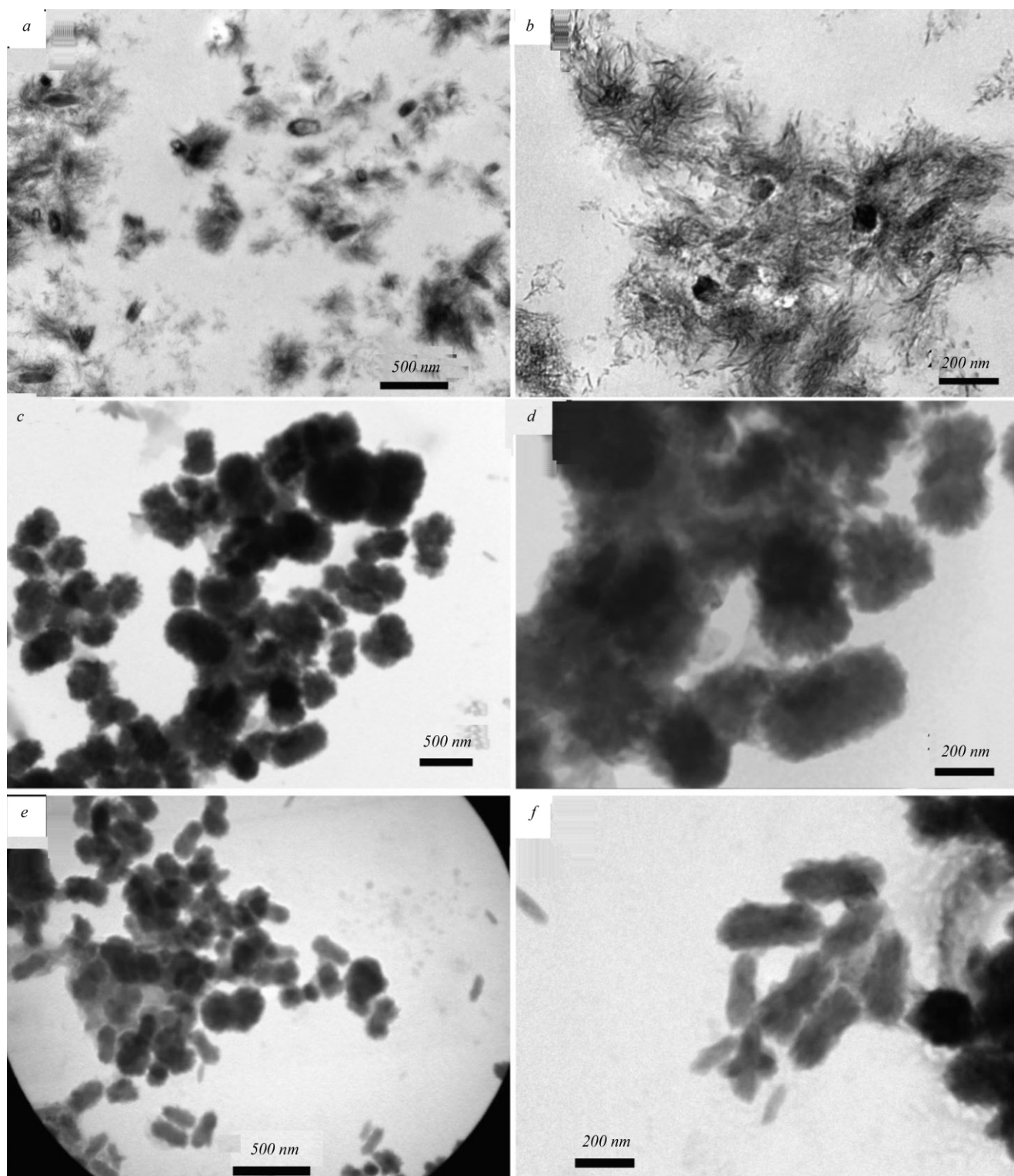


Рис. 17. Культивируемые кальцифицированные нанобактерии, изолированные из человеческих кальцификаций. Трансмиссионная электронная микроскопия [35]

ющие, объявляя при этом все загрязнением, пока дискутируется. И как ни парадоксально это звучит,

но главное в другом. В том, что касается мультипликации. Даже объясняя ее своеобразной кристал-

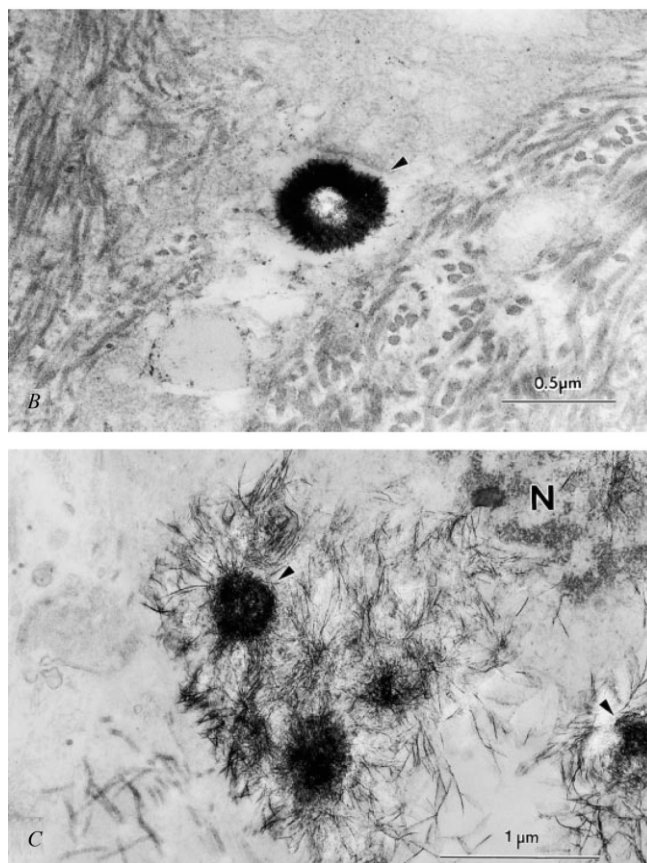


Рис. 18. Камни, возникшие в результате полицистита у человека, и организмы, культивированные из жидкости мочевого пузыря, очень похожие на *Nanobacterium*. Трансмиссионная электронная микроскопия и микрофотография [28]

лизацией, происходящей только при наличии солей кальция и некоторых белков (чаще всего называют альбумин), признают основу – мультипликацию, которая идет специфически – в присутствии затравки, т. е. того, что переносится из уже имеющегося (из «старого роста» или из патологического материала, изъятого у больного). И какой бы механизм этого не признавали, самомультипликация имеет место. Само-! Без специальной химической аппаратуры и работы над всем этим химиков.

Неожиданным оказался тот факт, что если исходить из «внешнего вида» (т. е. по форме и размерам), то все аналогичное обнаруживаемому у больных (и воспроизводимому в питательных средах в лабораториях) находят и в природе, в том числе в «ископаемой форме» – в образцах погребенных пород возрастом миллионы лет. Ни человека, ни даже



Рис. 19. Каменные иглоподобные колонии нанобактерий, выращенные на агаризованной модифицированной среде Loeffler. Полоска – 200 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия [30]

человекообразных обезьян с их болезнями и их «нано-этиологией», ни химических лабораторий, в которых все можно создать, в то далекое время не было. А образования, внешне не отличимые от всего этого, уже были. И в естественных субстратах они тоже такие же.

Вот лишь один пример. И внутри клеток больных людей, и во внеклеточном материале находят особые волокнистые структуры (рис. 18, 19). Одни их называют нитчатыми нанобактериями, другие – самомультиплицирующейся особой формой материала, содержащего кальций. Но аналогичные (по внешнему виду) образования мы часто находим в почве (рис. 20).

Размеры (и даже формы) у разных образований могут быть сходными. Это хорошо известно в микробиологии. Этим (хотя и с натяжкой) можно было

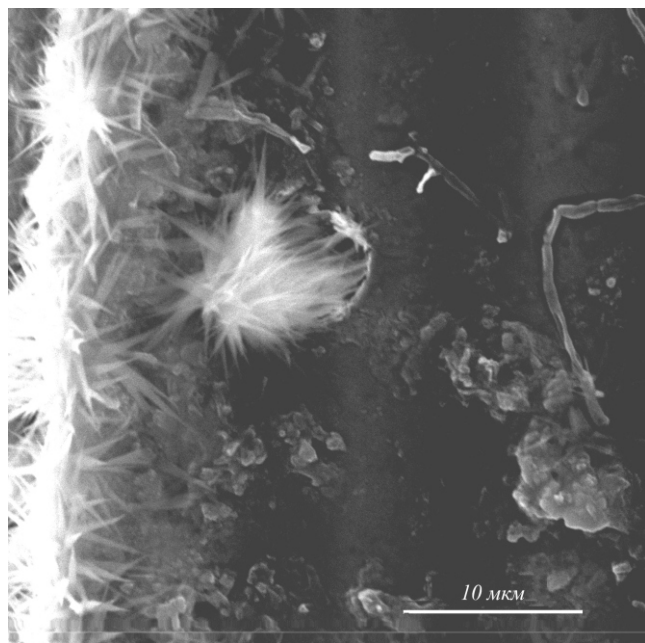


Рис. 20. Иголоподобные структуры, выявленные в почве. Сканирующая электронная микроскопия

бы объяснить многое описанное. Сложности при трактовании наблюдаемого возникают в другом. Это «другое» – в высокой степени представленная фрагментарность, разобщенность регистрируемого в окружающей среде.

Все исследования в природе (и организме больного в значительной мере тоже) проводили с помощью разрушительных методов изучения архитектуры тех образований, которые описывали. А в тех случаях, когда вели прямые наблюдения, доступность их была крайне ограничена (неровная поверхность кусочка породы, среза ткани или излома патологического материала, извлеченного из органа больного, и т. д.). В таком ограниченном по методическим возможностям изучении того, что имеется в ненарушенном виде в естественных условиях, все, вроде бы, можно свести к привычным представлениям. Имеются очень мелкие, реально живые объекты. Имеются очень меняющиеся по размерам и формам (некий «нанополиморфизм») реально живые объекты, продуцирующие, отпочковывающиеся, образующие и т. д. фрагменты своих клеток любых наноразмеров (которые как фрагменты – уже не живые, а бывшие части живого, наподобие тромбоцитов). И имеется очень сложная и нео-

бычная кристаллизация. И даже то, что она «само-», имеет прототипы (хотя и уникальные) в известном (как пример можно привести «оловянную чуму»). Все опять втискивается в рамки «общепринятых» представлений и становится «понятным». Но когда мы вышли на все эти «нано-» в их реальной архитектуре природных микрообразований, проанализировали масштабы, характер и феноменологию, все оказалось совсем не так просто и совсем не очевидно. Начали вырисовываться контуры иной картины микромира. И даже не только и не столько его архитектуры, а вообще микромира как особого явления.

V. A. Kordium, S. P. Shpylova, E. V. Moshynets,
N. I. Adamchuk-Chala, D. I. Irodov, V. I. Andrienko

Biopolymers and cells in dimension of microbial community architecture. 1. Fenomenology

Summary

A current conception of microbial communities and state of cells and polymers in them has been changing fast. The qualitatively new research area is developing swiftly together with traditional knowledge. This new area is connected with revealing auto-multiplicating objects of non-viral origin in natural substrata and living organisms whose size is less than theoretically possible minimal cell. In this review the research microbial communities results in both traditional and new arias are analyzed.

Keywords: microorganisms, microbial communities, nanobacteria, soil.

V. A. Кордюм, С. П. Шпилова, О. В. Мошинець,
Н. І. Адамчук-Чала, Д. І. Іродов, В. І. Андрієнко

Біополімери та клітини у вимірюванні архітектури мікроценозів. 1. Феноменологія

Резюме

Наразі уявлення про мікробні ценози та стан клітин і біополімерів у них швидко змінюються. Разом з традиційними поглядами стрімко розвивається якісно новий напрямок, пов'язаний з виявленням у природних субстратах і живих організмах об'єктів невірусного походження, які самомультіплікуються, з розмірами, меншими за мінімальну теоретично можливу клітину. Наведено і проаналізовано матеріали традиційних на сьогодні і нових напрямків досліджень.

Ключові слова: мікроорганізми, мікробний ценоз, нанобактерії, ґрунт.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sherr E. B. And now, small is plentiful // Nature.–1989.–**340**, N 6233.–P. 429.
2. Weiss R. Aquatic viruses unexpectedly abundant // Sci. News.–1989.–**136**, N 7.–P. 100.

3. *Walsby A. E.* A square bacterium // *Nature*.—1980.—**283**, N 5742.—P. 69–71.
4. *Stoeckenius W.* Walsby's square bacterium: fine structure of an orthogrcal prokaryote // *J. Bacteriol.*—1981.—**148**, N 1.—P. 352–360.
5. *Japan* finds first triangual bacterium // *New Sci.*—1986.—**111**, N 1519.—P. 25.
6. *Vasilyeva L. V.* New unusual bacteria with radial symmetry // *Perspect. Microbiol. Ecol. Proc. 4th Int. Symp. (Ljubljana, 24–29 Aug., 1986)*.—Ljubljana, 1986.—P. 147–152.
7. *Evtushenko L. I., Tartykova S. D., Akimov V. N., Semyonova S. A., Kalakoutskaa L. V.* *Glycomyces tenuis* sp. Nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1991.—**41**, N 1.—P. 154–157.
8. *Kaszubiak H., Muszynska M.* Bacterial number and biomass in a meadow ecosystem // *Zbl. Microbiol.*—1987.—**142**, N 8.—P. 559–568.
9. *Velimirov B.* Nanobacteria, ultramicrobacteria and starvation forms: a search of the smallest metabolizing bacterium // *Microbes and Environments*.—2001.—**16**, N 2.—P. 67–77.
10. *Kordium V., Moshynets E., Tsapenko M., Adamchuck-Chala N., Irodov D., Andrienko V.* Rhizosphere microorganisms – total monitoring // *Soil Sci.*—2008.—**9**, N 1–2.—P. 53–63.
11. *Metzber D. E.* *Biochemistry*.—New York etc.: Harcourt/Acad. press, 2001.—Vol. 1.—937 p.
12. *Morowitz H. J.* The completeness of molecular biology // *Isr. J. Med. Sci.*—1984.—**20**, N 9.—P. 750–753.
13. *Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman J. L., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips Ch. A., Merrick J. M., Tomb J.-F., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P.-Ch., Lucier Th. S.* The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium* // *Science*.—1995.—**270**, N 5235.—P. 397–403.
14. *Mushegian A. R., Koorin E. V.* A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1996.—**93**, N 19.—P. 10268–10273.
15. *Gonzalez-Lopez J., Vela R.* The physical limit of small living things // *Tex. J. Sci.*—1982.—**34**, N 3–4.—P. 264–265.
16. *Wen Y., Li Y. G., Yang Z. L., Wang X. J., Wei H., Liu W., Miao X. Y., Wang Q. W., Huang S. F., Yang J., Kajander E. O., Ciftcioglu N.* Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis // *Chin. Med. J.*—2005.—**118**, N 5.—P. 421–424.
17. *Wood H. M., Shoskes D. A.* The role of nanobacteria in urologic disease // *World J. Urol.*—2006.—**24**, N 1.—P. 51–54.
18. *Agabobov R. M., Abashina T. N., Suzina N. E., Vainshtein M. B., Schwartsburd P. M.* Link between the early calcium deposition in placenta and nanobacteria-like infection // *J. Biosci.*—2007.—**32**, N 6.—P. 1163–1168.
19. *Jelic T. M., Chang H. H., Roque R., Malas A. M., Warren S. G., Sommer A. P.* Nanobacteria-associated calcific aortic valve stenosis // *J. Heart Valve Dis.*—2007.—**16**, N 1.—P. 101–105.
20. *Bratos-Rezez M. A., Sanchez P. L., Garcia de Cruz S., Villacorta E., Palacios I. F., Fernandez-Fernandez J. M., Di Stefano S., Orduna-Domingo A., Carrascal Y., Mota P., Martin-Luengo C., Bermejo J., san Roman J. A., Rodriguez-Torres A., Fernandez-Aviles F.* Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification // *Eur. Heart J.*—2008.—**29**, N 3.—P. 371–376.
21. *Puskas L. G., Tiszlavicz L., Razga Z., Torday L. L., Krenacs T., Papp J. G.* Detection of nanobacteria-like particle in human arterosclerotic plaques // *Acta Biol. Hung.*—2005.—**56**, N 3/4.—P. 233–245.
22. *Sommer A. P., Miyake N., Wickramasinghe N. C., Narlikar J. V., Al-Mufti S.* Functions and possible provenance of primordial proteins // *J. Proteome Res.*—2004.—**3**, N 6.—P. 1296–1299.
23. *Sommer A. P., Wickramasinghe, N. C.* Functions and possible provenance of primordial proteins. Part II. Microorganisms aggregation in clouds triggered by climate change // *J. Proteome Res.*—2005.—**4**, N 1.—P. 180–184.
24. *Urbano P., Urbano F.* Nanobacteria: facts or fancies? // *PLOS Pathol.*—2007.—**3**, N 5.—P. 0567–0570.
25. *Soina V. S., Mulynkin A. D., Demkina E. V., Vorobyova E. A., El-Registon G. J.* The structure of resting bacterial populations in subsoil permafrost // *Astrobiology*.—2004.—**4**, N 3.—P. 345–358.
26. *Huber H., Hohn M. S., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V. C., Stetter K. O.* A new phylum of Archea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont // *Nature*.—2002.—**417**, N 6884.—P. 63–67.
27. *Ciftcioglu N., Kajander E. O.* Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells // *Pathophysiology*.—1998.—**4**.—P. 259–270.
28. *Hjelle J. T., Miller-Hjelle M. A., Poxton J. R.* Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease // *Kidney Int.*—2000.—**57**, N 6.—P. 2360–2374.
29. *Maniscalco B. S., Taylor K. A.* Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy // *Pathology*.—2004.—**11**, N 2.—P. 95–101.
30. *Kajander E. O., Ciftcioglu N.* Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1998.—**95**, N 14.—P. 8274–8279.
31. *Cirtcioglu N., Haddad R. S., Golden D. C., Mirrison D. R., McKay D. S.* A potential cause for kidney stone formation during space flight: enhanced growth of nanobacteria in microgravity // *Kidney Int.*—2005.—**67**, N 2.—P. 483–491.
32. *Vanstein M., Kudrjashova E.* About nanobacteria // *Microbiology*.—2000.—**69**, N 2.—P. 163–174.
33. *Martel J., Ding-Youn J. D.-E.* Purported nanobacteria in human blood as carbonate nanoparticles // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2008.—**105**, N 14.—P. 5549–5554.
34. *Cisar J. O., Thompson S., Swaim W., Hu J., Kopecko D. J.* An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2000.—**97**, N 21.—P. 11511–11515.
35. *Benzerara K., Miller V. M., Barell G., Kumar V., Miot J., Brown G. E., Sieske J. C.* Search for microbial signatures within human and microbial calcifications using soft X-ray spectromicroscopy // *J. Invest. Med.*—2006.—**54**, N 7.—P. 1–13.

УДК 579.245

Надійшла до редакції 02.12.08