УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73
Е60

Рецензенты:
кафедра биологии почв факультета почвоведения
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
(зав. кафедрой д-р биол. наук, академик РАЕН *Д. Г. Звягинцев);*
д-р биол. наук, проф. *Н. С. Егоров*
(кафедра микробиологии биологического факультета
МГУ им. М. В. Ломоносова)

Емцев, В. Т.

Е60 Микробиология: учебник для вузов / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — 5-е изд., перераб. и доп. — М. : Дрофа, 2005. — 445, [3] с.: ил.

ISBN 5-7107-7750-1

Учебник состоит из двух разделов: «Общая микробиология» и «Сельскохозяйственная микробиология».

В первом разделе представлено строение микроорганизмов, их систематика и основные свойства.

Второй раздел посвящен практическому использованию микроорганизмов в различных технологических процессах сельского хозяйства.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлениям и специальностям агрономического профиля. Может быть полезен специалистам сельскохозяйственного производства.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73

ISBN 5-7107-7750-1

© ООО «Дрофа», 2005

Предисловие

Данный учебник предназначен студентам вузов, специализирующимся в различных технологиях сельскохозяйственных предприятий.

Учебник состоит из двух разделов: «Общая микробиология» и «Сельскохозяйственная микробиология».

В первом разделе рассмотрено строение микроорганизмов, их систематика и основные свойства. Главное внимание уделено прокариотам; из числа эукариотных организмов дана характеристика водорослей, простейших и микромицетов.

В главах раздела изложены основные положения генетики микроорганизмов, преимущественно бактерий, закономерности их взаимодействия с факторами окружающей среды, различные типы питания, общие закономерности обменных реакций у микроорганизмов. Конкретные микробиологические процессы превращения веществ и их возбудители рассматриваются в качестве звеньев круговоротов биогенных элементов в природе.

Второй раздел — «Сельскохозяйственная микробиология» — подвергся существенной переработке по сравнению с 4-м изданием (1993 г.). В связи с выходом в свет новых современных учебников по почвоведению, агрохимии и агроэкологии были сокращены главы о роли микроорганизмов в процессах почвообразования, системах использования почвы.

В то же время представленные в последнем издании учебника данные о характере реакций почвенных микроорганизмов на действие эколого-географических факторов, являющиеся этапными для отечественной почвенной микробиологии, сохранены в его новой редакции и должны рассматриваться как обязательный элемент процесса обучения микробиологии будущих специалистов сельского хозяйства.

Второй раздел учебника главным образом посвящен практическому использованию микроорганизмов в различных технологических процессах сельского хозяйства. Особое внимание уделено микроорганизмам, применяемым при производстве биопрепаратов (биостимуляторов, биофунгицидов, биоинсектицидов и т. д.) для сельского хозяйства и биоремедиации.

Подробно изложены вопросы использования микроорганизмов и микробиологических методов в решении экологических проблем сельского хозяйства: биоочистки животноводческих стоков, переработки твердых отходов сельского хозяйства и пищевых производств; рассмотрены перспективы применения микробной биотехнологии для комплексной охраны окружающей среды.

Большинство материалов второго раздела учебника основаны на новейших достижениях экологической биотехнологии и поэтому представляют интерес не только для студентов, но и для специалистов сельскохозяйственного производства.

Всем, кто хочет более основательно изучить отдельные проблемы общей и сельскохозяйственной микробиологии, будет полезен приведенный в конце книги список монографий, учебников и различных руководств.

Введение

Микробиология (от греч. *mikros* — малый, *bios* — жизнь, *logos* — наука) — наука о мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах, называемых микроорганизмами, или микробами.

Микробиология как наука изучает морфологию, систематику и физиологические особенности микроорганизмов, условия их жизнедеятельности, роль в природе и жизни человека. Микробиологи разрабатывают способы использования полезных микробов в сельском хозяйстве и промышленности, средства и методы борьбы с патогенными микроорганизмами, вызывающими болезни растений, животных и человека.

Микроорганизмы можно обнаружить только при помощи оптического или электронного микроскопа. Максимальное увеличение оптического микроскопа составляет 3000. Это позволяет различать частицы размером не менее 0,1—0,2 мкм[1]. Современные электронные микроскопы имеют разрешающую способность до 0,15 нм[2], что дает возможность видеть не только мельчайшие организмы, но и тонкие структуры клеток. Подобный микроскоп увеличивает рассматриваемый объект в 750 000 раз.

Мир микроорганизмов в природе весьма разнообразен. Значительное их число представлено бактериями, в том числе цианобактериями (синезелеными водорослями). Многочисленную группу микроорганизмов составляют грибы. К особой группе ультрамикроскопических организмов относят вирусы, не имеющие клеточного строения и служащие возбудителями различных болезней растений, человека и животных. Известны и ультрамикроскопические паразиты микроорганизмов, так называемые фаги, иначе еще называемые вирусами микробов. Микробиология изучает также многочисленных простейших животных (протозоа) и водоросли, имеющие микроскопические размеры.

Микроорганизмы широко распространены в природе. Они постоянно присутствуют в почвах, водоемах, на поверхности и внутри тела человека, животных и растений, в пищевых продуктах, воз-

[1] 1 мкм (микрометр) = 10^{-3} мм = 10^{-6} м.

[2] 1 нм (нанометр) = 10^{-3} мкм = 10^{-6} мм = 10^{-9} м.

духе и т. д. Микроорганизмы можно выявить и в песках пустынь, и во льдах Арктики и Антарктики, в воде и иле морей и океанов, на скальных породах высоко в горах и в глубине шахт.

Широкое распространение микроорганизмов свидетельствует об их огромной роли в природе. При их участии происходит разложение различных органических веществ в почвах и водоемах, они обусловливают круговорот веществ и энергии в природе; от их деятельности зависит плодородие почв, формирование каменного угля, нефти, многих других полезных ископаемых. Микроорганизмы участвуют в выветривании горных пород и прочих природных процессах.

Многие микроорганизмы используют в промышленном и сельскохозяйственном производстве. Так, хлебопечение, изготовление кисломолочных продуктов, виноделие, получение витаминов, ферментов, пищевых и кормовых белков, органических кислот и многих веществ, применяемых в сельском хозяйстве, промышленности и медицине, основаны на деятельности разнообразных микроорганизмов. Особенно велико значение микроорганизмов в растениеводстве и животноводстве. Это обогащение почвы азотом, борьба с вредителями сельскохозяйственных культур при помощи микробных препаратов, правильное приготовление и хранение кормов, получение кормового белка, антибиотиков и других веществ микробного происхождения.

Микроорганизмы оказывают положительное влияние на процессы разложения веществ неприродного происхождения — ксенобиотиков, попадающих в почвы и водоемы и загрязняющих их.

Наряду с полезными микроорганизмами существует большая группа так называемых болезнетворных, или патогенных, микроорганизмов, вызывающих разнообразные болезни сельскохозяйственных животных, растений, насекомых и человека. В результате их жизнедеятельности возникают эпидемии заразных болезней человека и животных, что сказывается на развитии экономики и производительных сил общества.

Полученные в последние десятилетия научные данные не только существенно расширили представления о почвенных микроорганизмах и процессах, вызываемых ими в окружающей среде, но и позволили создать новые отрасли в промышленности и сельскохозяйственном производстве. Например, открыты антибиотики, выделяемые почвенными микроорганизмами, и показана возможность их использования для лечения человека, животных и растений, а также при хранении сельскохозяйственных продуктов. Обнаружена способность почвенных микроорганизмов образовывать биологически активные вещества: витамины, аминокислоты, стимуляторы роста растений — ростовые вещества и т. д. Найдены пути использования белка микроорганизмов для кормления сельскохозяйственных животных. Созданы микробные препараты, усиливающие поступление и почву азота из воздуха.

Открытие новых методов получения наследственно измененных форм полезных микроорганизмов позволило шире применять микроорганизмы в сельскохозяйственном и промышленном производстве, а также в медицине. Особенно перспективно развитие генной, или генетической, инженерии. Ее достижения обеспечили развитие биотехнологии, появление высокопродуктивных микроорганизмов, синтезирующих белки, ферменты, витамины, антибиотики, ростовые вещества и другие необходимые для животноводства и растениеводства продукты.

С микроорганизмами человечество соприкасалось всегда, долгое время даже не догадываясь об их существовании. С незапамятных времен люди наблюдали брожение теста, готовили спиртные напитки, сквашивали молоко, делали сыры, переносили различные заболевания, в том числе эпидемические. Свидетельством последнего в библейских книгах служит указание о повальной болезни (вероятно, чуме) с рекомендациями сжигать трупы и делать омовения.

Однако до середины XIX в. даже никто не представлял, что разного рода бродильные процессы и заболевания могут быть следствием деятельности ничтожно малых существ.

До XV в. предполагали, что болезни вызывают «миазмы» — особые болезнетворные испарения, содержащиеся в воздухе. Теорию «болезнетворных миазмов» в IV в. до н. э. создал великий врач древности *Гиппократ*. Его теория была подвергнута пересмотру в V в. до н. э. греческим ученым *Фукидидом*. Последний, наблюдая ужасы чумы, свирепствовавшей во время пелопонесской войны, предположил, что заболевания вызывают не столько болезнетворные" миазмы, сколько мельчайшие живые частицы, проникающие в организм человека через рот, — явление, получившее у римлян название *contagium vivum*. Столь гениальное предвидение микробной теории начало утверждаться лишь в XIX столетии.

Рис. 1. Джироламо Фракасторо (1478-1553)

Позднее итальянский врач *Д. Фракасторо* (1478-1553) (рис. 1), развивая учение о «контагии», писал, что контагий представляет собой инфекционного возбудителя. Попадая, например в организм, этот возбудитель активно размножается и быстро распространяется по всему телу. Возбудители инфекции

Рис. 2. Антон ван Левенгук (1632-1723)

могут проникать в организм при непосредственном контакте, через одежду и с воздухом. Своей гениальной догадкой Фракасторо, как и Фукидид, предвосхитил открытие микробов.

В конце XVI в. (около 1590 г.) голландцы *Г.* и *З. Янсены* впервые создали сложный микроскоп. В начале XVII в. известный астроном *Г. Галилей* сконструировал сложный микроскоп с небольшим увеличением, представляющий собой короткофокусные линзы. Этот прибор постепенно совершенствовал как сам Галилей, так и другие исследователи.

В 1646 г. ученый-иезуит, профессор *Collegium Romanum* в Риме *А. Кирхнер* (1601—1680) обнаружил при помощи лупы в гниющих растворах очень малые живые существа. Он утверждал, что чуму и оспу вызывают живые невидимые частицы. Наблюдения Кирхнера остались малоизвестными.

Открытие невидимого мира принадлежит голландскому ученому *А. ван Левенгуку* (1632—1723) (рис. 2), которого справедливо считают отцом микрографии, т. е. описательной микробиологии. Торговец полотном А. ван Левенгук весь свой досуг посвящал искусству шлифования линз. Ему удалось создать приборы, дававшие значительно более совершенную картину увеличенных объектов, чем существовавшие в те времена оптические системы. Система А. ван Левенгука давала линейное увеличение в 280 раз (рис. 3).

Благодаря интересным открытиям, сделанным при помощи микроскопов, А. ван Левенгук вошел в историю как великолепный естествоиспытатель. Он наблюдал компоненты крови, систему кровообращения, структуру тканей растений, микроскопировал насекомых, водоросли, простейших и т. д. Непосредственное открытие микробов произошло в 1676 г., когда А. ван Левенгук, рассматривая в микроскоп капли дождевой воды, стоявшей несколько дней в бочке, заметил огромное количество очень маленьких движущихся организмов. В свежей дождевой воде таких существ не оказалось. Отсюда исследователь заключил, что зародыши организмов попадают в воду из воздуха. А. ван Левенгук однажды записал, что никогда его взору не представлялось более приятного зрелища, чем тысячи живых существ «анималькулей» («живых зверьков») в капле воды.

О своих наблюдениях А. ван Левенгук в письмах сообщал в Лондонское королевское общество. Для нас особенно интересно одно из его писем с подробным описанием и отчетливыми изображениями различных бактерий, обитающих во рту человека (рис. 4). Собрано уже 20 объемных томов рукописей исследователя.

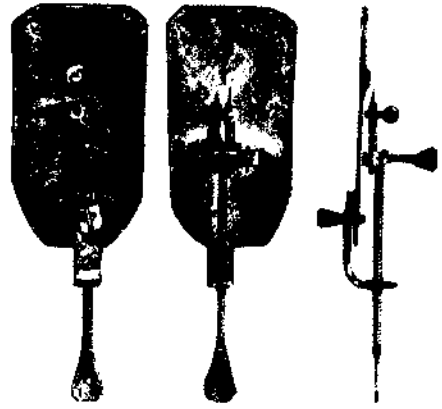


Рис. 3. Микроскоп А. ван Левенгука

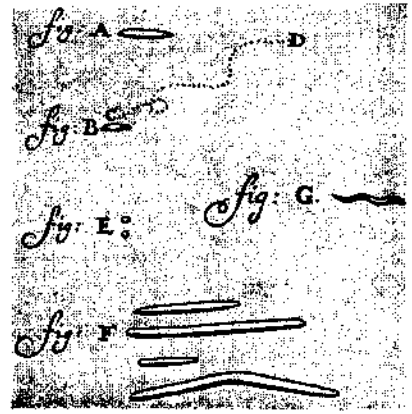


Рис. 4. Первые рисунки бактерий из налета зубов людей, посланнные А. ван Левенгуком, 17 сентября 1683 г. в письме № 39 в Лондонское королевское общество

Интересовался работами ученого и его современник русский царь Петр I. Во время поездки в Голландию весной 1698 г. он встретился с А. ван Левенгуком, ознакомился с усовершенствованными им микроскопами и серией препаратов. Петр I выразил желание приобрести увеличительные инструменты для русской Кунсткамеры. Один микроскоп царь получил в подарок.

С 1725 г. в мастерских Академии наук в Санкт-Петербурге началось производство отечественных микроскопов. Среди умельцев-конструкторов этих точных инструментов особенно прославился *И. Беляев* с сыновьями. Производством микроскопов в России в конце XVIII в. руководил известный механик-самоучка *И. Кулибин*. В 1741 г. в распоряжении Российской академии наук уже был 21 микроскоп.

В результате развития оптики после открытий А. ван Левенгука всеобщее внимание к миру микровргнизмов возрастало. Началось описание отдельных их представителей. Вместе с тем ученые того времени еще не подозревали о роли микроорганизмов в природе. Для наблюдателей это были лишь весьма курьезные, интересные существа, составлявшие развлечение для микроскопистов.

Накопление материала о формах и разнообразии микроорганизмов продолжалось довольно долго. Размеры объекта крайне затрудняли исследования. Возможности его познания даже у опытных исследователей иногда вызывали скептицизм. Так, выдающийся шведский ученый *К. Линней* (1707—1778), создавший первую систе-

му живого мира, введший бинарную номенклатуру, в 1767 г. в статье «Mundus invisibiles» высказал отрицательное отношение к изучению микробов. Великий систематик не мог разобраться в разнообразных формах микроорганизмов и объединил их в один общий род, дав ему характерное название «Chaos» («Хаос»). К. Линней считал, что не следует углубляться в изучение этого невидимого мира, так как творец, создавая его, очевидно, предполагал сохранить эту область за собой.

Первую серьезную попытку систематизировать микробов в 1786 г. сделал датский ученый *О. Мюллер,* описавший живые микроскопические организмы (анималькули), обитающие в воде и почве. Их назвали «инфузории» — развивающиеся в настоях (infusium). Следующим систематиком микробов был *Х. Г. Эренберг.* В 1838 г. в книге «Инфузории как совершенные организмы» он предложил разделить инфузории на 22 семейства, из которых три содержат описания бактерий. Книга была снабжена прекрасным атласом.

Ряд ценных данных о микроорганизмах получил русский исследователь, известный врач *Д. С. Самойлович* (1744—1810). Изучая причины свирепствовавших тогда эпидемий чумы, он много внимания уделил раскрытию природы этого заболевания. В результате исследователь пришел к оригинальному для своего времени заключению, что возбудителем чумы служит «особливое и совсем отменное существо». В 1792—1793 гг. Д. С. Самойлович попытался изготовить вакцину, привив здоровым людям очень малые дозы «слабой чумы». По-видимому, он вводил разведенный в воде гной из бубонов больных легкой формой болезни. Врач и ученый совершенствовал свои знания, работая в ряде стран Европы. В Лейдене он защитил диссертацию и получил звание доктора медицины. Д. С. Самойлович был членом пятнадцати академий.

Нельзя не отметить и работы *М. М. Тереховского* (1740—1796), доказавшего, что анималькули, возникающие в настоях, происходят из воды, используемой для этих настоев. Ученый отмечал, что предварительное кипячение или замораживание такой воды делает настои стерильными. Таким образом, опыты Тереховского с удивительной простотой доказали, что анималькули не зарождаются внезапно, самопроизвольно из неживой материи, а появляются в колбах с настоями вместе с некипяченой водой. Выводы ученого предвосхитили научные обоснования, сделанные через сто лет Л. Пастером, положившим начало *асептике* — системе стерилизации посредством кипячения или использования горячих паров.

Заключающим событием ознакомительного этапа развития микробиологической науки стала вышедшая в середине XIX в. в России книга *П. Ф. Горяинова* (в основном он придерживался систематики Х. Г. Эренберга) «Зоология», один из разделов которой был посвящен инфузориям.

Новая эра систематических и морфологических исследований микроорганизмов началась с работ ботаников *Ф. Кона* (1828—1898) п *К. Негели* (1817—1891). Их исследования помогли установить природу некоторых микроорганизмов (бактерий). С именами этих ученых связан возникший в то время спор о существовании и устойчивости у бактерий естественно-исторических видов. Ф. Кон был убежденным мономорфистом, т. е. признавал у бактерий, как и у высших организмов, постоянство видов. К. Негели, подобно большинству его современников, относился к плеоморфистам. По его взглядам, отдельные виды микроорганизмов в зависимости от условий существования способны легко менять форму и физиологические функции. Представления плеоморфистов возникли отчасти вследствие несовершенных методик работы с микроорганизмами, культуры которых загрязнялись посторонними формами микроскопических существ.

Так или иначе, но к середине XIX в. был накоплен большой материал о разнообразных группах микроорганизмов. Однако физиологию и обмен веществ микроскопических существ исследования не затрагивали. Поэтому роль микромира в природе, а также в жизни и деятельности человека оставалась невыясненной.

Дальнейшее широкое развитие микробиологии связано с именем великого французского ученого *Л. Пастера* (1822—1895) (рис. 5). Он впервые показал огромную роль микроорганизмов как участников разнообразных биохимических превращений и возбудителей заболеваний живых существ. Работы Л. Пастера открыли новый период в развитии микробиологии, который называют физиологическим.

В начале научной деятельности Л. Пастер, будучи по образованию химиком, сделал ряд важных открытий в области химии. Он наблюдал, как гриб *Penicillium glaucum* и дрожжи, развиваясь на соли рацемической винной кислоты, потребляют лишь один из оптических изомеров. Работа ученого сыграла важнейшую роль в развитии биохимии, дала мощный толчок развитию исследований в области стереохимии ферментативного катализа.

Рис. 5. Луи Пастер (1822-1895)

Первым шагом на пути Л. Пастера к будущим микробиологическим исследованиям послужило открытие брожения как результата жизнедеятельности микроорганизмов. По воззрениям того времени, данный процесс считался чисто химическим, вызываемым са-

мопроизвольно распадающимся белком. Л. Пастер, кроме того, установил, что каждый тип бродильного процесса имеет своих возбудителей. В дальнейшем ученый доказал, что сахар превращается в молочную кислоту под воздействием специфических молочнокислых бактерий, спиртовое же брожение вызывают другие микроорганизмы — дрожжи.

Позднее, изучая возбудителей маслянокислого брожения, Л. Пастер выявил, что они могут жить только в отсутствие кислорода, т. е. были открыты «строгие анаэробы». Открытие бескислородной жизни вызвало взрыв протестов, так как считалось, что кислород — «жизненный газ», без которого существование организмов невозможно. Обнаруженное Л. Пастером явление анаэробиоза имело большое значение в создании теории брожения. По мнению Л. Пастера, брожение — не что иное, как жизнь без свободного кислорода. При анаэробиозе бактерии получают необходимую для жизни энергию, вызывая распад, т. е. брожение, органических соединений.

Изучая уксуснокислое брожение, т. е. окисление бактериями винного спирта в уксусную кислоту, Л. Пастер убедился в существовании особого типа превращений органических веществ микроорганизмами, названного окислительным брожением. Эти исследования имели не только научное, но и практическое значение. Так, по вопросам бродильного производства — виноделию, пивоварению и получению уксуса — Л. Пастер опубликовал три монографии. В них были даны ценные указания по улучшению технологий данных процессов. Ученый доказал, что даже болезни вина и пива возникают при участии микроорганизмов.

Исследуя брожение, Л. Пастер не мог пройти мимо такого распространенного и важного процесса, как гниение белковых веществ, который ранее рассматривали как химический. Он убедился в биологической природе гниения, установив также, что распад мочевины вызывают бактерии, отдельные виды которых ученый описал.

Самопроизвольное зарождение живых организмов признавалось в течение многих веков. Работы ряда исследователей, в том числе М. М. Тереховского, показали его невозможность, тем не менее до середины XIX в. проблема оставалась нерешенной. Лишь работы Пастера, определившие роль отдельных микроорганизмов в различных процессах, позволили окончательно установить невозможность самозарождения микробов. За решение этой проблемы Л. Пастеру была присуждена премия Французской академии наук. Безупречные опыты ученого доказали, что если питательные среды простерилизованы, т. е.надежно обезврежены от микроорганизмов, то жизнь в них даже в примитивных формах зародиться не может. В качестве возражения оппонентам Л. Пастер указывал на методические ошибки проведенных ими экспериментов.

В результате микробиолог сумел внушить людям безграничное доверие к хорошо проведенной стерилизации, устранив навсегда опасение, что после нее могут самопроизвольно возникнуть другие микробы. Современные дезинфекция и антисептика, а позднее асептика основываются с теоретической точки зрения на работах Л. Пастера.

С 1849 г. на юге Франции стали гибнуть шелковичные черви от болезни, называемой пебриной. К 1865 г. шелковичная промышленность юга страны оказалась на грани гибели. Комиссия сената Франции обратилась к Л. Пастеру с просьбой выяснить причины болезни. В течение пяти лет ученый работал над установлением инфекционного характера заболевания. Для борьбы с болезнью он рекомендовал профилактические меры. В результате заболевание пебриной было ликвидировано. Пастер рекомендовал также меры борьбы с другой болезнью шелковичного червя — фляшерией, или спячкой. Возбудителем этой болезни был стрептококк.

Исследуя болезни шелковичных червей, ученый приблизился к решению медицинских и ветеринарных вопросов. Труды, посвященные пебрине и фляшерии, привели к ценным практическим и теоретическим результатам. Например, Л. Пастер разработал несложный метод проверки и селекции грены, позволяющий удалять из питомников бабочек, зараженных пебриной. С теоретической точки зрения изучение тутового шелкопряда также имело большое значение. В результате анализа проведенных работ исследователь разработал микробную теорию заразных заболеваний.

В середине XIX в. в крови животных, павших от сибирской язвы, учеными были обнаружены неподвижные нитевидные тельца — «бактеридии». Л. Пастера заинтересовала причина этого заболевания, встречавшегося как у человека, так и у животных. Он установил, что его вызывает бактерия. Это было доказано опытами по отстаиванию чистой культуры сибиреязвенной палочки. Бактерии оседали на дно сосуда, и животное не заболевало от прививки ему из верхнего прозрачного слоя жидкости, так как развитие болезни могли вызвать только бактерии, содержащиеся в нижнем, мутном слое.

Для борьбы с сибирской язвой Л. Пастер предложил предохранительные прививки. Ранее экспериментируя с возбудителем куриной холеры, он обнаружил, что впрыскивание ослабленных разведений возбудителя обусловливает невосприимчивость птицы к заболеванию. Данный принцип был положен в основу профилактики сибирской язвы животных. Сибиреязвенную палочку выращивали при повышенной температуре (42—43 °С), что вызывало резкое снижение ее болезнетворных свойств и даже полную их потерю. Затем прививали животному ослабленную культуру (вакцинация), вызывая формирование длительной невосприимчивости (иммунитет) к болезни.

Эффект иммунизации наглядно продемонстрировали на одной из ферм под Парижем. Стадо из 60 овец и десяти коров поделили на две равные по числу голов группы, животным одной группы сделали прививки, а другую группу оставили как контрольную. Затем все стадо заразили активной культурой сибиреязвенной палочки. Результат был поразительным: через несколько дней контрольные животные погибли, вакцинированные же остались живы.

Изучая сибирскую язву, ученый выяснил и причину существования «проклятых пастбищ». При выпасе скота на таких пастбищах животные нередко заражались. Оказалось, что здесь закапывали павший от болезни скот. Л. Пастер доказал, что сибиреязвенный микроб способен длительное время существовать в почве. Земляные черви выносят на поверхность почвы споры микроорганизма, инфицирующие корм, который и вызывает болезнь.

После работ с сибирской язвой Л. Пастер занимался поиском возбудителей и других заразных болезней. В его лаборатории исследовали краснуху, или рожу, свиней, фурункулез и послеродовую горячку человека и, наконец, бешенство. Было обнаружено, что каждую из перечисленных болезней вызывает специфический микроорганизм, внедряющийся в живой организм извне. Особенно следует остановиться на работах великого французского ученого по изучению бешенства, которые были начаты им в 1880 г. Исследования в этом направлении позволили установить следующее. Возбудитель болезни, находящийся в слюне больных собак, невидим под микроскопом. Теперь-то мы знаем, что это был вирус. Выяснилось также, что яд бешенства локализуется в головном и спинном мозге. При медленном высушивании мозга бешеных кроликов Пастер получил сильно ослабленную вакцину. Введением животным эмульсий этого препарата удалось иммунизировать их и сделать невосприимчивыми к активному вирусу бешенства.

Работы Л. Пастера по предохранительным прививкам против бешенства стали широко известны. В 1886 г. появились и первые пациенты — люди, покусанные бешеными животными. Прививка спасла их от смерти. Это произвело такое впечатление, что толпы укушенных животными людей из Франции, Великобритании, Австрии, Бельгии, России, Румынии, Финляндии хлынули в лабораторию Пастера. Однако вследствие отдельных неудач возникали сомнения и нападки на Пастера. Его даже обвиняли в шарлатанстве.

Тем не менее огромный опыт свидетельствовал в пользу ученого, и метод антирабических (против бешенства) прививок распространялся все шире. Уже к концу 1886 г. свыше 2500 человек избежали бешенства благодаря антирабическим прививкам.

Исследования Л. Пастера, приведшие к разработке метода предохранительных прививок, заложили основы новой науки — иммунологии.

Таким образом, было оправдано гениальное предвидение знаменитого английского химика и философа *Р. Бойля,* который еще в XVII в. считал, что природу заразных болезней поймет тот, кто объяснит явление брожения.

Заслуги Л. Пастера были оценены еще при его жизни. В 1873 г. он был избран во Французскую медицинскую академию, а в 1882 г. — в Академию наук Франции. В 1884 г. Санкт-Петербургская академия наук избрала известного естествоиспытателя членом-корреспондентом по разряду биологических наук физико-математического отделения, а в 1893 г. — почетным членом.

Долгое время Л. Пастер работал в небольшой лаборатории. В 1871 г. ученый писал, что его лаборатория была слишком ничтожна, и для воплощения его больших планов в ней недостает света, воздуха и места.

На средства, собранные по подписке, в Париже в 1888 г. был открыт Пастеровский институт. Крупный взнос на строительство института был сделан правительством России. В этом, ставшем впоследствии знаменитым, институте работали многие выдающиеся микробиологи, в том числе русские. Среди них автор классических работ в области сравнительной патологии, эволюционной морфологии, микробиологии и иммунологии И. И. Мечников. Длительное время (1922—1953) проработал в институте и С. Н. Виноградский, выполнивший важнейшие исследования в области почвенной микробиологии.

В число сотрудников Пастеровского института входили известные русские ученые А. М. Безредка, Н. Ф. Гамалея, В. А. Хавкин, Я. Ю. Бардах, Н. В. Склифосовский, Г. Н. Габричевский, Л. А. Тарасевич, П. В. Циклинская и многие другие. Контингент русских был столь велик, что историограф Пастеровского института А. Делане в шутливой форме говорил, что он не знает, был ли в конце XIX в. институт Пастера французским или русско-французским учреждением.

Интенсивная работа в области медицинской микробиологии в XIX в. началась и во многих других странах. В Германии, например, исследования большой важности по этиологии ряда инфекционных болезней были выполнены *Р. Кохом* (1843-1910) (рис. 6). Он был и создателем современной микробиологической техники.

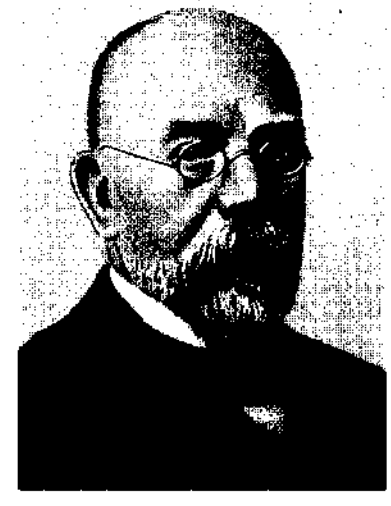


Рис. 6. Роберт Кох (1843—1910)

Значительный вклад в развитие медицинской микробиологии

Рис. 7. Сергей Николаевич Виноградский (1856—1953)

внесли также *П. Эрлих, Э. Беринг, О. Ру* и др. Выдающимися были и работы русских медицинских микробиологов *Л. С. Ценковского* (1822—1887), *И. И. Мечникова* (1845-1916), *Н. Ф. Гамалеи* (1859-1949), *Г. Н. Габричевского* (1860-1907), *Д. К: Заболотного* (1866-1929).

В России важная роль микробиологии для народного здравоохранения обусловила создание медицинских научно-исследовательских учреждений микробиологического профиля. Когда стало очевидным, что на микробиологических процессах основаны многие пищевые производства, а в сельском хозяйстве с их учетом построены почти все агротехнические приемы, появилась потребность в более широком изучении микроорганизмов. Приведем краткий очерк основополагающих исследований в области почвенной и сельскохозяйственной микробиологии, выполненных ранее и проводящихся сейчас в ряде стран.

Известны работы французских ученых XIX столетия *Я. Шлезинга* и *А. Мюнца* по изучению процесса нитрификации. Русский ученый *С. Н. Виноградский* (рис. 7), работая во Франции, создал классический труд «Микробиология почвы» (1952). Долгое время отдел почвенной микробиологии в Пастеровском институте возглавлял известный ученый *Ж. Пошон*. Книга Ж. Пошона и Г. де Баржака «Почвенная микробиология» была переведена на русский язык и издана в нашей стране (1960). В 1970 г. во Франции вышла фундаментальная работа *И. Домерга* и *Ф. Манжено* «Экология почвенных микроорганизмов».

Принципиальное значение имеют исследования английских микробиологов, особенно всемирно известной Ротамстедской опытной станции, где в прошлом веке *Р. Уорингтон* изучал особенности процесса нитрификации. Позднее здесь были развернуты исследования по симбиотической азотфиксации и микоризе у растений (Ф. *Натман, В. Мосс)*.

В Нидерландах в конце XIX и начале XX столетия исследования в области фиксации молекулярного азота свободноживущими и симбиотическими бактериями провел *М. Бейеринк* (рис. 8). В Германии в конце XIX в. *Г. Гельригель* и *Г. Вильфарт* выполнили принципиально важные работы, показавшие, что у бобовых растений фиксация молекулярного азота связана с наличием на их корнях клубеньков. В первой четверти XX в. основательные методические работы по почвенной микробиологии были сделаны Ф. Лёнисом, написавшим труд «Основы сельскохозяйственной бактериологии». Много внимания Лёнис уделял также изучению цикла азота. Позднее профессор *Г. Мюллер* опубликовал книгу «Bodenbiologie» (1965) — одно из лучших руководств по почвенной микробиологии.

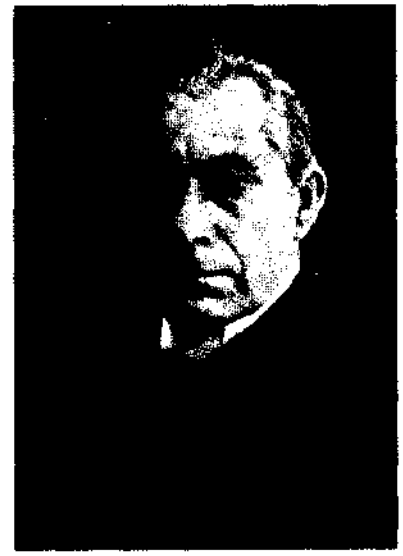


Рис. 8. Мартинус Биллем Бейеринк (1851-1931)

Много интересных работ выполнено в Скандинавских странах. Результаты исследований по биохимии процесса азотфиксации, проведенные в 40-х гг. XX столетия финским ученым *А. Виртаненом,* были отмечены Нобелевской премией. В этот период в Швеции *Е. Мели* опубликовал ценные труды о симбиотических грибах.

Среди работ сельскохозяйственного профиля в США особенно следует отметить исследования *С. Ваксмана* по почвенной микробиологии. В 1927 г. вышел в свет его фундаментальный труд «Принципы почвенной микробиологии». С. Ваксман — автор широко применяемого антибиотика стрептомицина, за открытие которого ему была присуждена Нобелевская премия. В США опубликована серия книг по общей микробиологии, и в частности наиболее полный определитель бактерий.

В Польше еще в конце XIX в. *А. Пражмовский* исследовал симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. В Венгрии перед Второй мировой войной *Д. Фехер* изучал микроорганизмы многих почв, в том числе тропических. Этот ученый создал школу почвенных микробиологов. До начала Второй мировой войны вопросами почвенной микробиологии занимался известный чешский ученый *И. Стоклаза*. Его работы были посвящены исследованиям фиксации молекулярного азота, превращения в почве азота, серы и других элементов, выделения почвой диоксида углерода («дыхание почвы»).

Русская школа микробиологов признана во всем мире. В предреволюционный период в России была заложена база для классификационно-систематических работ. Это направление исследований связано с именами выдающихся ученых — *Л. С. Ценковского, А. П. Артари* (1862-1919), *Г. А. Надсона* (1867-1940) и др.

В это же время определилось и второе научное направление — эколого-физиологическое. Среди его приверженцев выделяется *С. Н. Виноградский* (1856—1953), открывший хемосинтез у микроорганизмов. Он же установил усвоение молекулярного азота свободноживущими бактериями и провел оригинальные исследования по экологии почвенных микроорганизмов.

Другой крупнейший микробиолог — *В. Л. Омелянский* (1867—1928), ученик С. Н. Виноградского, изучал вопросы нитрификации, азотфиксации, распада целлюлозы, а также экологию микроорганизмов почвы. В. Л. Омелянский написал учебник «Основы микробиологии» (1909), переиздававшийся несколько раз. В 1923 г. он опубликовал первое практическое руководство по микробиологии.

Общеизвестно имя Д. *И. Ивановского* (1864—1920), открывшего фильтрующийся вирус и ставшего основоположником вирусологии. Много внимания ученый уделял и вопросам почвенной микробиологии: фиксации атмосферного азота, распаду белков, целлюлозы и т. д.

Усвоению бактериями молекулярного азота в почве и распространению бактерий в море были посвящены работы *Б. Л. Исаченко* (1871-1948).

Третье направление развития микробиологии может быть названо биохимическим. *В. И. Палладии* (1859—1922) и *С. П. Костычев* (1877—1931) выполнили классические исследования, изучая процессы дыхания и брожения. Большой вклад в выяснение трансформации микроорганизмами соединений, содержащих углерод, внес *В. С. Буткевич* (1872—1942), который получил также интересные результаты в области экологической (морской) микробиологии.

В 90-х гг. XIX столетия были организованы небольшие учреждения, разрабатывавшие вопросы сельскохозяйственной микробиологии. В Петербурге открылась Сельскохозяйственная микробиологическая лаборатория Департамента земледелия, директором ее был *М. Г. Тартаковский*. В Москве при Обществе акклиматизации животных и растений на частные пожертвования была создана Бактериолого-агрономическая станция, которую возглавил *С. А. Северин*.

Во многих городах, например в Москве, Харькове, Одессе, открылись медицинские микробиологические институты. В некоторых из них вели исследования по общей и сельскохозяйственной микробиологии. Так, в Институте экспериментальной медицины в Санкт-Петербурге были выполнены уже отмечавшиеся выше классические работы С. Н. Виноградского и В. Л. Омелянского.

Исследования по общей и сельскохозяйственной микробиологии были начаты и в ряде высших учебных заведений, где читали лекции по микробиологии. В 1894 г. курс микробиологии был введен в Петровской сельскохозяйственной академии (ныне Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева). Его читал *Н. Н. Худяков,* автор первого учебника по сельскохозяйственной микробиологии, опубликованного в 1926 г.

В первом десятилетии XX в. микробиология становится обязательным предметом для изучения в большинстве высших учебных заведений. В Петербургском университете преподавание курса общей микробиологии было начато Б. Л. Исаченко в 1906 г., в Московском университете — А. П. Артари в 1907 г.

Интерес к почвенной микробиологии привлекли выступления выдающихся почвоведов — *В. В. Докучаева, П. А. Костычева* и др. Причем В. В. Докучаев считал, что курс микробиологии должен быть введен незамедлительно во всех университетах страны.

В 20—30 гг. XX в. сеть биологических и сельскохозяйственных научно-исследовательских учреждений и высших учебных заведений в России значительно расширилась. В большинстве из них шли исследования в области микробиологии. Многие вузы уже имели кафедры микробиологии.

На современном этапе развития науки, техники и сельского хозяйства невозможно представить себе отрасль, где микробиологические процессы не имели бы значения. На свойствах и жизнедеятельности микроорганизмов основаны технологические процессы в различных отраслях промышленности и сельскохозяйственного производства. Микроорганизмы активно участвуют в круговороте веществ в природе. Возможно, именно они помогут решить проблемы питания, охраны окружающей среды.

Знания в области микробиологии способствуют формированию современного биологического мировоззрения у специалистов сельского хозяйства, что имеет большое значение для их успешной работы.

Возникает необходимость глубокого анализа характера микробиологических процессов, идущих в почвах, занятых сельскохозяйственными культурами; знания основных функций, присущих микроорганизмам; умения ориентироваться и оценивать возможные последствия воздействия тех или иных агротехнических приемов в целом на характер микрофлоры и деятельность микроорганизмов. В дальнейшем это позволит выбрать наиболее перспективные из них, успешно управлять процессами повышения плодородия почвы и урожайности сельскохозяйственных культур.

Современная агрономия представляет собой синтез новейших достижений биологической и сельскохозяйственной науки и практики. Без понимания сущности микробиологических процессов почвы, умения анализировать роль микроорганизмов, ответственных за их течение, немыслима успешная деятельность будущих аг-

рономов, а также совершенствование современных технологий выращивания сельскохозяйственных культур.

В результате освоения курса общей и сельскохозяйственной микробиологии агроном может направленно регулировать численность микроорганизмов и активность микробиологических процессов в почве, правильно и широко применять микробные препараты и продукты микробного синтеза, совершенствовать способы обработки почвы, внесения удобрений, мелиорации, оптимально чередовать сельскохозяйственные культуры, применять другие приемы технологии сельскохозяйственного производства.

Раздел 1

Общая микробиология

Глава 1

Морфология и ультраструктура клеток бактерий

Большинство микроорганизмов — одноклеточные существа. Микробная клетка обычно отделена от внешней среды клеточной стенкой (иногда лишь цитоплазматической мембраной) и содержит различные субклеточные структуры. Существуют два основных типа клеточного строения, различающиеся рядом фундаментальных признаков. Это эукариотные и прокариотные клетки. Микроорганизмы, имеющие истинное ядро, называют ***эукариотами*** (от греч. *eu* — истинный, *karyon* — ядро). Микроорганизмы с примитивным ядерным аппаратом относят к ***прокариотам*** — доядерным организмам.

К эукариотам принадлежат грибы, водоросли и простейшие. По строению они сходны с растительными и животными клетками. Бактерии, в том числе цианобактерии (синезеленые водоросли), относят к прокариотам. Особую группу прокариот составляют архебактерии (археи).

В эукариотной клетке есть ядро, отделенное от окружающей его цитоплазмы двухслойной ядерной мембраной с порами. В ядре находятся одно-два ядрышка — центры синтеза рибосомальной РНК и хромосомы. В прокариотных клетках[1] ядерная мембрана, ограничивающая генетический материал от цитоплазмы, отсутствует. ДНК в клетках такого строения не образует структур, похожих на хромосомы эукариот. Естественно, у прокариот не происходят и процессы митоза и мейоза. У большинства прокариот нет внутриклеточных органелл, ограниченных мембранами, они лишены также митохондрий и хлоропластов, эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи и лизосом.

1.1. Морфологические типы бактерий

Форма бактерий. Бактерии, как правило, — одноклеточные организмы, однако существует ряд форм, состоящих из многих кле-

[1] Ниже рассматривается строение только прокариотной (бактериальной) клетки, так как строение эукариотной клетки уже известно студенту из соответствующих курсов ботаники и зоологии.

Рис. 9. Диплококки. Электронная микрофотография (по: Р. С. Вильямс)

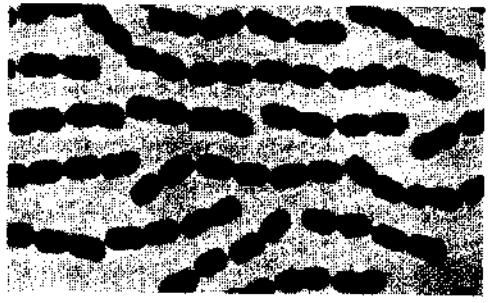


Рис. 10. Стрептококки. Электронная микрофотография (по: Д. Кун, П. Эдлеман)

ток. Форма клетки бактерии довольно проста, это может быть шар или цилиндр, иногда изогнутый. Размножаются бактерии преимущественно делением на две равноценные клетки. Бактерии шаровидной формы называют ***кокками*** (от лат. *coccus* — зерно). Кокки бывают сферическими, эллипсоидальными, бобовидными и ланцетовидными.

По расположению клеток относительно друг друга после деления кокки подразделяют на несколько форм. Те формы, которые после деления клетки расходятся и располагаются поодиночке, называют *монококками*. Иногда кокки при делении образуют скопления, напоминающие виноградную гроздь. Подобные формы относят к *стафиллококкам*. Кокки, остающиеся после деления в одной плоскости связанными попарно, называют *диплококками* (рис. 9), а образующие различной длины цепочки — *стрептококками* (рис. 10). Сочетания из четырех кокков, появляющиеся после деления клетки в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, представляют собой *тетракокки*. Некоторые кокки делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, что приводит к образованию своеобразных скоплений кубической формы, называемых *сарцинами*.

Большинство бактерий имеет цилиндрическую, или палочковидную, форму. Раньше все палочковидные формы назывались *бациллами* (от лат. *bacillum* — маленькая палочка). После 1875 г., когда немецкий ботаник Ф. Кон открыл существование спор[1] у так называемой сенной палочки, палочковидные спорообразующие формы стали именовать ***бациллами,*** а не образующие спор — ***бактериями.***

Палочковидные бактерии различают по форме, размерам в длину и в поперечнике, форме концов клетки, а также по взаимному расположению. Они могут иметь цилиндрическую форму с прямыми концами или овальную — с закругленными или заостренными

[1] *Споры* — особые покоящиеся клетки, окруженные плотными оболочками, образующиеся внутри бактериальных клеток.

концами. Бактерии бывают также слегка изогнутыми, встречаются нитевидные и ветвящиеся формы (микобактерии и актиномицеты).

В зависимости от взаимного расположения отдельных клеток после деления палочковидные формы подразделяют на *собственно палочки* (одиночное расположение клеток), *диплобактерии* или *диплобациллы* (парное расположение клеток), *стрептобактерии* или *стрептобациллы* (цепочки различной длины).

Нередко встречаются извитые, или спиралевидные, бактерии, характеризующиеся разным числом витков. К этой группе относят ***спириллы*** (от лат. *spira* — завиток), имеющие форму длинных изогнутых (от 4 до 6 витков) палочек, ***вибрионы*** (от лат. *vibrio* — изгибаюсь), представляющие собой лишь 1/4 часть витка спирали, похожие на запятую; особую группу представляют ***спирохеты*** — длинные и тонкие клетки с большим числом (от 6 до 15 и более) мелких витков (рис. 11). Кроме перечисленных выше основных, встречаются и иные формы. Так, обнаружены бактерии, несущие на поверхности

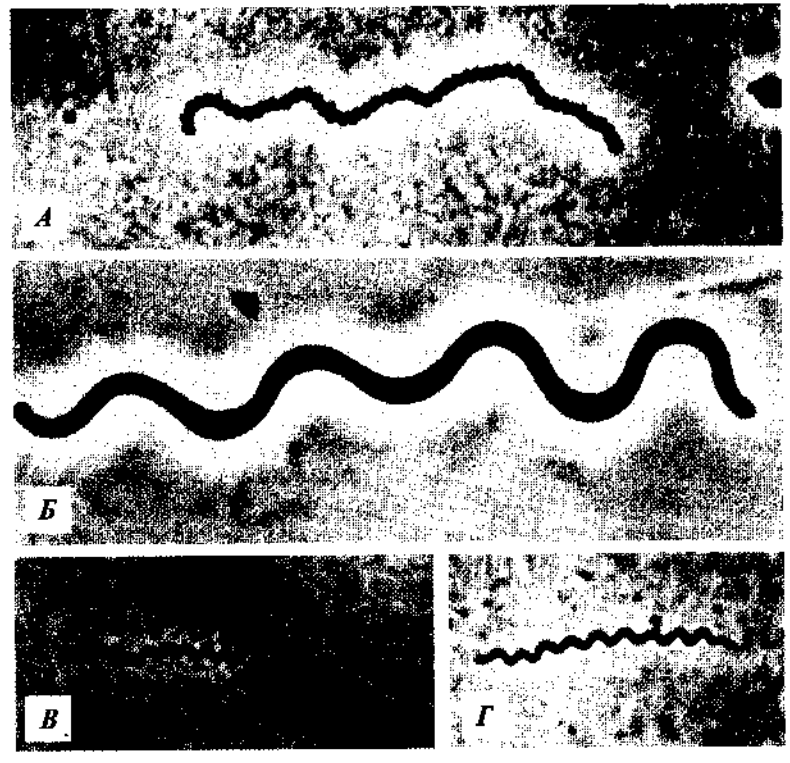


Рис. 11. Извитые (спиральные) бактерии — спирохеты *Spirochaeta plicatilis (А); Cristispira sp. (Б); Treponema pallidum (В); Borellia anserina (Г),* х2200 (по: Д. Кун)

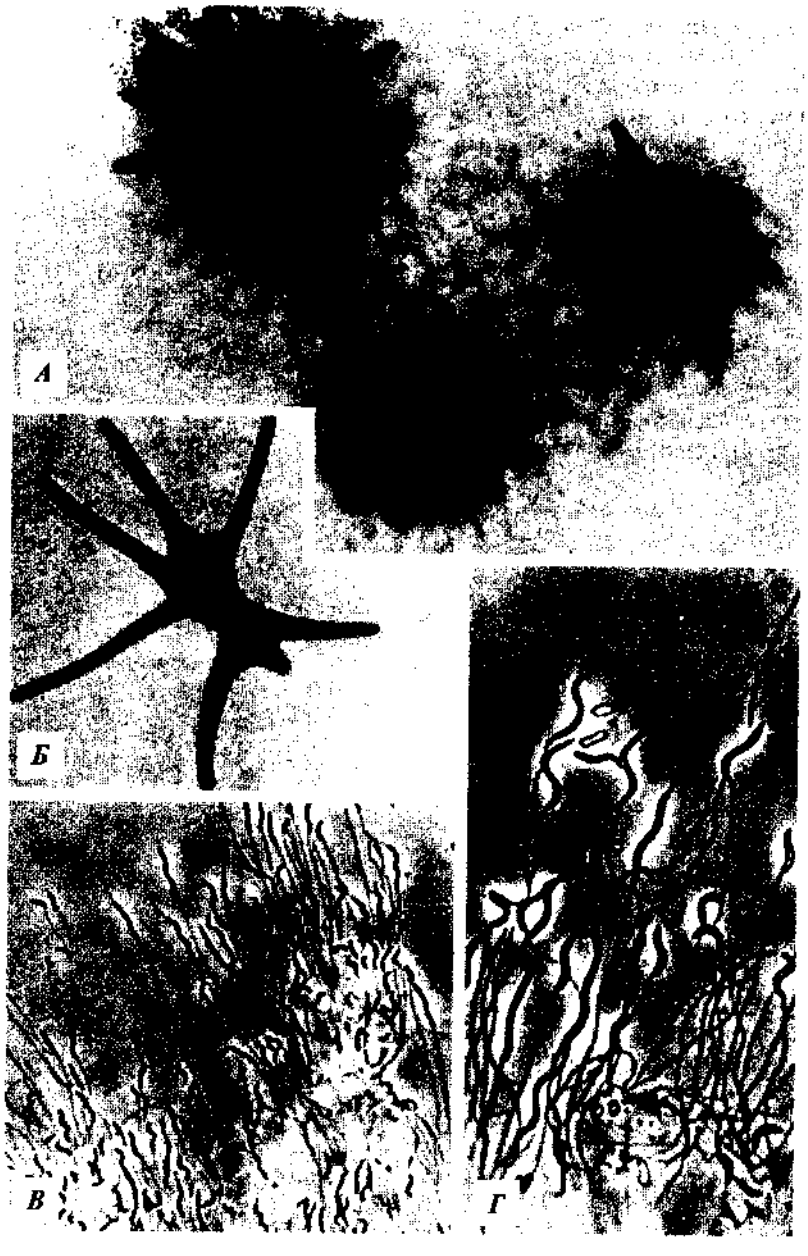


Рис. 12. Необычные формы микроорганизмов: *Prostecomkrobium pneumaticum(А); Anacalomicrobium adeum (Б)* (по: Д. Стейли); *В, Г— Thiodendron sp.* (по: Х. Хиппе)

клетки протоплазматические выросты — *простеки,* треугольные и звездообразные бактерии, а также имеющие форму замкнутого и незамкнутого кольца и червеобразные бактерии (рис. 12).

Многие бактерии образуют разного вида скопления, агрегаты. Известны и многоклеточные бактерии, чаще всего это нитчатые формы, обитающие в водоемах. К многоклеточным бактериям относят и мицелиальные микроорганизмы — актиномицеты.

Размеры бактерий. Клетки бактерий очень малы. Их измеряют в микрометрах (мкм), а детали тонкой структуры — в нанометрах (нм). Кокки обычно имеют диаметр около 0,5—1,5 мкм. Ширина палочковидных (цилиндрических) форм бактерий в большинстве случаев колеблется от 0,5 до 1 мкм, длина — от 2 до 10. Мелкие палочки обычно бывают шириной 0,2—0,4 мкм, длиной — 0,7—1,5. Среди бактерий встречаются и настоящие гиганты, длина которых достигает десятков и даже сотен микрометров.

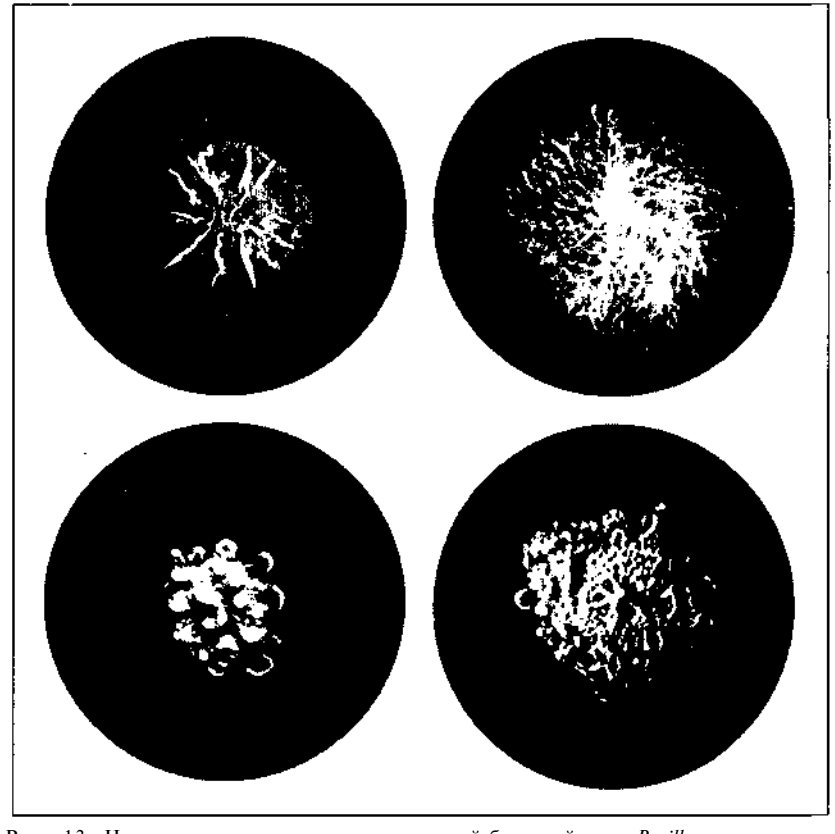


Рис. 13. Некоторые характерные типы колоний бактерий рода *Bacillus* на поверхности твердой питательной среды

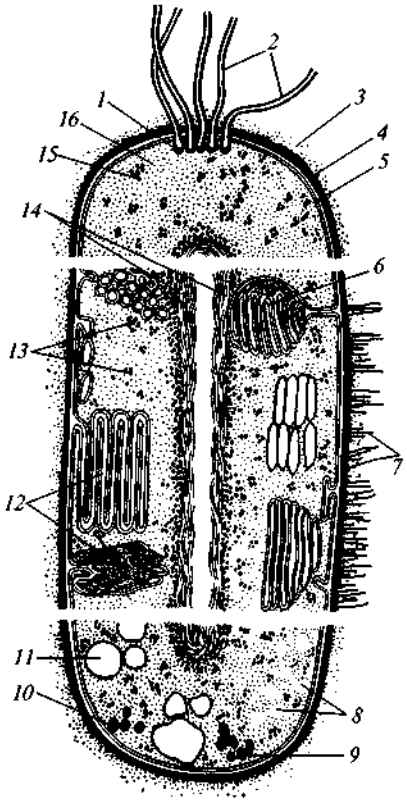


Рис. 14. Схема строения бактериальной клетки (по: Г. Шлегель): *вверху* — основные структуры бактериальной клетки: *в центре* — мембранные структуры *(слева* — фотосинтезирующего микроорганизма, *справа* — нефотосинтезирующего); *внизу* — резервные вещества, или включения: */* — базальное тельце; *2* — жгутики; *3* — капсула; *4* — клеточная стенка; *5* — цитоплазматическая мембрана; *6* — мезосома; 7 — фимбрии; *8* — полисахаридные капсулы; *9* — гранулы полифосфатов; *10* — липидные капли; *11* — включения серы; *12, 13* — мембранные структуры: ламеллы, хроматофоры; *14* — нулеоид; */5* — рибосомы; *16* — цитоплазма

Формы и размеры бактериальных микроорганизмов значительно колеблются в зависимости от возраста культуры, состава среды и ее осмотических свойств, температуры и других факторов. Из трех основных форм бактерий кокки наиболее стабильны по размерам, палочковидные бактерии несколько изменчивее, причем особенно значительно меняется длина клеток.

Бактериальная клетка, помещенная на поверхности твердой питательной среды, растет, делится, образуя *колонию* бактерий-потомков. Через несколько часов роста колония состоит уже из такого большого числа клеток, что ее можно видеть невооруженным глазом. Колонии бывают слизистой или пастообразной консистенции, в некоторых случаях они пигментированы. Иногда внешний вид колонии настолько характерен, что позволяет без особых трудностей идентифицировать микроорганизм (рис. 13).

1.2. Ультраструктура бактериальной клетки

Бактериальная клетка, несмотря на внешнюю простоту строения, представляет собой довольно сложный организм, которому свойственны процессы, характерные для всего живого.

Ультраструктуру бактерий удалось детально изучить после создания электронного микроскопа с высокой разрешающей способностью, разработки технологии ультратонких срезов клеток, появления фазово-контрастной, конфокальной, лазерной и других методов микроскопии, усовершенствования методов микрохимических анализов. Перечисленные методы позволили исследовать как поверхностные, так и внутренние структуры бактерий.

К внешним структурам бактериальной клетки обычно относят капсулы, жгутики, фимбрии и пили, а также клеточную стенку, под которой расположена цитоплазматическая мембрана. Внутреннее содержание бактерий представлено цитоплазмой, в которой находятся нуклеоид, рибосомы и мембранные структуры, а также разнообразные включения (рис. 14). Бациллы и некоторые другие бактерии образуют споры.

Капсулы. Клетки большинства бактерий окружены слизистым слоем, расположенным поверх клеточной стенки, — капсулой (рис. 15). Встречаются *макрокапсулы* с толщиной слоя 0,2 мкм, *микрокапсулы* со слоем менее 0,2 мкм, а также *слизистый слой* и *растворимая слизь*.

По химическому составу капсулы большинства бактерий можно разделить на два типа. Одни представлены полисахаридами, другие — полипептидами. Однако существуют и капсулы с высоким содержанием липидов, гетерополисахаридов и других веществ. Некоторые бактерии, например уксуснокислые *(Acetobacter xylinum),* способны синтезировать своеобразную капсулу, состоящую из аморфной массы молекул целлюлозы.

Капсулы содержат до 98% воды, что составляет дополнительный осмотический барьер, они также защищают клетку от механических повреждений и высыхания. Капсулы служат защитой клетки от действия токсических веществ и радиации, для болезнетворных форм — от защитных сил макроорганизма — фагоцитов, других неблагоприятных факторов окружающей среды.

Замечено, что бактерии, имеющие капсулы, способны жить в такой среде, в которой рост бактерий без капсул ограничен.

Жгутики. Существуют два основных типа подвижных бактерий: *скользящие* и *плавающие*. Скольжение наблюдается у миксобактерий, серных бактерий, цианобактерий и др. Эти организмы способны скользить по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений клетки.

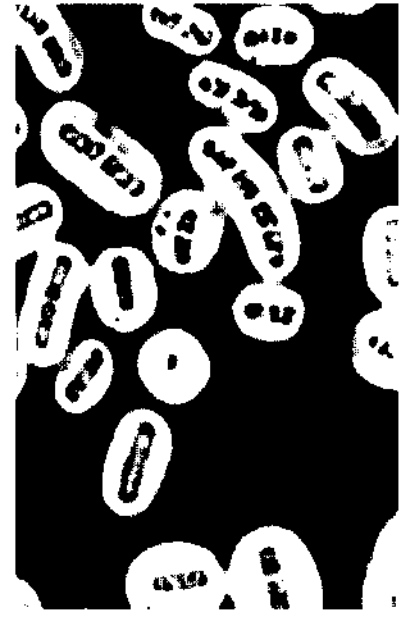


Рис. 15. Капсулы *Bacillus megaterium,* х2160 (по: С. Робиноу)

Плавающие палочковидные бактерии передвигаются при помощи особых нитевидных структур — жгутиков. Так двигается большинство спирил, энтеробактерий, псевдомонад. Кокки, за исключением отдельных видов, жгутиков не имеют.

Бактерию с одним жгутиком называют *монотрихом;* с пучком жгутиков на одном конце клетки — *лофотрихом;* на обоих концах — *амфитрихом;* со жгутиками, расположенными по всей поверхности клетки, — *перитрихом* (рис. 16).

Таким образом, ясно, что число жгутиков неодинаково у разных видов бактерий. Например, спириллы *{Spirillum)* имеют от 5 до 30 жгутиков, вибрионы (*Vibrio)* — один или два-три жгутика на полюсе клетки. У палочковидных бактерий *Proteus vulgaris* и *Clostridium tetani* насчитывается от 50 до 100 жгутиков. Толщина жгутиков колеблется от 12 до 20 нм (более сложно устроенные жгутики имеют толщину до 35 нм), длина — от 10 до 20 мкм. У некоторых спирилл жгутики могут достигать в длину 70 мкм и более, причем длина может меняться в зависимости от состояния культуры и факторов внешней среды.

Жгутики хорошо видны в электронный микроскоп, для наблюдения через оптический микроскоп требуется их специальная обработка. Считают, что жгутики не относятся к жизненно важным структурам бактериальной клетки. Например, виды бактерий, для которых характерны жгутики, можно вырастить в условиях, при которых эти структуры не развиваются. У некоторых подвижных бактерий наблюдаются «фазовые вариации», т. е. в течение одной фазы цикла развития бактерии жгутики имеются, в другой — отсутствуют. Жгутики даже можно разрушить, а клетка останется жизнеспособной.

В строении жгутика можно выделить нить, крюк и базальное тельце, расположенное под цитоплазматической мембраной. Жгутиковая нить волнообразно изогнута и состоит из белка флагеллина. Белковые молекулы жгутиков собраны в спиральные цепи, закругленные вокруг полой сердцевины. Крюк жгутика представляет собой изогнутый белковый цилиндр. Он служит связующим звеном между жесткой нитью и базальным телом, соединяясь с палочкой, или осью, входящей в состав базального тельца. Последняя состоит из двух или четырех колец, встроенных в клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану бактерии, цилиндра и палочки-оси, на которой крепятся кольца и основание крюка.

Жесткая спираль нити жгутика вращается в результате работы базального тела, представляющего собой своеобразный электромотор. Считают, что вращение жгутика определяется кольцом, расположенным в цитоплазматической мембране, в то время как другие кольца базального тела неподвижны и служат для крепления в клеточной стенке палочки-оси, через которую вращение кольца передается на крюк, а затем на нить жгутика.

Рис. 16. Бактерии с разными типами жгутикования. Электронная микрофотография

Энергетика вращения жгутика обеспечивается трансмембранной протондвижущей силой Д $цH^+$ в соответствии с механизмом, описанным в главе «Питание микроорганизмов». Предполагают, что на один оборот мотора расходуется энергия переноса примерно 10^3 протонов. Основание жгутика, вероятно, вращается так, что последний как бы ввинчивается в среду, не совершая беспорядочных биений, и таким образом продвигает клетку вперед.

Скорость передвижения бактериальных клеток со жгутиками зависит от особенностей аппарата движения и свойств среды — ее вязкости, температуры, pH, осмотического давления и др. Большинство бактерий за 1 с проходит расстояние, равное размерам их клетки. Однако некоторые виды при благоприятных условиях за то же время могут пройти расстояние, превышающее размеры клетки в 50 раз и более.

Все подвижные бактерии передвигаются в направлении, которое определяется теми или иными внешними воздействиями. Движение, ориентированное относительно направления действия какого-либо фактора, носит название таксиса. В зависимости от природы внешнего фактора, под воздействием которого происходит движение, различают хемотаксис, аэротаксис, фототаксис, термотаксис, магнетотаксис и вискозитаксис.

Хемотаксис — это движение бактерий в определенном направлении относительно того или иного источника химического соединения — эффектора. Бактерии определяют наличие разницы в концентрации эффектора в пространстве и во времени. Химические соединения для каждой бактерии можно подразделить на вещества, не вызывающие таксисов, и на эффекторы — аттрактанты и репелленты. Аттрактанты — соединения, привлекающие организмы, репелленты — вещества, их отпугивающие. Аттрактанты большей частью представлены пищевыми субстратами, а репелленты — ядовитыми соединениями.

Аэротаксис связан с разницей содержания в среде кислорода, а *термотаксис* — с разницей температур. При *фототаксисе* условием направленного движения бактерий служит различие в интенсивности освещения. Фототаксис обнаруживается прежде всего у фототрофных бактерий.

Магнетотаксис — это способность бактерий двигаться по силовым линиям магнитного поля Земли. В клетках этих организмов имеются включения магнетита, выполняющие функцию магнитной стрелки. Если в Северном полушарии магнетобактерии плывут в направлении Северного полюса, то в Южном — в направлении Южного. *Вискозитаксис* — это реакция бактерий на изменение вязкости раствора: они способны плыть в направлении ее увеличения или снижения. Считают, что таксисы можно рассматривать как элементарную форму поведения бактерий.

Фимбрии и пили. Кроме жгутиков, клетки бактерий могут иметь длинные, тонкие и прямые нити — фимбрии. Фимбрии значительно короче и тоньше жгутиков, но более многочисленны. Обнаружены они как у подвижных, так и у неподвижных организмов. Длина фимбрии составляет 1,5 мкм, диаметр — 7 нм. На одну бактериальную клетку обычно приходится 50—400 фимбрии. Они располагаются по всей поверхности клетки и состоят из белка — пилина.

Известно уже несколько типов фимбрии, которые различаются функциями. Наиболее изучены функции фимбрии первого и второго типов. Фимбрии первого типа характерны для многих бактерий, в связи с чем их называют фимбриями общего типа. Наличие фимбрии первого типа помогает бактериальной клетке прилипать к клеткам живых организмов (эритроцитам и другим клеткам животных и человека, к клеткам растений и грибов) и неорганическим субстратам или способствует образованию пленок на поверхности жидкостей, в которых протекает жизнедеятельность бактерий. Считают, что фимбрии данного типа служат органами прикрепления (рис. 17).

Большой интерес представляют фимбрии второго типа, так называемые половые фимбрии, или F-пили, имеющие внутри канал, через который передается генетический материал от одной клетки к другой при конъюгации бактерий. Половые пили представляют собой белковые цилиндры толщиной 8,5—9,5 нм и длиной до 1,1 мкм. Полагают, что F-пили обеспечивают контакт между двумя клетками и служат конъюгационной трубкой, по которой происходит передача ДНК. Через пили в клетки бактерий могут проникать вирусы (фаги). Фимбрии не считают обязательной струк-

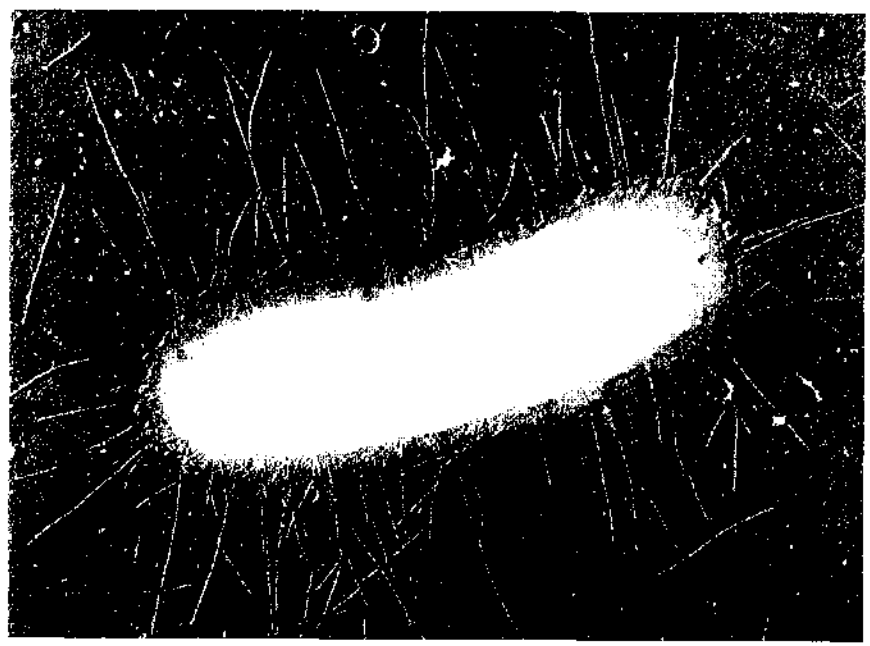


Рис. 17. Клетка *Escherichia coli*, окруженная фимбриями. Электронная микрофотография

турой бактериальной клетки, так как без них бактерии могут нормально расти и размножаться.

На поверхности клеток некоторых бактерий, близких к псевдомонадам, обнаружены своеобразные структуры, так называемые *шипы*. Они представляют собой полые цилиндры длиной 1—3 мкм и толщиной около 65 нм. Шипы состоят из белка спинина. Бактерии с шипами обычно неподвижны. Считают, что образование шипов способствует лучшему выживанию бактерий в естественной среде обитания. У ряда метилобактерий обнаружены *трубчатые выросты,* число которых может достигать 300—350. Диаметр трубочек около 40 нм, длина до 0,3 мкм. Основание трубочки связано с клеточной стенкой бактерии, но под трубочкой имеется канал, который достигает цитоплазматической мембраны. Значение трубчатых выростов для жизнедеятельности бактерий остается пока не выясненным.

Клеточная стенка — один из главных элементов структуры бактериальной клетки. Клеточная стенка обладает определенной ригидностью, т. е. жесткостью, и вместе с тем эластичностью — может изгибаться. Ее можно разрушить ультразвуком, ферментом лизоцимом и другими способами. В случае разрушения клеточной стенки содержание клетки — цитоплазма с включениями, окруженная цитоплазматической мембраной, — приобретает шаровидную форму. Такую округлившуюся клетку, образовавшуюся после удаления клеточной стенки у бактерии, называют *протопластом,* а если оболочка разрушена не полностью — *сферопластом.* Отсюда следует, что стенка придает бактериальной клетке определенную форму.

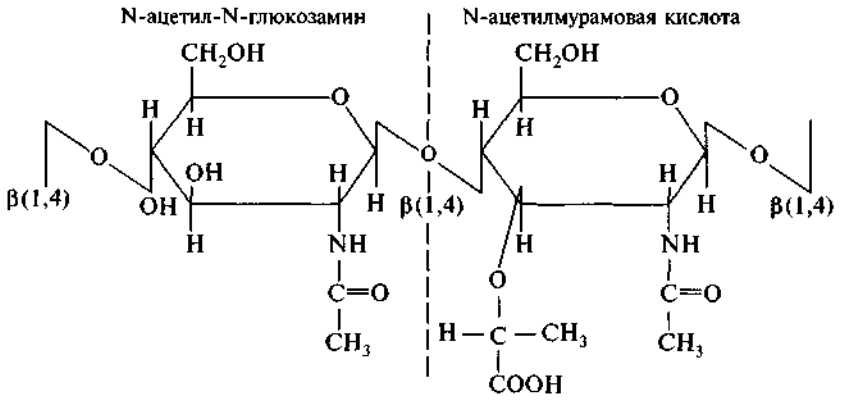
Клеточная стенка имеет и другие функции. Она защищает внутреннее содержимое клетки от действия механических и осмотических сил внешней среды, ей принадлежит важная роль в регуляции роста и деления бактерий, распределении генетического материала.

Толщина клеточной стенки колеблется от 20 до 100 нм и более и составляет около 20% сухого вещества бактериальной клетки. Клеточная стенка относительно проницаема для крупных молекул. Она связана с цитоплазматической мембраной соединительными тяжами — «мостиками».

Считают, что клеточная стенка ответственна за окрашивание бактерий по Граму[1], так как способность или, наоборот, неспособность окрашиваться по Граму связана с различием в химическом составе клеточных стенок бактерий.

[1] Так называется способ окраски, разработанный датским ученым *Х. Грамом* в 1884 г., позволяющий дифференцировать бактерии. После окраски генцианвиолетом и обработки раствором иода клетки одних видов бактерий обесцвечиваются спиртом, других — остаются окрашенными в сине-фиолетовый цвет. По данному признаку бактерии разделяют на окрашивающиеся по Граму — грамположительные и не окрашивающиеся — грамотрицательные.

Главным структурным компонентом клеточных стенок большинства исследованных бактерий служит пептидогликан, или мурейн, представляющий собой гетерополимер, который построен из чередующихся остатков N-ацетил-N-глюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты (3-О-лактил-N-ацетил-N-глюкозамин), соединенных β-1,4-связями, и небольшой группы аминокислот: L-аланина, D-аланина, D-глутаминовой кислоты, а также лизина или диаминопимелиновой кислоты.



Молекула пептидогликана представляет собой правильную сеть из параллельно расположенных полисахаридных цепей, соединенных друг с другом короткими цепями пептидов. Пептидогликан обладает прочностью и упругостью, при растворении других компонентов клетки он сохраняет форму, образуя своеобразный пептидогликановый, или муреиновый, мешочек, или саккулу, которая состоит из сетки муреиновых молекул.

Пептидогликан придает клеточной стенке ригидные свойства, благодаря чему бактериальная клетка способна сохранять форму. У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит главным образом из многослойного пептидогликана, с которым соединены вторичные полимеры — тейхоевые кислоты (полимеры, образованные остатками спирта рибита или глицерина, связанными фосфодиэфирными мостиками) и тейхуроновые кислоты, образованные остатками уроновых кислот и N-ацетилглюкозамина.

Большинство грамположительных бактерий имеет в составе клеточной стенки дополнительные структуры, образованные полисахаридами, белками или гликопротеидами, участвующими в защите клетки от внешних воздействий. У грамположительных бактерий пептидогликан обычно составляет 40—60% сухой массы клеточной стенки, у некоторых видов — 80—90%. Обычная для многих бакте-

рий толщина клеточной стенки в 30—40 нм соответствует толщине приблизительно 40 молекул пептидогликана.

Отличительная особенность клеточной стенки грамотрицательных бактерий — наличие так называемой наружной мембраны. Наружная мембрана состоит из фосфолипидов, липополисахарида (ЛПС), липопротеина (ЛП) и белков. Под наружной мембраной расположена периплазма, или периплазматическое пространство. Периплазма содержит один слой пептидогликана и раствор, в состав которого входят специфичные для нее белки и олигосахариды, а также неорганические соединения. Пептидогликан грамотрицательных бактерий составляет около 10% массы клеточной стенки. Толщина слоя пептидогликана обычно не превышает 1,6—3 нм, а поскольку толщина мономолекулярного слоя пептидогликана около 1 нм, следует предположить, что пептидогликан в периплазме образует несколько слоев.

Таким образом, неодинаковое отношение бактерий к окраске по Граму может быть объяснено различием в количестве пептидогликана и его локализацией в клеточной стенке.

Клеточной стенки нет у микоплазм, а также у L-форм бактерий. Обычно как **L-формы** обозначают бактерий, способных к нормальному развитию при отсутствии клеточной стенки. Наименование «L-формы» (от названия Листеровского института в Великобритании, где были впервые изучены) получили бактерии, полностью или частично лишенные клеточной стенки. Переход бактерий в L-форму осуществляется под действием различных факторов (антибиотиков, например пенициллина, или спонтанно, без видимой причины), нарушающих структуру и синтез клеточной стенки.

В культуре L-формы можно обнаружить клетки размером 0,2—50 мкм. В связи с отсутствием клеточной стенки у L-форм нет определенной формы и не функционируют нормальные механизмы клеточного деления. Поэтому в колониях этих организмов обычно обнаруживают так называемые элементарные тела размером 0,2—1 мкм, шаровидные тела размером 1—5 мкм, большие тела размером 5—50 мкм, нитевидные структуры различного диаметра, а также бесструктурные массы, в которых границы отдельных клеток не видны. Считают, что образование L-форм происходит не только в лабораторных, но и в природных условиях, причем к образованию L-форм способны многие бактерии — как патогенные, так и сапротрофные.

Интересно отметить, что, хотя бактерии в L-форме менее активны, чем в нормальном состоянии, они совершенно нечувствительны к факторам, влияющим на клеточную стенку, в частности устойчивы к целому ряду антибиотиков. По-видимому, переход в L-форму необходимо рассматривать как способ переживания бактериями неблагоприятных условий.

Цитоплазматическая мембрана. К клеточной стенке бактериальной клетки тесно прилегает внешний слой цитоплазмы — цитоплазматическая мембрана. Цитоплазматическая мембрана бактерий служит главным барьером между цитоплазмой клетки и окружающей внешней средой. При разрушении цитоплазматической мембраны бактериальная клетка погибает. В основе цитоплазматической мембраны лежит бислой липидов. Липиды составляют 15—50% сухой массы цитоплазматической мембраны. Основная масса мембранных липидов (70—90%) бактерий представлена фосфолипидами. Около 50% поверхности цитоплазматической мембраны составляют мембранные белки. Они полностью или частично погружены в липидный бислой, некоторые белки располагаются на его поверхности.

Общая толщина мембраны составляет приблизительно 7—8 нм. По структуре и функциям цитоплазматические мембраны бактерий в целом сходны с мембранами эукариотных клеток. Цитоплазматическая мембрана играет роль осмотического барьера, контролирующего транспорт веществ в бактериальную клетку и из нее. Нередко мембрана дает внутрицитоплазматические впячивания (инвагинации), приводящие к образованию особых структур — мезосом, или нуклеоидосом.

Мезосомы — это мембранные системы, состоящие из трубочек, пузырьков и пластинок. Наиболее обычный тип мезосом — мембранные кольцевые впячивания цитоплазматической мембраны, расположенные в зоне образования клеточной перегородки в клетках бактерий при делении.

Во время клеточного деления мезосома связывается с ДНК, что, по-видимому, облегчает разделение двух дочерних молекул ДНК после репликации и обусловливает образование перегородки между дочерними клетками.

Считают, что цитоплазматическая мембрана и мезосомы выполняют функции, свойственные мембранным структурам, в том числе митохондриям высших организмов, в которых или на которых локализованы ферментные системы — поставщики энергии. В отличие от митохондрий в цитоплазматической мембране и мезосомах бактерий наряду с дыхательными системами ферментов и механизмом регуляции проницаемости располагаются специфичные ферментные системы, участвующие в таких процессах, как азотфиксация и хемосинтез.

С цитоплазматической мембраной, мезосомами и близкими им структурами бактерий связаны и многие другие функции — биосинтез клеточной стенки и капсулы, выделение экзоферментов, деление и спорообразование и т. д.

Цитоплазма. Под цитоплазматической мембраной у бактерий находится цитоплазма. Это коллоидная система, состоящая из воды,

белков, жиров, углеводов, минеральных соединений и других веществ, соотношение которых варьирует в зависимости от вида бактерий и их возраста. Цитоплазма бактерий содержит различные структурные элементы — внутрицитоплазматические мембраны, генетический аппарат, рибосомы и включения; остальная часть ее представлена цитозолем.

Цитозоль — это фракция цитоплазмы, которая имеет гомогенную консистенцию и состоит главным образом из белковых макромолекул (растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов различных реакций). Цитозоль служит поддерживающей средой для клеточных гранул. По структуре цитоплазма мелкогранулярная, состоит из цитоплазматических гранул диаметром 10—20 нм. В цитоплазме находятся *рибосомы* — частицы, состоящие из РНК (60%) и белка (40%) и имеющие форму круглых или несколько удлиненных структур диаметром около 20 нм.

Каждая бактерия содержит от нескольких тысяч до десятков тысяч этих центров синтеза белков. Число рибосом в клетке меняется в зависимости от скорости роста бактерии — чем быстрее рост, тем больше рибосом в клетке. Значительная часть рибосом связана с цитоплазматической мембраной, остальные свободно распределяются в цитоплазме.

Рибосомы совместно с молекулами РНК и ДНК участвуют в синтезе белка не как изолированные частицы, а в виде агрегатов, называемых *полирибосомами,* или *полисомами.*

В клетках цианобактерий присутствуют так называемые *тилакоиды* — внутриклеточные мембранные фотосинтезирующие структуры, содержащие хлорофилл и каротиноиды, при помощи которых осуществляется фотосинтез. Особые светособирающие пигменты — фикобилины, находятся в специальных структурах, *фикобилисомах,* располагающихся на поверхности тилакоидов. У пурпурных серобактерий фотосинтезирующие пигменты (бактериохлорофилл и каротиноиды) локализованы в *хроматофорах,* составляющих от 40 до 50% массы клетки.

Мембранные структуры хроматофора имеют вид трубочек и пузырьков диаметром 20—100 нм. Трубочки и пузырьки образуют в клетке сложную мембранную сеть и на многих участках сохраняют связь с цитоплазматической мембраной. У зеленых бактерий светособирающие пигменты, участвующие в фотосинтезе, содержатся в особых структурах, называемых *хлоросомами.*

У большинства нитрифицирующих и метаноокисляющих бактерий имеются сильно развитые системы внутриклеточных мембран. Характер строения этих структур и их расположение в клетке неодинаковы у разных видов нитрифицирующих бактерий: стопки ламелл (пластинок) могут быть расположены параллельно клеточной стенке, в центре клетки или у одного из полюсов.

У метаноокисляющих бактерий обнаруживаются как дисковидные стопки мембран, распределенные по всей цитоплазме, так и пластинчатые образования, расположенные параллельно клеточной стенке. Предполагают, что мощно развитая внутриклеточная сеть мембранных структур связана с использованием указанными бактериями газообразных соединений: увеличение активной поверхности мембран обусловливает повышение локальной концентрации газов, при этом происходит пространственное сближение их с молекулярным кислородом и ферментами, участвующими в окислительных процессах.

Включения. В цитоплазме клеток бактерий часто содержатся гранулы различной формы и размеров. Их присутствие нельзя рассматривать как постоянный признак микроорганизма, обычно они в значительной степени связаны с физическими и химическими условиями среды обитания. Разнообразные включения не являются структурами, абсолютно необходимыми для жизнедеятельности бактерий, и могут присутствовать в клетках или отсутствовать. Природа и функции включений существенно различаются. Некоторые из включений окружены белковой мембраной.

Примером подобных включений служат газовые вакуоли — *аэросомы.* Они образованы скоплениями газовых пузырьков, заполненных газом, состав которого соответствует таковому окружающей среды. Газовые вакуоли встречаются у разных групп бактерий, в основном у водных видов. Функция газовых вакуолей заключается в обеспечении плавучести водных бактерий, регулирующих при помощи аэросом глубину погружения, выбирая оптимальные условия существования. Перемещение по направлению к верхним или нижним слоям воды происходит в результате увеличения или уменьшения (сжатия) пузырьков.

К включениям относят внутрицитоплазматические гранулы запасных веществ, образованные соединениями, служащими для микроорганизмов источниками энергии и углерода. Такие соединения обычно образуются, когда микроорганизм получает достаточное количество питательных веществ, и используются, когда он попадает в неблагоприятные в отношении питания условия. Как резервные в клетках бактерий могут накапливаться питательные вещества, состоящие из полисахаридов — *гранулы гликогена* или *гранулезы* (близкого к амилопектину полисахарида). При недостаточном поступлении углеродсодержащих веществ в питательную среду гранулы гликогена или гранулезы постепенно исчезают из клеток бактерий.

Существуют бактерии, запасающие одно вещество, два или целый ряд соединений. Природа запасаемого субстрата определяется видом бактерий и условиями их культивирования. Обычно накопление полисахаридных гранул стимулируется недостатком азота при избытке углеводов.

Многие бактерии в качестве резервного вещества синтезируют *поли-В-гидроксимасляную кислоту* (ПОМ) (полиэфир-*В*-оксимасляной кислоты). В клетках бактерий ПОМ локализована в округлых, иногда продолговатых, гранулах различного размера, окруженных белковой мембраной. Если поместить клетки, содержащие ПОМ, в среду без источников углерода и энергии, они начинают энергично использовать ПОМ. Бактерии, богатые ПОМ, в таких условиях дольше сохраняют жизнеспособность, чем клетки, лишенные данного вещества.

У некоторых видов бактерий в клетках накапливаются гранулы *жира* и *волютина*. Волютиновые гранулы, называемые еще *метахроматическими гранулами,* состоят преимущественно из полифосфатов и служат местом запасания фосфора. В то же время полифосфаты имеют макроэргические связи и служат в качестве депо энергии. Волютин представлен в крупных, хорошо видимых гранулах, образующихся в больших количествах на средах, богатых глицерином или углеводами.

В клетках серных бактерий встречаются включения *серы,* которая образуется в результате окисления сероводорода. Ее можно обнаружить непосредственно в цитоплазме в виде блестящих полужидких капелек. Включения серы для аэробных тионовых бактерий, окисляющих сероводород, служат источником энергии. Некоторые серные бактерии наряду с капельками серы откладывают в клетках зернышки аморфного карбоната кальция, роль которого пока не выяснена.

В клетках цианобактерий, ряда других фототрофных и хемолитоавтотрофных бактерий обнаружены ромбовидные или шестигранные включения, названные *карбоксисомами,* или полиэдральными телами. Данные структуры состоят в основном из молекул D-рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы — главного фермента, катализирующего фиксацию углекислоты. Предполагают, что в этих структурах осуществляется процесс связывания CO_2. Обнаружены и другие включения в клетках бактерий — это *рапидосомы, R-тела, магнитосомы.* Последние присутствуют в клетках бактерий, обладающих магнитотаксисом, т. е. перемещающихся вдоль линий магнитного поля. Магнитосомы — структуры, представляющие собой частицы Fe_3O_4, окруженные белковой мембраной. В клетках бактерий магнитосомы могут существенно различаться по форме, числу и характеру распределения.

В цитоплазматическом матриксе содержатся также растворимые белки, различные ферменты, РНК, пигменты и низкомолекулярные соединения — углеводы, аминокислоты и нуклеотиды. Наличие в цитоплазме низкомолекулярных соединений обусловливает разность в осмотическом давлении клеточного содержимого и внешней среды. Величина внутриклеточного осмотического давления значительно варьирует у разных микроорганизмов.

Нуклеоид. В цитоплазме бактериальных клеток расположена структура, эквивалентная ядру и называемая нуклеоидом (рис. 18). Нуклеоиды бактерий содержат ДНК, молекулярная масса которой колеблется от $0{,}45 \cdot 10^9$ у микоплазм до $2{,}9 \cdot 10^9$ у спорообразующих бактерий и энтеробактерий, что значительно меньше молекулярной массы ДНК эукариот. Установлено, что бактериальная ДНК по форме представляет собой свернутую в кольцо нить длиной 1,1—1,6 мм, называемуютакже*бактериальнойхромосомой*.

В покоящейся бактериальной клетке обычно содержится один нуклеоид; клетки, находящиеся в фазе, предшествующей делению, имеют два нуклеоида; в фазе логарифмического роста — размножения — до четырех и более.

Количество ДНК в клетке кишечной палочки определяется скоростью роста — обычно у быстрорастущих клеток на хромосоме видно несколько репликационных вилок; клетки могут содержать и несколько нуклеоидов. У ряда бактерий в клетке может быть не одна, а много хромосом. Например, вегетативные клетки *Bacillus subtilis* имеют от двух до девяти хромосом и соответственно несколько нуклеоидов. Для многих цианобактерий характерны множественные хромосомы. Содержание ДНК у бактерий определяется в значительной мере размерами клетки — чем больше клетка, тем больше ДНК.

ДНК бактерий и объединенные с ней системы репликации, репарации, транскрипции и трансляции не отделены от остальной части клетки мембраной, так как у прокариот отсутствует ядерная оболочка. Однако у большинства бактерий выявляется четко отделенная от цитоплазмы центральная ядерная зона, где расположены нуклеоид или нуклеоплазма. По имеющимся наблюдениям, у грамположительных бактерий нуклеоид более компактен и занимает от-

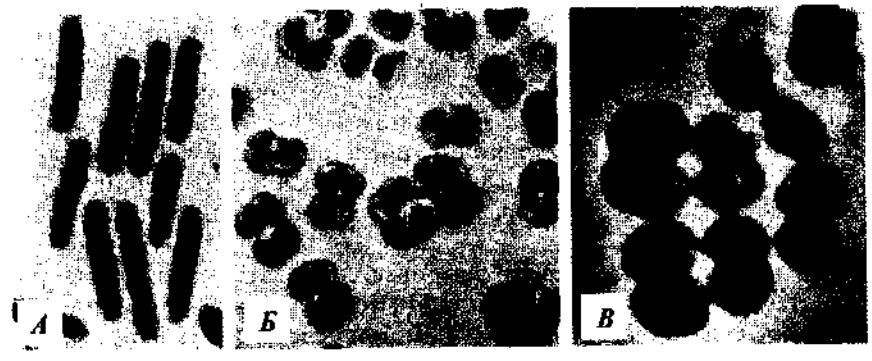


Рис. 18. Ядерные структуры бактерий: *А — Bacillus cereus, Б, В — Micrococcus radiodurans,* штамм «Sark» (по: С. Робиноу)

носительно меньшую часть объема клетки, чем у грамотрицательных. Нуклеоид связан с мембраной (число точек связи может достигать 20 и более), у грамположительных бактерий — с мезосомой (нуклеоидосомой).

Нуклеоид бактерий — основной носитель информации о свойствах клетки и основной фактор передачи этих свойств потомству. Кроме нуклеоида, в цитоплазме бактериальной клетки могут находиться в сотни раз более короткие кольцевые нити ДНК — так называемые внехромосомные факторы наследственности, получившие название *плазмиды*. Как выяснено, плазмиды не всегда имеются у бактерий. Однако их присутствие обеспечивает дополнительные, полезные для организма свойства, в частности связанные с размножением, устойчивостью к лекарственным препаратам, болезнетворностью и др.

1.3. Споры и спорообразование

Бактерии родов *Bacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporolactobacillus, Sporosarcina* и некоторых других (всего описано более 15 родов спорообразующих бактерий) способны образовывать ***споры,*** или *эндоспоры,* — внутриклеточные тельца сферической или эллиптической формы (рис. 19). Споры преломляют свет и четко видны в световом микроскопе. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора. Однако у отдельных видов *Clostridium* и других родов бактерий обнаружены клетки с двумя и более спорами.

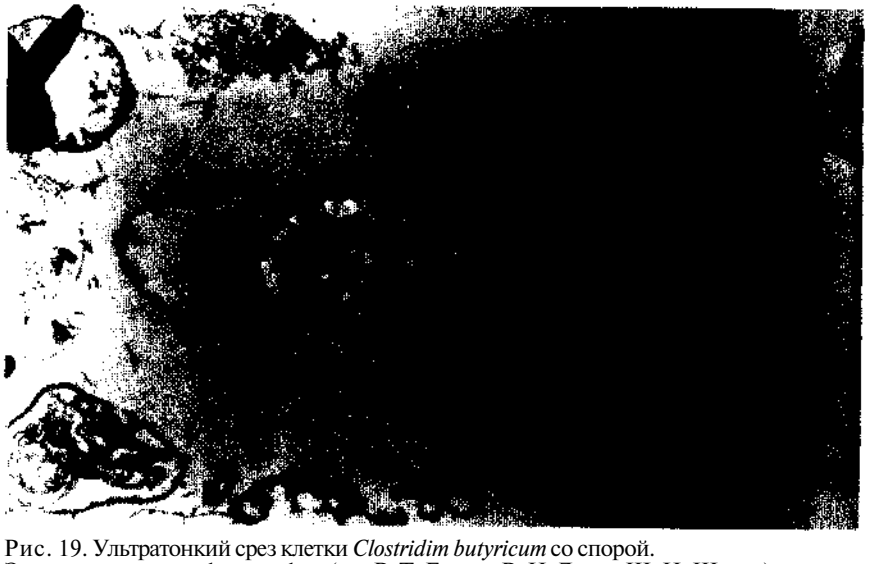


Рис. 19. Ультратонкий срез клетки *Clostridim butyricum* со спорой. Электронная микрофотография (по: В. Т. Емцев, В. И. Дуда и Ш. И. Шелли)

Выделена бактерия *Anaerobacter polyendosporus,* клетки которой содержат от двух до пяти эндоспор.

При формировании спор увеличения числа организмов не происходит, поэтому спорообразование нельзя считать способом размножения бактерий. Обычно споры появляются, когда бактерии испытывают недостаток питательных веществ или в среде их обитания в большом количестве накапливаются продукты обмена веществ. Споры представляют собой стадию покоя и приспособлены для выживания в неблагоприятных условиях среды.

Процесс спорообразования. Его можно подразделить на шесть-семь последовательных стадий. Первая стадия характеризуется репликацией ДНК с образованием двух и более нуклеоидов, которые локализуются в виде осевого тяжа вдоль бактериальной клетки.

На второй стадии происходит отделение одной хромосомы от осевого тяжа ДНК и перемещение ее к полюсу клетки. Впоследствии меньшая часть цитоплазмы с заключенной в нее хромосомой отделяется от остальной цитоплазмы цитоплазматической мембраной, которая врастает так же, как при клеточном делении. В итоге возникают две, разделенные мембраной, неравные (большая, «материнская», и малая) клетки. Клеточная стенка бактерии в этом делении участия не принимает. В промежутке между второй и третьей стадией происходит «обрастание» малой клетки с хромосомой цитоплазматической мембраной большой клетки. В результате образуется округлая *проспора,* окруженная двумя мембранами.

Третья стадия характеризуется отделением проспоры от мембраны большой клетки. Проспора окружена со всех сторон цитоплазмой и как бы свободно в ней плавает, она может оставаться у полюса бактериальной клетки либо, как у некоторых видов, переходить к центру. Во время прохождения третьей стадии в проспору поступают из материнской клетки ряд аминокислот, дипиколиновая кислота (ДПК) и ионы Ca^{2+}. Затем внутри проспоры образуется комплекс Са с дипиколиновой кислотой.

На четвертой стадии между двумя мембранами проспоры образуется толстый слой коры, или *кортекса,* состоящего из прочно соединенных молекул пептидогликана. Обычно синтез кортекса продолжается до самого созревания споры. Во время этой стадии наблюдается усиление способности проспоры к светопреломлению, что, по-видимому, связано с ее обогащением комплексом ДПК-Са.

Пятая стадия характеризуется формированием к периферии от наружной мембраны проспоры споровых покровов, состоящих из нескольких слоев, главным образом белков с высоким содержанием цистеина и гидрофобных аминокислот. У некоторых бактерий (роды *Bacillus, Clostridium)* поверх покровов споры формируется еще одна структура — *экзоспориум,* часто состоящий из многих слоев

(10—15) и имеющий подчас разнообразную «лепную» форму. Споры многих видов рода *Clostridium* обладают различными придатками и выростами в виде трубчатых, лентовидных, булавовидных, древовидных и других образований. Назначение этих выростов остается неясным. На данной стадии продолжается накопление в споре ДПК и кальция.

Во время шестой стадии заканчивается формирование всех структур споры, и она приобретает термоустойчивость. Диаметр споры приблизительно равен или несколько превышает диаметр клетки, в которой спора образовалась. У одних бактерий спора формируется на конце клетки, последняя при этом несколько расширяется, приобретая вид барабанной палочки; у других образуется в центре клетки, и последняя либо не меняет формы (род *Bacillus),* либо расширяется в центре, принимая вид веретена (род *Clostridium).*

В ряде случаев выделяют седьмую стадию, во время которой происходит лизис (разрушение) материнской клетки, спора высвобождается и выходит в окружающую среду. В сердцевине зрелой споры содержатся белки и нуклеиновые кислоты, а также ДПК и другие низкомолекулярные соединения. Спора содержит хромосому, обычные рибосомы и различные ферменты. Считают, что белки сердцевины споры образуют комплексы с ДНК, что приводит к изменению структуры последней и обеспечивает термо- и радиоустойчивость споры. Большое значение в обеспечении термоустойчивости спор придается комплексу ДПК-Са.

Свойства спор. Споры сохраняют жизнеспособность в условиях, когда вегетативные клетки, т. е. не образовавшие спор, погибают. Большинство спор хорошо переносят высушивание, многие споры нельзя убить даже кипячением в течение нескольких часов. Для их уничтожения требуется температура, пара 120 °С при его давлении 1 атм ($1{,}01 \cdot 10^5$ Па), поддерживаемые в течение 20 мин. В сухом состоянии споры погибают лишь при сильном нагревании (150—160 °С) в течение нескольких часов. Споры отдельных видов бактерий отличаются особой термоустойчивостью.

Споры способны выдерживать также воздействие низких температур, радиации, давления, агрессивных химических соединений, ферментов, антибиотиков, высушивания. Достаточно высокая устойчивость спор к ферментам, ядам, органическим растворителям объясняется барьерной ролью белковых покровов споры.

Споры бактерий могут длительное время существовать в покоящемся состоянии. Английский микробиолог *П. Снис* нашел жизнеспособные споры бактерий в комочках почвы, приставших к корням растений гербария, хранившегося около 320 лет. В слое осадков на дне озера в штате Миннесота найдены споры, возраст которых оценивают в 7500 лет. По некоторым данным, найдены споры и более «солидного» возраста. Так, немецкий микробиолог *Г. Домбровский* обнаружил жизнеспособные споры в образцах соли из девонских, пермских и силурийских месторождений, расположенных в Германии и Северной Америке, имеющих возраст более 300 млн лет. А в опытах, проведенных в Лейденском университете (Нидерланды), было показано, что споры некоторых бактерий могли бы выжить в условиях космоса в течение 45 млн лет.

Прорастание спор. При попадании в благоприятные условия спора начинает прорастать. Процесс ее прорастания подразделяют на три стадии: активацию, инициацию и так называемое вырастание. Во время активации проявляется готовность споры к прорастанию, хотя при этом сохраняется ее устойчивость к температуре, способность к светопреломлению и т. д. Большое влияние на активацию оказывает температура — чем выше температура, тем быстрее происходит активация.

Вторая стадия — инициация — необратима и происходит в течение нескольких минут. При этом уменьшается устойчивость споры к прогреванию, снижается ее светорассеяние. Прохождение спорой данной стадии зависит от температуры, влажности, реакции среды и других факторов.

Третья стадия — вырастание — это процесс интенсивного роста. Во время нее идет активный синтез белка и РНК; репликация ДНК начинается через 1—2 ч после начала прорастания споры. Во время прорастания споры происходит лизис ее оболочек или их разрыв и выход проростка (ростовой трубки) из оболочек. В дальнейшем наблюдается удлинение освободившегося бактериального организма и, наконец, деление уже удлиненной клетки.

Некоторые бактерии одновременно со спорами образуют *параспоральные тела.* Такие тела, например, формируются в клетках *Bacillus thuringiensis.* Они представляют собой белковые кристаллы, токсичные для насекомых. Организмы, образующие параспоральные тела, используют для борьбы с вредными насекомыми.

Другие покоящиеся формы. Существуют бактерии, у которых образуются другие, относительно устойчивые к неблагоприятным условиям среды (температуры, кислотности, аэрации и т. д.) покоящиеся клетки. К ним относятся прежде всего так называемые *цисты,* которые характерны для азотобактера, спирохет, миксобактерий, риккетсий, метилотрофных бактерий и бактерий рода *Bdellovibrio.* В процессе образования цисты бактериальная клетка целиком превращается в покоящуюся клетку, при этом изменяется ее форма, утолщается клеточная стенка.

Зрелые цисты представляют собой округлые светопреломляющие образования, имеющие сердцевину — цитоплазму с нуклеоидом и гранулами поли-*В*-гидроксимасляной кислоты. Цитоплазма окружена цитоплазматической мембраной и двумя оболочками: ин-

тиной — толстой внутренней оболочкой и экзиной — многослойной внешней оболочкой. В цистах содержится почти в два раза больше липидов, чем в вегетативных клетках. Цисты более устойчивы, чем вегетативные клетки, к механическим воздействиям, высушиванию, лизоциму. Устойчивость цист к высоким температурам не намного выше, чем вегетативных клеток.

К покоящимся формам бактерий относятся также *экзоспоры,* которые образуются у некоторых почкующихся фотосинтезирующих и метанолокисляющих бактерий. Экзоспоры обладают значительно большей устойчивостью, чем вегетативные клетки, к высушиванию, ультрафиолетовому облучению, высокой температуре (выдерживают кипячение в течение нескольких минут). Известны и другие группы покоящихся клеток бактерий, например специализированные клетки у внутриклеточных паразитов и симбионтов.

Контрольные вопросы и задания

1. Чем отличаются прокариоты от эукариот? 2. Перечислите основные формы бактерий и дайте им характеристику. 3. Что представляют собой поверхностные и внутренние структуры бактерий и каковы их функции? 4. Каковы особенности грамположительных и грамотрицательных бактерий? 5. Назовите виды бактерий, не имеющих клеточной стенки. *6.* В чем отличие нуклеотида прокариот от ядра эукариот? 7. Охарактеризуйте основные стадии процесса спорообразования. 8. Какие функции выполняют эндоспоры бактерий и какие споры грибов? 9. Чем объясняется термоустойчивость бактерий?

Систематика прокариот

Систематика, или *таксономия* — распределение, классификация организмов по группам (таксонам) в соответствии с определенными признаками, а также установление родственных связей между ними. Изучение основных групп микроорганизмов полезно предварить знакомством с принципами их номенклатуры. *Номенклатура* — это система наименований, применяемых в определенной области знаний.

2.1. Общие сведения по систематике микроорганизмов

Любая система номенклатуры и таксономии требует наиболее полного знания объектов. Чтобы получить информацию, необходимую для наименования и классификации микроорганизмов, изучают все многообразие и все особенности их внешней и внутренней структуры, физиологические и биохимические свойства, а также процессы, вызываемые микроорганизмами в их естественной среде обитания.

С основными характеристиками микроорганизма знакомятся в следующем порядке: определяют, каков внешний вид микроорганизма — его форма, подвижность (наличие жгутиков и их расположение), наличие капсул и способность к образованию эндоспор, способность окрашиваться по Граму; выясняют особенности обмена веществ, способы получения энергии; наконец, определяют, каким образом он изменяет внешнюю среду, в которой растет, и как окружающая среда влияет на его жизнедеятельность.

В последнее время в связи с развитием молекулярной биологии разработаны новые подходы к характеристике микроорганизмов, что оказало огромное влияние на их систематику. В частности, определенную ценность имеют методы *геносистематики*[1], позволяющие непосредственно охарактеризовать наследственные свойства *(генотип)* микроорганизмов и таким образом дополнить их описание, которое до последнего времени отражало исключительно структурные и функциональные свойства *(фенотип).* Данные о генотипе микроорганизма получают при помощи методов анализа выделенных нуклеиновых кислот: определения нуклеотидного состава ДНК и изучения химической гибридизации нуклеиновых кислот, изолированных из разных микроорганизмов.

По соотношениям пар пуриновых и пиримидиновых оснований в молекуле ДНК выявляют генетические различия между группами микроорганизмов. Второй метод помогает установить гомологию ДНК при гибридизации пары исследуемых молекул, выделенных из разных микроорганизмов. Если наблюдается высокая степень связывания молекул ДНК (80—90% и более), то можно говорить о гомологии первичной структуры и близком генетическом родстве микроорганизмов (филогенетической связи). Низкая степень гомологии (50%) характеризует достаточно отдаленные генетические связи между микроорганизмами. Особое значение для развития геносистематики имела разработка *методов секвенирования,* т. е. определения последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах, в частности в рибосомальной РНК. Сравнение таких последовательностей у разных микроорганизмов и построение так называемых филогенетических деревьев, в определенной мере отражающих степень родства между ними, привело к коренным изменениям в систематике микроорганизмов.

[1] Геносистематика изучает физико-химические свойства ДНК с целью создания естественной системы микроорганизмов.

В систематике микроорганизмов иногда используют нумерическую таксономию, предложенную современником Карла Линнея *М. Адансоном.* В основу адансоновской, или нумерической, таксономии положены следующие принципы: равномерность изучаемых признаков организмов; доведение их количества до максимальной величины; выделение каждой таксономической группы по числу совпадающих признаков. Указанный подход к систематике микроорганизмов достаточно объективен, однако для его реализации необходимы обширные математические расчеты с использованием электронно-вычислительных машин.

После подробного изучения микроорганизму дают научное название, которое должно быть выражено двумя латинскими словами, как этого требует *биноминальная номенклатура,* предложенная еще в XVIII в. К. Линнеем. Первое слово — название рода, обычно оно латинского происхождения, пишется с прописной буквы и отражает какой-либо морфологический или физиологический признак микроорганизма либо фамилию ученого, открывшего микроорганизм, либо особый отличительный признак, например место обитания.

Второе слово пишется со строчной буквы и обозначает видовое название микроорганизма. Иногда оно представляет собой производное от существительного, дающего описание цвета колонии, источника происхождения микроорганизма, вызываемого этим микроорганизмом процесса или болезни и некоторых других отличительных признаков. Например, название *Bacillus albus* указывает, что микроорганизм грамположителен, представляет собой спорообразующую аэробную палочку (свойства рода *Bacillus),* а видовое название характеризует цвет колонии *(albus* — белый).

Названия микроорганизмам присваиваются в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий, введенного с 1 января 1980 г., они едины во всех странах мира. В настоящее время разрабатывается новый биокодекс, проект которого опубликован в 1977 г. В классификации для группирования родственных микроорганизмов используют следующие таксономические категории: вид (species), род *{genus),* семейство *(familia),* порядок *(ordo),* класс *(classis),* отдел *(divisio),* царство *(regnum).*

Вид — основная таксономическая единица, представляет собой совокупность особей одного генотипа, обладающих хорошо выраженным фенотипическим сходством. Вид подразделяют на *подвиды,* или *варианты.*

В микробиологии часто пользуются терминами «штамм» или «клон». Штамм — более узкое понятие, чем вид. Обычно *штаммами* называют культуры микроорганизмов одного и того же вида, выделенные из различных природных сред (почв, водоемов, организмов

и т. д.) или из одной и той же среды, но в разное время. Штаммы одного вида могут быть близки по своим свойствам или различаться по отдельным признакам.

В то же время характерные свойства разных штаммов не выходят за пределы вида.

Клон — это культура, полученная из одной клетки. Совокупность (популяцию) микроорганизмов, состоящую из особей одного вида, называют *чистой культурой.*

Живой мир нашей планеты обычно подразделяют на четыре царства: растения *(Plantae),* животные *(Animalia),* грибы *(Mycota)* и прокариоты *(Procaryotae).* Одноклеточные эукариоты также часто выделяют в отдельное царство протистов *(Protista).* Однако в последнее время на основании данных молекулярной биологии классификация высших таксонов живых организмов пересмотрена. Наиболее сильные изменения претерпела классификация прокариот, среди которых была обнаружена группа организмов, значительно отличающаяся от других форм последовательностью рибосомальной РНК (16SpРНК), химическим составом некоторых компонентов клетки и обладающая уникальными биохимическими особенностями. Эти организмы были выделены в новое царство архебактерий[1]. По некоторым предположениям, архебактерий, или археи, представляют одну из наиболее древних групп микроорганизмов.

Выделение нового царства архебактерий обусловило необходимость разделять прокариоты и эукариоты на уровне надцарств. В связи с этим система высших таксонов живого мира выглядит следующим образом:

Надцарства	*Царства*
Прокариоты	Архебактерий, эубактерии
Эукариоты	Растения, животные, грибы

В биологии выделяют две систематики живых организмов — *филогенетическую,* или *естественную,* и *искусственную.*

Микробиология еще не располагает достаточными данными об эволюции и филогении микроорганизмов, позволяющими построить естественную систематику, подобную той, что создана для высших растений и животных. Современные системы классификации микроорганизмов, по существу, искусственные. Они играют роль диагностических ключей, или определителей, которыми пользуются главным образом при идентификации того или иного микроорганизма. Примерами служат «Определитель бактерий и актино-

[1] Согласно последнему изданию Руководства Берги *(Bergey's Manual,* 2001), этим группам прокариот, архебактериям и эубактериям присвоен таксономический статус доменов *(Dormain)* с названиями археи *(Archaea)* и бактерии *(Bacteria).* Третий домен, *Eucarya,* включает все эукариоты.

мицетов» Н. А. Красильникова (1949), «Определитель родов бактерий» В. Б. Д. Скермана (1975), Краткий определитель бактерий (1980) и др.

В настоящем учебнике приведено описание наиболее важных групп микроорганизмов в соответствии с первым изданием «Руководства по систематике бактерий Берги» (1984)[1]. В этом издании все прокариотные микроорганизмы были объединены в царство *Procaryotae,* которое подразделено на четыре отдела — *Gracilicutes, Firmicutes, Tenericutes* и *Mendosicutes.* В свою очередь, отделы делят на классы, порядки, семейства, роды и виды. Микроорганизмы разделены на четыре отдела главным образом на основании наличия или отсутствия клеточных стенок и их вида, а на классы, порядки, семейства, роды, виды — по совокупности морфологических и физиолого-биохимических признаков.

2.2. Краткая характеристика отдельных групп бактерий

Отдел 1 — *Gracilicutes*

К отделу *Gracilicutes* (от лат. *cutes* — кожа, *gracilis* — тонкий, стройный) относят бактерий (кокки, палочки или нити), имеющих грамотрицательный тип клеточной стенки. Они могут быть подвижными и неподвижными, эндоспор не образуют. У миксобактерий наблюдается образование плодовых тел и миксоспор. Размножаются бинарным делением, почкованием. В этот отдел входят фототрофные и нефототрофные бактерии, аэробы, анаэробы и факультативные анаэробы. Некоторые виды являются облигатными внутриклеточными паразитами.

[1] *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1984—1989, vol. 1—4). Данная классификация дает наглядное представление о биоразнообразии прокариот, об основных физиологических группах бактерий, обитающих в почве. Долгое время эта классификация была общепринятой, и ее знание дает возможность ориентироваться в микробиологической литературе последних десятилетий. По этой причине в книге оставлено большинство латинских названий микроорганизмов, которые широко использовались до последнего времени.

Вместе с тем новые поколения студентов и специалистов, безусловно, должны знать и новый вариант классификации прокариот. В наиболее полном, хотя еще предварительном виде, он опубликован во втором издании Руководства по систематике бактерий Берги, первый том которого вышел в свет в 2001 г., а остальные готовятся к печати. В сокращенном виде эта классификация приведена в Приложении. В научной литературе широко используются переведенные на русский язык Краткий определитель бактерий Берги (1980) и Определитель бактерий Берджи (1997). *(Прим. ред.)*

Класс 1 — *Scotobacteria.* К классу *Scotobacteria* относят грамотрицательные, нефотосинтезирующие бактерии (от греч. *scotos* — темнота)[1].

Группа 1 — спирохеты. Эти микроорганизмы объединены в порядок *Spirochaetales,* семейства *Spirochaetaceae* и *Leptospiraceae.* Спирохеты — гибкие, спирально извитые одноклеточные бактерии, представляющие собой очень длинные (5—500 мкм) и тонкие (0,09—0,75 мкм) клетки с одним или более витками спирали.

Клетки спирохет состоят из протоплазматического цилиндра, переплетенного с одной или несколькими осевыми фибриллами, которые отходят от прикрепленных дисков, расположенных на концах цилиндра. Протоплазматический цилиндр и осевые фибриллы покрыты внешней оболочкой. Клетки имеют нуклеоид, мезосомы и другие структуры. Размножаются поперечным делением, подвижные. Спор не образуют. Аэробы, факультативные анаэробы или анаэробы. Хемоорганогетеротрофы.

Крупные спирохеты (100—500 мкм) относят к родам *Spirochaeta* и *Cristispira* (рис. 20), мелкие (6—7 мкм) — к родам *Treponema, Borrelia* и *Leptospira.* Представители первых двух родов — сапротрофы, трех других — паразиты и возбудители инфекционных болезней человека и животных.

Группа 2 — анаэробные спиральные и вибриоидные грамотрицательные бактерии — включает семейство *Spirillaceae,* представители которого характеризуются следующими признаками: клетки — жесткие, спирально извитые палочки, подвижные, имеют один жгутик или пучок полярно расположенных жгутиков (на одном или на обоих концах клетки). Аэробы, микроаэрофилы. Хемоорганотрофы. В цитоплазме обычно имеются гранулы *поли-В-гидроксимасляной* кислоты. Сапротрофы или паразиты.

К данному семейству относятся роды — *Spirillum, Aquaspirillum, Oceanospirillum, Azospirillum, Campylobacter* и *Bdellovibrio.* Бактерии рода *Azospirillum* — азотфиксирующие. Некоторые представители рода *Bdellovibrio* являются облигатными паразитами бактерий. Они представляют собой одноклеточные подвижные организмы, которые прикрепляются к клетке-хозяину, проникают в нее и начина-

[1] Способность к фотосинтезу долгое время рассматривалась как важнейший таксономический признак. Согласно этому критерию все грамотрицательные бактерии были разделены на фотосинтезирующие (класс *Photobacteria,* позднее разделенный на классы *Anoxyphotobacteria* и *Oxyphotobacteria)* и на нефотосинтезирующие, т. е. индифферентные к свету (класс *Scotobacteria).* Название *Scotobacteria* в настоящее время не является общепринятым и встречается редко. *(Прим. ред.)*

ют размножаться. Спиральные и изогнутые бактерии обнаруживают в пресной и морской воде и в почве.

Группа 3 — аэробные грамотрицательные палочки и кокки. Данная группа бактерий представлена семью семействами, три из которых включают виды, имеющие существенное значение для плодородия почвы.

В семейство *Pseudomonadaceae* входит род *Pseudomonas,* который включает неспоровые бактерии — прямые или слегка изогнутые палочки (рис. 21) с полярно расположенными жгутиками (одиночными или в виде пучков, на одном или обоих концах клетки). Псевмомонады широко распространены в природе (в различных почвах, в воде рек, морей, океанов, на растениях и животных, в сточных водах и воздухе). Строгие аэробы. Хемоорганотрофы, могут использовать разнообразные органические вещества — белки, жиры, углеводы, а также гумусовые вещества.

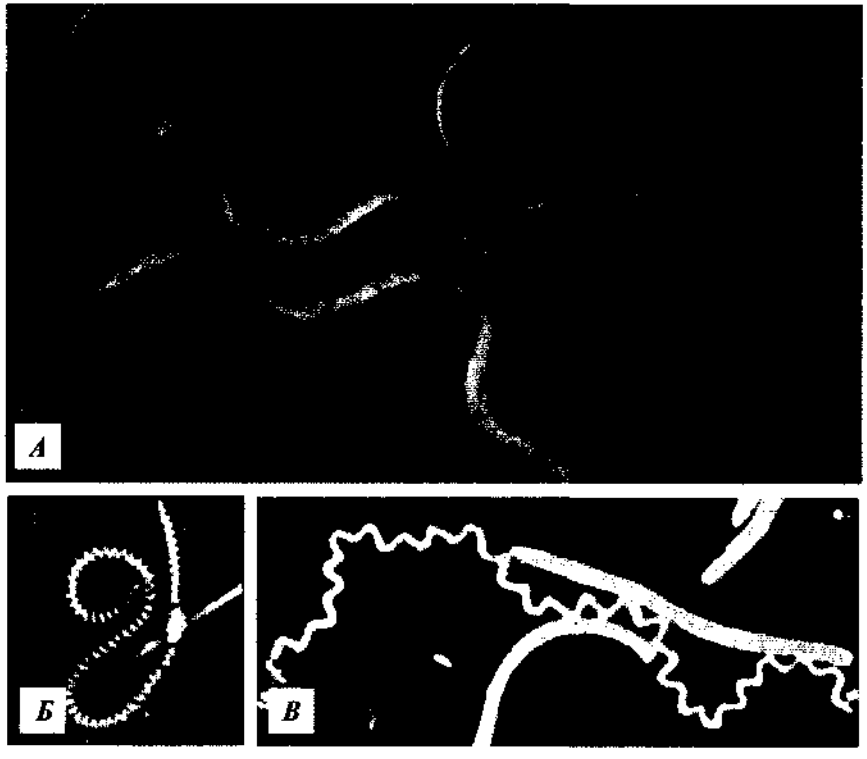


Рис. 20. Некоторые крупные спирохеты: *А — Cristispira,* х380 (по: С. В. Уатсон); *Б* — неидентифицированная спирохета из воды, х341; *В — Spirochaeta plicatilis,* х341 (по: С. Робиноу)

Некоторые псевдомонады осуществляют восстановление нитратов — денитрификацию.

Ряд видов рода *Pseudomonas* — возбудители болезней растений, животных и человека. Род *Xanthomonas* представлен в основном фитопатогенными формами.

В семейство *Azotobacteriaceae* входят микроорганизмы, имеющие крупные, от палочковидной до овальной формы, клетки, подвижные, с перитрихальным жгутикованием, не образующие спор. Характерные признаки — слизистая капсула, образование цист. Хемоорганогетеротрофы. Способны фиксировать атмосферный азот. Представители семейства широко распространены в почвах, водоемах, на поверхности листьев (филлосфере) и корней растений (ризосфере).

Семейство *Azotobacteriaceae* представлено четырьмя родами: *Azotobacter, Azomonas, Beijerinckia* и *Derxia,* из которых первые два

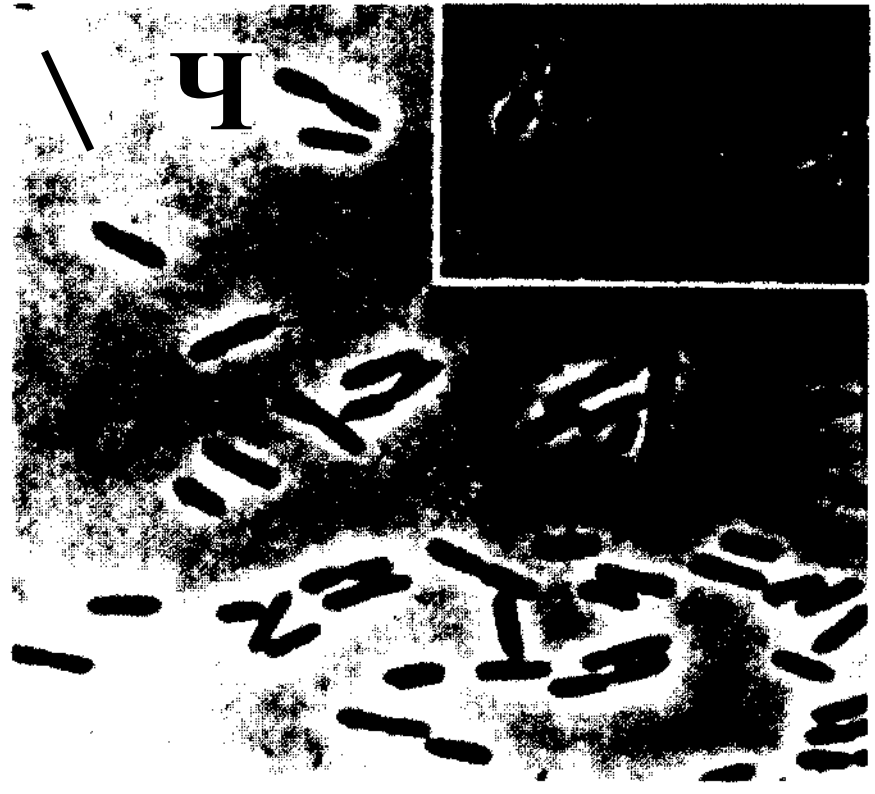


Рис. 21. *Pseudomonas aeruginosa,* **х 1100;** в верхнем правом углу — *P. stutzeri* с одним полярным жгутиком, х1290 (по: **Н.** Паллерони)

встречаются в почвах умеренных широт, остальные — в почвах субтропиков и тропиков (Азия, Африка, Южная Америка).

Бактерии семейства *Rhizobiaceae* имеют палочковидные, подвижные клетки, спор не образуют. Хемоорганотрофы. Представители рода *Rhizobium* образуют клубеньки на корнях бобовых растений, а виды рода *Agrobacterium* — вызывают разрастания *{галлы)* на корнях и стеблях растений. Их относят к опухолеобразующим фитопатогенным микроорганизмам.

Семейство *Methylococcaceae* объединяет два рода — *Methylococcus* и *Methylomonas,* представленные подвижными и неподвижными палочками и кокками. Хемоорганотрофы. Единственные источники углерода и энергии для них — метан и метиловый спирт.

Семейство *Acetobacteriaceae* представлено двумя родами — *Acetobacter* и *Gluconobacter.* Характерной особенностью бактерий данных двух родов является способность окислять этиловый спирт до уксусной кислоты. Они встречаются на цветах, в плодах, овощах, пиве, вине и т. д.

Семейство *Neisseriaceae* состоит из четырех родов, к которым отнесены в основном паразитические формы.

Группа 4 — факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки. В группу объединены два семейства — *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae,* многие представители которых служат возбудителями инфекционных болезней человека и животных.

Семейство *Enterobacteriaceae* включает ряд организмов, обитающих в кишечнике человека и животных и вызывающих заболевания. Это микроорганизмы родов *Escherichia, Citrobacter, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Enterobacter* и др. Кроме того, к данному семейству отнесены роды *Proteus* и *Erwinia,* сапротрофные представители которых могут обитать в почве или на поверхности растений. Так, *Erwinia herbicola* — частый компонент эпифитной (поверхностной) микрофлоры растений.

В почве, и в ризосфере растений обнаружены сапротрофные формы бактерий рода *Klebsiella.* Среди них есть виды, фиксирующие молекулярный азот воздуха.

Семейство *Vibrionaceae* объединяет несколько родов — *Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas* и *Photobacterium.* Микроорганизмы, входящие в них, обычно встречаются в пресной и морской воде, иногда в организме рыб, животных или человека. Среди них есть болезнетворные формы.

Группа 5 — анаэробные грамотрицательные прямые, изогнутые и спиральные палочки — представлена одним семейством *Bacteroidaceae,* которое объединяет три рода — *Bacteroides, Fusobacterium* и *Leptotrichia.* Бактерии семейства обитают в кишечнике человека и животных, в некоторых случаях могут вызывать заболевания желудочно-кишечного тракта.

В желудочно-кишечном тракте млекопитающих обитают бактерии рода *Selenomonas.* Клетки их имеют форму почки или полумесяца, подвижные. Хемоорганотрофы. Сбраживают углеводы с образованием уксусной, пропионовой, молочной кислот и CO_2. Играют определенную роль в питании животных.

Кроме того, к группе примыкают несколько родов бактерий, среди которых интересны бактерии рода *Desulfovibrio* — подвижные изогнутые палочки, не образующие спор. Грамотрицательные. Хемоорганотрофы. Восстанавливают сульфаты и другие соединения серы до H_2S. Фиксируют азот атмосферы. Строгие анаэробы. Обнаружены в почвах, воде и илах водоемов.

Группа 6 — грамотрицательные хемолитотрофные бактерии. Объединены в два семейства и 15 родов.

К семейству *Nitrobacteriaceae* относят микроорганизмы с палочковидными, эллипсоидальными, сферическими и спиральными клетками, не образующие спор, подвижные или неподвижные. Большинство — облигатные хемолитоавтотрофы, энергию получают за счет окисления аммиака или нитрита, фиксируют CO_2 для удовлетворения потребностей в углероде. Облигатные аэробы. Распространены в почвах, реках, морях и океанах.

Бактерии, окисляющие аммиак до нитрита, представлены родами *Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosococcus* и *Nitrosolobus,* а бактерии, окисляющие нитриты до нитратов, — родами *Nitrobacter, Nitrospira* и *Nitrococcus.* Роды различают по форме клеток и ультраструктуре. Организмы семейства участвуют в превращении в почвах аммиака в нитриты и нитраты.

К данной группе отнесены организмы, окисляющие серу и ее соединения. Род *Thiobacillus* представлен бактериями с маленькими палочковидными клетками, имеющими один полярно расположенный жгутик. Спор не образуют. Большинство — облигатные аэробы. Облигатные и факультативные хемолитоавтотрофы. Энергию получают за счет окисления восстановленных соединений серы, источником углерода служит CO_2. Некоторые виды развиваются в очень кислой среде. Распространены в почвах, водоемах, сточных водах, серных ключах. Описаны также роды *Achromatium, Macromonas, Thiobacterium, Thiospira* и *Thiovulum.*

Семейство *Siderocapsaceae* представлено бактериями, которые имеют сферические, эллипсоидальные или палочковидные клетки, покрытые капсулами. У данных организмов на поверхности капсул, в капсулах или на внеклеточном материале откладываются оксиды железа и (или) марганца. Хемоорганотрофы. Аэробы и микроаэрофилы. Распространены в железосодержащих водах, озерах, донных отложениях, илах, почвах и др. Семейство включает роды *Siderocapsa, Siderococcus* и др.

Группа 7 — скользящие бактерии. К группе относят два порядка: *Myxobacteriales* и *Cytophagales,* а также ряд других бактерий со скользящим движением.

Порядок Myxobacteriales. Включает бактерии, у которых образуются плодовые тела. Миксобактерии — одноклеточные организмы с цилиндрическими клетками, на концах закругленными или несколько суживающимися. Клетки заключены в более или менее плотный слой слизи. Размножаются миксобактерии бинарным поперечным делением. Грамотрицательные.

Клеточная стенка у миксобактерии эластична, поэтому они отличаются гибкостью, при движении изгибаются, форма их может меняться. Обладают способностью к скользящему движению. На определенном этапе развития большинство миксобактерии приступают к образованию плодовых тел. Вегетативные клетки сначала размножаются, а затем «сползаются» и образуют плотное, бесцветное или, наоборот, яркоокрашенное плодовое тело. Форма и размеры плодовых тел неодинаковы у разных представителей порядка. Клетки в плодовых телах становятся покоящимися формами — миксоспорами или микроцистами. В некоторых случаях миксоспоры заключены в спорангии определенной формы, возвышающиеся над субстратом на стебельках.

Миксоспоры миксобактерии устойчивы к высушиванию, но не к нагреванию. При прорастании миксоспоры целиком превращаются в вегетативные клетки.

Миксобактерии — хемоорганотрофы, строгие аэробы. Распространены в почве, навозе, разлагающихся растительных остатках и т. д. Многие из них участвуют в разложении белков, полисахаридов, целлюлозы и других веществ растительного и животного происхождения.

Порядок включает несколько семейств. В семейство *Myxococcaceae* входит род *Myxococcus,* представители которого имеют вегетативные клетки с утонченными концами и образуют плодовые тела, содержащие сферические или овальные микроцисты (рис. 22).

Семейство *Archangiaceae,* включающее род *Archangium,* характеризуется микроорганизмами, вегетативные клетки которых имеют конусовидные концы; микроцисты у них палочковидные.

Семейство *Cystobacteriaceae* включает роды *Cystobacter, Melittangium* и *Stigmatella.*

Семейство *Sorangiaceae* представлено родами *Sorangium, Polyangium, Chondromyces* и др. Характерны цилиндрические клетки с тупыми концами, миксоспоры сходны по форме с вегетативными клетками.

Порядок Cytophagales. Включает микроорганизмы, неспособные к образованию плодовых тел. Их клетки имеют вид палочек и

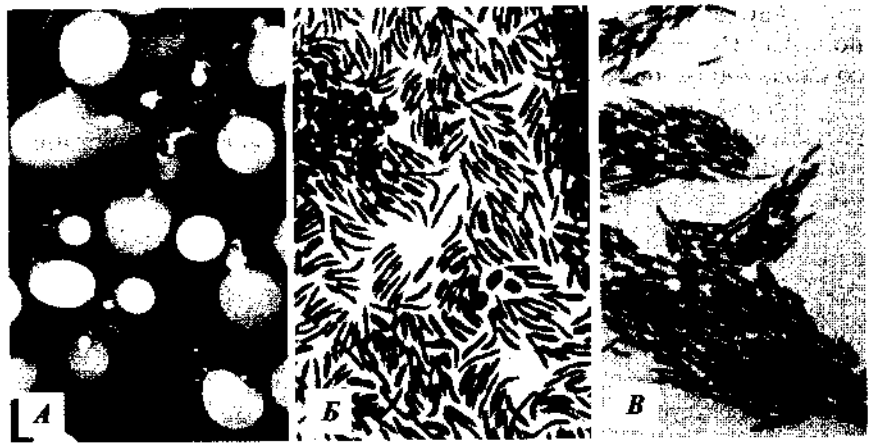


Рис. 22. Миксобактерии из рода *Myxococcus: А* — плодовые тела, х30; *Б, В* — вегетативные клетки, среди которых видны округлые цисты, х1000

нитей, передвигаются скольжением. Грамотрицательные. Объединены в ряд семейств.

Семейство *Cytophagaceae* включает шесть родов. Среди них род *Cytophaga,* например, объединяет виды с палочковидными клетками (или нитями), имеющими закругленные или конусовидные концы. У этих организмов микроцисты не образуются. Они строгие аэробы или факультативные анаэробы. Хемоорганогетеротрофы, способны разлагать целлюлозу, хитин, агар и другие вещества. Род *Sporocytophaga* представлен организмами, у которых образуются микроцисты. К семейству относятся также роды *Flexibacter, Microscilla, Sphaerocytophaga, Capnocytophaga.*

Скользящее движение характерно также для бактерий семейства *Beggiatoaceae.* Эти организмы имеют вид бесцветных длинных неразветвленных нитей *(трихомов)* различной толщины, состоящих из цепочек клеток. Передвигаются скользящими движениями, никогда не прикрепляются к субстрату. Размножаются поперечным делением отдельных клеток. Грамотрицательные. Миксотрофы или хемоорганогетеротрофы. Аэробы или микроаэрофилы. Виды рода *Beggiatoa* обитают в малоподвижных водах с высоким содержанием сероводорода. Окисляют сульфиды до сульфатов. Промежуточный продукт окисления сульфидов — элементарная сера — накапливается внутри клеток в виде гранул и обусловливает белый цвет скоплений этих организмов. Семейство включает также роды *Vitreoscilla, Thioploca.*

Группа 8 — хламидобактерии. Это бактерии, имеющие *чехлы,* или *влагалища.* В группу входит семь родов. Род *Sphaerotilus* представлен одноклеточными палочковидными грамотрицательны-

Рис. 23. Цепочка клеток *Sphaerotilus natans,* заключенная во влагалище (по: Дж. Стоукес)

ми организмами с субполярно расположенными жгутиками. Растут в виде длинных нитей, состоящих из цепочек клеток (рис. 23), соединенных концами и покрытых чехлом. Чехлы обычно тонкие, без отложений оксидов железа и марганца. Длина нити до нескольких миллиметров. Размножаются бактерии внутри влагалища делением. Образующиеся подвижные клетки либо выскальзывают из влагалища, либо освобождаются при его разрушении.

Хемоорганогетеротрофы, строгие аэробы. Представители рода обитают в пресных водах, загрязненных стоками бумажной и молочной промышленности. Обычно цепочки клеток, покрытых чехлом, при помощи специальных дисков прикрепляются в воде к какому-либо твердому предмету, образуя значительные скопления.

Род *Leptothrix* — прямые палочки. Встречаются в цепочках, окруженных чехлом, или свободно плавают в виде отдельных клеток или групп. Чехлы пропитываются или покрываются гидроксидами железа или марганца. Имеют один полярный жгутик. Грамотрицательные. Хемоорганогетеротрофы. Строгие аэробы. Обитают в пресных водах.

Известны также роды *Heliscomenobacter, Crenothrix, Clonothrix* и др.

Группа 9 — почкующиеся и (или) стебельковые бактерии. Наибольший интерес представляют следующие роды.

Род *Hyphomicrobium* включает микроорганизмы с клетками палочковидной, овальной, яйцевидной или бобовидной формы. Характерны нитевидные отростки (гифы) различной длины. Размножаются почками, расположенными на кончиках гиф. После созревания почки становятся подвижными, отрываются и сами прикрепляются к какой-либо поверхности или другим клеткам. Хемоорганогетеротрофы. Для роста необходим CO_2. Аэробы.

Большинство почкующихся бактерий отличается рядом особенностей, в частности специализированным характером обмена. Многие из них являются олигокарбофилами, т. е. растут при наличии незначительных количеств источников углерода. Обычно эти организмы не используют сахара, однако многие из них способны потреблять такие соединения, как формиат, ацетат, лактат, метанол и т. д.

Род *Pedomicrobium.* Для его видов также характерен определенный цикл развития. На материнской клетке овальной формы образуется подвижная клетка — *зооспора* — с полярным жгутиком, иногда с несколькими жгутиками. Образование дочерней клетки происходит почкованием. Отделившись от материнской, дочерняя клетка приступает к размножению только после созревания. На поверхности клеток могут откладываться оксиды железа и марганца. Виды рода широко распространены в почвах.

Род *Caulobacter* включает стебельковые бактерии, характеризующиеся палочковидными, веретеновидными или вибриоидными клетками со стебельком, отходящим от одного из полюсов. Размножаются поперечным асимметричным делением несущих стебелек клеток. Грамотрицательные. Хемоорганогетеротрофы. Строгие аэробы. Распространены в пресных водоемах, почвах и других естественных субстратах.

Род *Prosthecomicrobium.* К нему относят одноклеточные бактерии, имеющие выросты (простеки), которые расходятся от клеточной поверхности во всех направлениях. Простеки имеют близкую к коническую форму, сужаясь дистально от клетки к тупому концу. Клетки простекобактерий делятся или размножаются почкованием. Представлены подвижными и неподвижными формами. Подвижные формы бактерий имеют от одного до нескольких жгутиков. Грамотрицательные. Аэробы. Хемоорганогетеротрофы. Распространены в почвах и водоемах.

Род *Seliberia* — палочковидные, спирально закрученные клетки; образуют звездообразные фигуры или розетки. Размножаются поперечным делением и почкованием. Хемоорганогетеротрофы. Факультативные анаэробы. Распространены в почвах, водоемах.

Род *Metallogenium.* Характерны кокковидные клетки, ригидная клеточная стенка отсутствует. Это микоплазмоподобные микроорганизмы; их клетки прикреплены к поверхностям. Размножаются почкованием. При прорастании образуется одна или несколько нитей, которые могут ветвиться. Хемоорганогетеротрофы. Аэробы. Окисляют соединения железа и марганца, осаждая оксиды этих металлов на поверхности цитоплазматической мембраны. Распространены в донных отложениях пресных водоемов, в планктоне пресноводных озер и прудов, в северных почвах.

Род *Gallionella* также представлен стебельковыми бактериями, имеющими почковидные или округлые клетки, находящиеся на концах длинных стебельков. Последние состоят из пучков фибрилл, переплетенных одна вокруг другой и способных ветвиться. Стебельки часто покрыты гидроксидом железа. У галлионелл наблюдается бинарное деление, причем дочерние клетки после деления остаются на конце стебелька. Затем клетки отщепляются и могут передвигаться при помощи одного полярно расположенного жгутика. Грамотри-

дательные. Хемолитоавтотрофы — окисляют двухвалентное железо в трехвалентное и используют CO_2. Микроаэрофилы. Обнаружены в водах, содержащих железо, и в почвах. Обусловливают вместе с представителями рода *Leptothrix* осаждение железа в водоемах.

Группа 10 — риккетсии и хламидии. Представлена двумя порядками — *Rickettsiales* и *Chlamydiales.*

Порядок Rickettsiales. Включает три семейства — *Rickettsiaceae, Bartonellaceae* и *Anaplasmataceae,* объединяющие большое количество непатогенных облигатных внутриклеточных паразитов, размножающихся только внутри клеток хозяина, и небольшую часть бактерий, вызывающих у человека и животных заболевания, называемые риккетсиозами.

Риккетсии представляют собой бактерии палочковидной, кокковидной или нитевидной формы, неподвижные, не образующие спор, грамотрицательные. Размножаются бинарным делением в клетках хозяина. Некоторые представители — симбионты насекомых. Типичная риккетсия — *Rickettsia prowazekii* — возбудитель сыпного тифа, является также симбионтом платяной вши.

Порядок Chlamydiales. Включает одно семейство — *Chlamydiaceae,* в которое входят болезнетворные для человека виды микроорганизмов.

Класс 2 — Anoxyphotobacteria. Представлен фототрофными бактериями, объединяет организмы с бескислородным типом фотосинтеза. В нем выделяют два порядка: *Rhodospirillales* (пурпурные бактерии) и *Chlorobiales* (зеленые бактерии).

Фототрофные бактерии имеют сферические, палочковидные, вибриоидные и спиральные клетки. Как правило, они размножаются делением пополам, некоторые виды — почкованием. Грамотрицательные. Клетки могут содержать капельки серы. У фототрофных бактерий имеются бактериохлорофиллы *a* и *b* и каротиноидные пигменты. Осуществляют фотосинтез. Для восстановления CO_2 в процессе фотосинтеза используют молекулярный водород, восстановленные соединения серы или органические вещества. Фотолитотрофы и фотоорганотрофы. Многие — облигатные анаэробы. Могут фиксировать молекулярный азот атмосферы. Преимущественно водные бактерии.

Порядок Rhodospirillales. Включает два семейства — *Rhodospirillaceae* и *Chromatiaceae.*

Семейство *Rhodospirillaceae* — пурпурные несерные бактерии — фотоорганотрофы, т. е. могут ассимилировать и окислять на свету простые органические вещества. Большинство не способны окислять сероводород и элементарную серу. Микроаэрофилы. Характерные роды: *Rhodospirillum, Rhodopseudomonas* и *Rhodomicrobium.*

Семейство *Chromatiaceae* — пурпурные серные бактерии — фотолитотрофы, способны к фотолитотрофной ассимиляции CO_2 в присутствии неорганических соединений серы (S, H_2S), которые

окисляются ими до сульфата. Откладывают в клетках серу как запасное вещество. Строгие анаэробы. В это семейство входят роды *Chromatium, Thiospirillum* и др.

Порядок Chlorobiales. Также объединяет два семейства — *Chlorobiaceae* и *Chloroflexaceae.*

Семейство *Chlorobioceae* — зеленые серные бактерии — фотолитотрофы. Способны к фотолитотрофной ассимиляции CO_2 в присутствии сульфида и серы, которые окисляются до сульфата. Строгие анаэробы. К данному семейству относят род *Chlorobium.*

Семейство *Chloroflexaceae* — нитчатые, состоящие из большого количества клеток, зеленые несерные бактерии, передвигающиеся путем скольжения. Размножаются бинарным делением. Грамотрицательные. Факультативные анаэробы. Фототрофы. К данному семейству относят роды *Chloroflexus, Chloronema, Oscillochloris.*

Класс 3 — Oxyphotobacteria — организмы, у которых фотосинтез сопровождается выщелением молекулярного кислорода. К данному классу относят цианобактерии, или синезеленые водоросли, и прохлорофиты.

Порядок Cyanobacteriales. Цианобактерии — грамотрицательные прокариотные организмы, имеющие ригидную многослойную клеточную стенку с внутренним пептидогликановым слоем и трехслойной наружной мембраной. В клетках цианобактерий развита система внутрицитоплазматических мембран — тилакоидов. В тилакоидах расположены компоненты фотосинтетического аппарата. Характерными пигментами цианобактерий являются хлорофилл, а также фикобилины аллофикоцианин, фикоцианин и фикоэритрин, которые находятся в специальных структурах клетки — *фикобилисомах.*

Клетки многих цианобактерий покрыты слизистой капсулой или чехлом, подвижные формы, способны к скользящему движению по твердому субстрату без помощи жгутиков. Цианобактерии представлены одноклеточными, колониальными и многоклеточными организмами. Их клетки имеют сферическую или палочковидную форму (рис. 24). Многоклеточные организмы образуют нити, получившие название «трихом», или «филамент». При прохождении жизненного цикла у некоторых цианобактерий образуются специализированные клетки или нити, служащие для размножения, — баеоциты, гормогонии; для выживания в экстремальных условиях — споры, или акинеты; для азотфиксации — гетероцисты.

Размножаются цианобактерии бинарным делением, почкованием, множественным делением. Нитевидные формы размножаются при помощи обрывков трихома или гормогониями — короткими подвижными цепочками клеток.

Цианобактерии представляют собой большую группу бактерий (более 1000 видов), широко распространенных в почвах, водое-

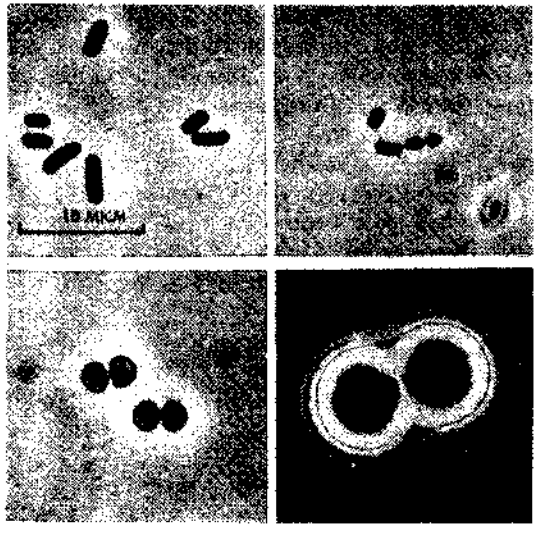


Рис. 24. Цианобактерии (по: Р. Риппка)

мах и других субстратах. Многие представители цианобактерий (более 130 видов) способны к фиксации молекулярного азота атмосферы, что обусловлено образованием специализированных клеток — гетероцист.

Порядок Prochlorales. Включает одноклеточные, симбиотические, грамотрицательные прокариотные организмы сферической формы, неподвижные. Цитоплазма в большей своей части заполнена тилакоидами. Прохлорофиты способны к фотосинтезу с выделением молекулярного кислорода. Отличаются от цианобактерий составом пигментов (образуют хлорофилл *a* и b и, как правило, не содержат фикобилинов), а также внутриклеточной организацией фотосинтетических мембран. Внеклеточные симбионты (экзосимбионты), обитают на телах морских животных — асцидий. Представлены родом *Prochloron*. Обнаружены и свободноживущие прохлорофиты: нитчатые *Prochlorothrix* и одноклеточные морские *Prochlorococcus*[1].

Отдел 2 — *Firmicutes*

К отделу *Firmicutes* (от лат. *firmus* — крепкий, *cutes* — кожа) относят прокариот с грамположительным типом клеточной стенки. Они могут быть в виде кокков, палочек или нитей. Некоторые клетки ветвятся. Бывают подвижные и неподвижные формы. Обычно фирмикуты размножаются бинарным делением, иногда — спорами.

[1] В настоящее время все они отнесены к цианобактериям.

В большинстве случаев это нефотосинтезирующие организмы[1] хемотрофы, аэробы, анаэробы и факультативные анаэробы. Отдел включает неспорообразующие и спорообразующие бактерии, актиномицеты и близкие к ним организмы.

Класс 1 — *Firmibacteria*

Группа 1 — грамположительные кокки. Объединены в три семейства: *Micrococcaceae, Streptococcaceae* и *Peptococcaceae.*

Бактерии семейства *Micrococcaceae* имеют сферические клетки, способные делиться в одной или нескольких плоскостях, что приводит к образованию правильных или неправильных групп или пакетов. Подвижные и неподвижные. Спор не образуют. Хемоорганотрофы. Аэробы или факультативные анаэробы. Виды рода *Micrococcus* распространены в почвах и пресных водах. Род *Staphylococcus* представлен патогенными видами, встречающимися на коже и слизистых оболочках теплокровных организмов, род *Planococcus* — видами, распространенными в морской воде.

Семейство *Streptococcaceae* включает пять родов: *Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus* и *Gemella,* представители которых играют большую роль в получении кисломолочных продуктов, силоса и т. д. Эти организмы имеют клетки сферической или овальной формы, соединенные в пары, цепочки разной длины или тетрады. Неподвижны, спор не образуют. Хемоорганотрофы. Факультативные анаэробы. Сбраживают углеводы с образованием молочной, уксусной и муравьиной кислот, этилового спирта и CO_2.

Широко распространены в почвах, на поверхности растений, в молоке и молочных продуктах, в желудочно-кишечном тракте животных и человека. Среди представителей рода *Streptococcus* довольно много видов, вызывающих инфекционные заболевания человека: пневмонию, перитонит, менингит, септицемию и др.

Семейство *Peptococcaceae* объединяет четыре рода: *Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus* и *Sarcina.* Клетки сферические, встречаются поодиночке, парами, цепочками или тетрадами и трехмерными кубическими пакетами. Неподвижные. Спор не образуют. Хемоорганотрофы. Некоторые сбраживают углеводы. Анаэробы.

Широко распространены в почвах, на поверхности растений, в желудочно-кишечном тракте животных и человека. Некоторые виды вызывают болезни человека. Представители рода *Ruminococcus* обнаружены в рубце жвачных животных, где участвуют в сбраживании целлюлозы.

[1] Исключением является Недавно открытая группа гелиобактерий — грамположительных фотосинтезирующих анаэробных гетеротрофных бактерий. Представители рода *Heliobacterium* образуют споры, являются активными азотфиксаторами, обитают преимущественно в почве.

Группа 2 — палочки и кокки, образующие эндоспоры. Организмы группы представлены одним семейством — *Bacillaceae,* состоящим из пяти родов: *Bacillus, Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum* и *Sporosarcina.*

Клетки палочковидные (кроме представителей рода *Sporosarcina).* Подвижные, с перитрихально расположенными жгутиками; имеются и неподвижные формы. Образуют споры, которые могут располагаться в различных частях материнской клетки; при этом ее форма либо остается неизменной, либо клетка раздувается, приобретая вид булавы, веретена или барабанной палочки. У *Clostridium* споры часто бывают шире материнской клетки. Это обусловливает образование клостридиальной или плектридиальной формы клеток. Грамположительные. Аэробы *{Bacillus, Sporosarcina),* анаэробы *(Clostridium, Desulfotomaculum)* и факультативные анаэробы *(Sporolactobacillus).*

Широко распространены в почвах, воде, а также в пищеварительном тракте животных и человека. Сапротрофы. Принимают участие в разложении различных органических веществ. Среди видов родов *Bacillus* и *Clostridium* есть возбудители болезней человека, животных, растений и насекомых. Род *Desulfotomaculum* представлен анаэробными спорообразующими бактериями, восстанавливающими сульфаты в сульфиды.

Группа 3 — грамположительные палочковидные бактерии, не образующие эндоспор. Представлены одним семейством — *Lactobacillaceae.* По форме это прямые или изогнутые палочки, одиночные или в цепочках. Спор не образуют. Неподвижные. Анаэробы или факультативные анаэробы. Сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты. Распространены в почвах, на растениях, в желудочно-кишечном тракте животных, молочных продуктах и т. д.

К данному семейству относится род *Lactobacillus,* включающий более 30 видов бактерий, которых называют молочнокислыми, так как они вызывают молочнокислое брожение. Многие бактерии рода широко используются в пищевой промышленности для получения кисломолочных продуктов, сыра, а также при квашении овощей, силосовании и т. д. Подробно эта группа бактерий описана в разделе «Молочнокислое брожение».

Класс 2 — Tallobacteria. Включает актиномицеты и родственные им организмы. Все они составляют три различные группы бактерий.

Группа 1 — коринеформные бактерии. Представлена родами *Corynebacterium, Arthrobacter, Brevibacterium, Cellulomonas, Curtobacterium, Microbacterium* и *Kurthia.*

К роду *Corynebactertum* (от греч. *koryna* — булава) относятся грамположительные, неподвижные, не образующие спор бактерии, имеющие вид палочек с утолщениями на концах, напоминающих булаву. В определенных условиях проявляется полиморфизм — клетки могут иметь вид длинных палочек, которые по мере роста превращаются в короткие палочки и кокки. Характерен специфический способ деления, который приводит к образованию T-X-V-Y-форм. Аэробы и факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы. Кислотоустойчивы. К роду *Corynebacterium* относятся виды — возбудители болезней человека, животных и растений.

Род *Arthrobacter* представлен грамположительными, неспорообразующими, неподвижными организмами. Характерна способность к образованию кокковидных форм. Кокки могут удлиняться, превращаясь в неправильной формы палочки, которые при делении сильно изгибаются под углом («защелкиваются»), образуя весьма характерные комплексы типа «прищепок» (рис. 25). У ряда видов выявлено образование гигантских лимоновидных клеток. Строгие аэробы. Хемоорганотрофы. Широко распространены в почвах, где участвуют в разложении органических веществ, главным образом гумусовых. Сапротрофы.

Бактерии рода *Cellulomonas* представляют собой неправильной формы палочки, иногда булавовидные, подвижные. Спор не образуют. Грамположительные. Хемоорганотрофы. Аэробы. Распространены в почвах. Обладают способностью разлагать целлюлозу.

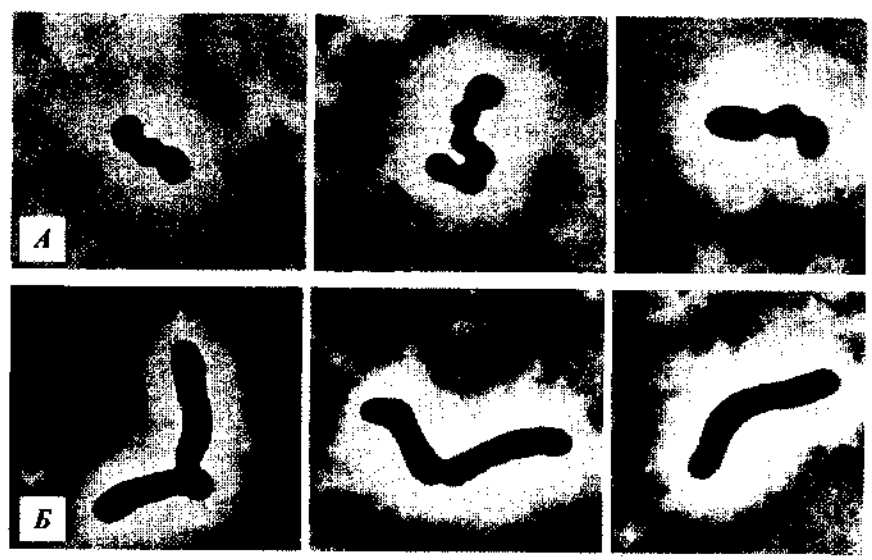


Рис. 25. Клетки *Arthrobacter sp.* в фазово-контрастном микроскопе: *А* — шаровидные клетки; *Б* — палочковидные клетки, х2100 (по: М. П. Старр, Д. А. Кун)

Группа 2 представлена одним семейством — *Propionibacteriaceae,* в котором выделяют два рода: *Propionibacterium* и *Eubacterium.*

Бактерии рода *Propionibacterium* имеют вид ветвящихся или неправильной формы палочек, булавовидных или образующих нити; иногда они бывают кокковидные, раздвоенные и даже разветвленные. Неподвижные. Спор не образуют. Грамположительные. Анаэробы, но некоторые представители этого рода могут развиваться при доступе кислорода. Хемоорганотрофы. Сбраживают углеводы, молочную кислоту и другие вещества. При брожении образуются пропионовая и уксусная кислоты и CO_2. Широко распространены в молочных продуктах, на коже человека, в желудочно-кишечном тракте животных и человека, в почве. Некоторые виды *Propionibacterium* используют при изготовлении твердых сыров. Среди представителей рода есть возбудители заболеваний человека и животных.

К роду *Eubacterium* относятся неспорообразующие грамположительные бактерии палочковидной или неправильной формы. Могут быть подвижными и неподвижными. Хемоорганотрофы. При сбраживании углеводов образуются масляная, уксусная или муравьиная кислоты. Облигатные анаэробы. Обнаружены в полостях тела человека и животных, в продуктах животного и растительного происхождения. Некоторые виды являются возбудителями болезней.

Группа 3 — актиномицеты. Представлена порядком *Actinomycetales.* Это грамположительные бактерии, обладающие способностью к образованию ветвящихся гиф, могут развиваться в мицелий. Гифы у актиномицетов одноклеточные, диаметром 0,5—2 мкм. У актиномицетов, растущих на агаровых питательных средах, различают *субстратный* и *воздушный мицелий.* На твердых питательных средах актиномицеты образуют плотные колонии, окрашенные в различные цвета. На воздушном мицелии образуются воздушные гифы — спороносцы, от которых отшнуровываются споры, участвующие в размножении.

Большинство актиномицетов с мицелиальным строением размножаются спорами. Споры могут быть одиночными или собранными в цепочки разной длины и формы, формируются на спороносцах или в спорангиях. *Спороносцы* — это прямые, волнистые или спиральные образования, располагающиеся на мицелии поочередно, кистями или мутовками. Число спор в одном спороносце колеблется от десятков до сотен. Обычно споры неподвижны, однако у некоторых актиномицетов они имеют жгутики — перитрихальные *(Planomonospora, Planobispora)* или монотрихальные *(Spirillospora),* благодаря которым клетки могут передвигаться в водной среде. Поверхность спор гладкая или с разнообразными выростами — шипами или ворсинками. К актиномицетам относят также организмы, у которых образование гиф почти не наблюдается, и они представляют собой ветвящиеся или слегка разветвленные палочки. Клетки

имеют типичную для прокариот структуру. Преимущественно это аэробные организмы, однако встречаются анаэробные и факультативно-анаэробные формы.

Обитают актиномицеты главным образом в почве, где участвуют в разложении органических соединений, в том числе высокомолекулярных. Среди актиномицетов есть сапротрофные формы и возбудители болезней человека и животных. Многие виды выделяют антибиотические вещества, которые используются для борьбы с бактериальными и вирусными заболеваниями человека, животных и растений.

В порядке *Actinomycetales* выделяют семейства: *Actinomycetaceae, Mycobacteriaceae, Frankiaceae, Actinoplanaceae, Nocardiaceae, Streptomycetaceae, Micromonosporaceae* и др.

Семейство *Actinomycetaceae* представлено грамположительными бактериями, образующими разветвленные гифы, легко подвергающиеся фрагментации. В результате возникают ветвящиеся палочки, кокки, дифтероидные клетки. Воздушный мицелий и споры не образуются. Микроорганизмы неподвижные. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы. Среди представителей семейства есть возбудители болезней. В него включены роды *Actinomyces, Arachnia, Bifidobacterium* и др.

Семейство *Mycobacteriaceae* включает грамположительные неподвижные палочки. Они отличаются некоторой изогнутостью клеток, ветвлением (это характерно для молодых клеток). Образуют небольшой мицелий, короткие нити которого довольно быстро распадаются на отдельные фрагменты. Размножаются делением, спор не образуют. Аэробы. Хемоорганотрофы. Колонии имеют пастообразную или полужидкую слизистую консистенцию. Широко распространены в почвах, где разлагают органические вещества. Ряд микобактерий являются возбудителями болезней животных и человека. К семейству относят один род — *Mycobacterium,* в который входит 39 видов.

Семейство *Frankiaceae* представлено видами, у которых образуется истинный мицелий, септированный и ветвящийся. Гифы обычно довольно тонкие (0,3—0,5 мкм в диаметре), но у отдельных видов бывают толще. Вызывают образование клубеньков у большого числа небобовых двудольных растений (ольха, лох, облепиха и др.). В клетках клубенька, заполненных массой гиф, образуются сферические или булавовидные вздутия. Сферические тельца называют везикулами. Бактерии служат симбионтами растений и могут фиксировать в клубеньке молекулярный азот. Микроаэрофилы. Имеют стадию, в которой клетка свободно живет в почве. Семейство представлено одним родом — *Frankia,* к нему отнесено десять видов.

Семейство *Nocardiaceae* объединяет аэробных актиномицетов с хорошо развитым субстратным мицелием, распадающимся вначале на палочковидные, а затем кокковидные клетки. Лишь у некоторых

нокардий образуется слаборазвитый воздушный мицелий, на котором формируются цепочки спор. Грамположительные. Неподвижные. Колонии на твердых питательных средах имеют тестообразную консистенцию. Виды семейства распространены в почвах. Разлагают сложные органические соединения, в том числе гумусовые. Семейство представлено одним родом — *Nocardia,* к нему отнесен 31 вид.

Семейство *Streptomycetaceae* включает организмы, у которых образуется хорошо развитый субстратный разветвленный мицелий, состоящий из нефрагментированных нитей. На субстратном развивается воздушный мицелий, содержащий спороносцы со спорами. Споры возникают при фрагментировании гиф воздушного мицелия, могут иметь гладкую или узорчатую поверхность (рис. 26). Колонии плотные, врастающие в субстрат, часто пигментированные. Грамположительные. Хемоорганогетеротрофы. Аэробы. Широко распространены в почвах, где участвуют в разложении органических веществ. Стрептомицеты — продуценты многих высокоэффективных антибиотиков, используемых в медицине, ветеринарии, защите сельскохозяйственных растений от вредителей и болезней. Род *Streptomyces* представлен более чем 450 видами.

Семейство *Micromonosporaceae* объединяет организмы, которые имеют воздушный мицелий (кроме рода *Micromonospora).* Одиночные споры, пары или короткие цепочки образуются на воздушном или субстратном мицелии или на том и другом. Аэробы. Сапротрофы. Для рода *Micromonospora* характерны одиночные споры, образующиеся непосредственно на субстратном мицелии. Воздушный мицелий не образуется. Микромоноспоры распространены в почвах, в разлагающемся иле и других субстратах. Способны вызывать трансформацию таких органических веществ, как белок, целлюлоза, хитин, гумусовые соединения и т. д. К семейству относят также роды *Thermoactinomyces, Microbispora, Micropolyspora* и др.

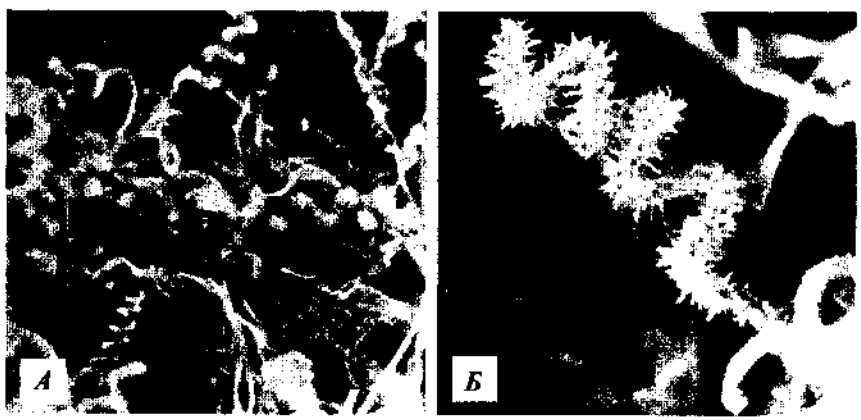


Рис. 26. Поверхность колоний актиномицетов рода *Streptomyces* в сканирующем электронном микроскопе: *А* — общий вид воздушного мицелия, х1740; *Б* — цепочки спор, х5800 (по: С. Кимоно, Дж. Кусе)

Отдел 3 — *Tenericutes*

Отдел объединяет бактерий, не имеющих ригидной клеточной стенки, не синтезирующих пептидогликан. Это плеоморфные организмы, размножающиеся почкованием, фрагментацией и бинарным делением. **Микоплазмы** могут быть сапротрофами, паразитами и возбудителями болезней животных и растений.

Клетки микоплазм окружены цитоплазматической мембраной, в состав которой входят стерины, в частности эргостерин. Сами микоплазмы данные стерины не синтезируют, а удовлетворяют свою потребность в указанных веществах, получая их из внешней среды — от других живых организмов, с которыми находятся во взаимосвязи. Ряд микоплазм синтезируют каротиноиды, накапливающиеся в мембране. Форма клеток может быть сферической или овальной, палочковидной, дисковидной, встречаются и тонкие нити с тенденцией к образованию разветвленных мицелиевидных структур (рис. 27).

Считают, что микоплазмы — самые мелкие из всех известных прокариот, имеющих клеточную структуру (0,1—0,25 мкм). Они, подобно вирусам, проходят через бактериологические фильтры, задерживающие обычные бактерии. Размножение микоплазм происходит неправильным делением, что приводит к образованию клеток разной формы и размеров, а также в результате развития в нитях маленьких кокковидных структур — элементарных телец — с их последующим освобождением после разрушения нитей и, наконец, почкованием. Микоплазмы неподвижны. Факультативные анаэробы, хемоорганогетеротрофы. Распространены на растениях и животных, в водоемах, сточных водах и в почве.

Микоплазмы объединяют в один класс — *Mollicutes* (от лат. *mollis* — мягкий, *cutes* — кожа). Класс включает порядок *Mycoplasmatales,* который состоит из трех семейств — *Mycoplasmataceae, Acholeplasmataceae* и *Spiroplasmataceae.*

Семейство *Mycoplasmataceae* представлено родами *Mycoplasma* и *Ureaplasma,* виды которых широко распространены в природе (почвах, сточных водах и т. д.). Многие из них сапротрофы и паразиты, в том числе возбудители различных заболеваний человека, животных и растений.

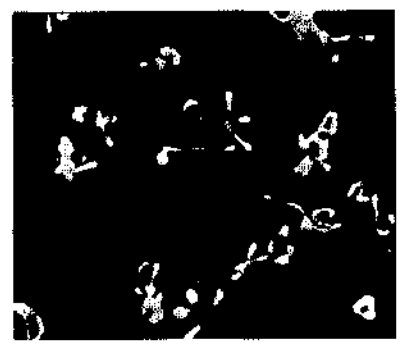


Рис. 27. Клетки рода *Mycoplasma.* Электронная микрофотография, х11200 (по: Е. Клинебергер-Нобель)

Семейства *Acholeplasmataceae* и *Spiroplasmataceae* включают соответственно роды *Acholeplasma* и *Spiroplasma,* представители которых, как правило, сапротрофы, однако среди них встречаются и паразиты млекопитающих и птиц.

Отдел 4 — *Mendosicutes*

К отделу *Mendosicutes* были отнесены прокариоты, обладающие необычной клеточной стенкой, которая не содержит пептидогликана. Клетки имеют форму кокков, палочек и спиралей, а также пирамид, шестилучевой звезды, квадрата, мицелиальных ансамблей и т. д. Они различно окрашиваются по Граму. Эндоспор не образуют; многие виды подвижны. Известны как строгие анаэробы, так и аэробы. Многие встречаются в экстремальных местообитаниях.

Представлены классом *Archaebacteria*[1]. К нему относят прокариот, обладающих уникальными физиологическими, биохимическими свойствами и экологией, резко отличными от остальных прокариот. Так, они отличаются от других бактерий составом и первичной структурой рибосомальных 16S и 5S рРНК, а также транспортных РНК; составом мембранных липидов и образованием однослойной липидной мембраны; составом клеточных стенок (состоят не из пептидогликана, а из других биополимеров — кислых полисахаридов, белков и псевдомуреина); отсутствием сложных жизненных циклов, патогенных и паразитических видов, экзоферментов; способностью использовать только низкомолекулярные органические соединения; жизнеспособностью некоторых видов даже при температуре выше 100 °С и другими признаками. Среди архебактерий выделяют пять основных групп: метанообразующие, аэробные сероокисляющие, анаэробные серовосстанавливающие, галобактерии и термоацидофильные «микоплазмы».

Группа 1 — метаногены. Представлена целым рядом родов, в том числе *Methanobacterium, Methanococcus, Methanosarcina* и др. Для данной группы характерны палочковидные или кокковидные клетки, подвижные и неподвижные. Спор не образуют. Строгие анаэробы. Облигатные и факультативные хемолитотрофы и хемоорганотрофы. Мезофилы, термофилы, имеются галофильные виды.

[1] Необходимо еще раз отметить, что на сегодняшний день архебактерии наряду с эубактериями и эукариотами получили наиболее высокий таксономический статус — домена *(Domain).* Новые названия доменов, представленных прокариотами, — археи *(Archaea)* и бактерии *(Bacteria)* вместо архебактерий и эубактерий, соответственно.

Обратите также внимание на написание названий таксонов. Правила написания неоднократно менялись: архебактерии вначале писали как *Archaeobacteria,* затем — *Archaebacteria,* прокариоты в разное время писали как *Procaryotae* и *Prokaryotae. (Прим. ред.)*

Энергию получают при окислении H_2 с восстановлением CO_2 до CH_4 либо при использовании уксусной кислоты или метилового спирта с образованием метана и CO_2. Жизнедеятельность метаногенов в природе связана с микроорганизмами, которые при сбраживании образуют уксусную и муравьиную кислоты, свободный водород и диоксид углерода. Метаногены широко распространены в почвах, илах, желудочно-кишечном тракте животных. Нашли они и практическое применение — выделяющийся из отстойников со сточными водами метан собирают и используют как топливо.

Группа 2 — аэробные сероокисляющие архебактерии — представлена родом *Sulfolobus.* Эти организмы окисляют элементарную серу, используя ее в качестве источника энергии. Факультативные хемолитоавтотрофы. Аэробы. Термофилы, развиваются при температуре 70—75 °С, ацидофилы (оптимум pH 3).

Группа 3 — анаэробные серовосстанавливающие архебактерий. В ней выделяют роды *Thermoproteus, Thermofilum, Desulfurococcus* и др. Представители группы восстанавливают элементарную серу до H_2S. Строгие анаэробы. Облигатные и факультативные хемолитотрофы и хемоорганотрофы. Экстремальные термофилы — оптимальная для их развития температура от 85 до 105 °С. Распространены в гидротермальных источниках.

Группа 4 — галобактерии. К ней отнесены роды *Halococcus, Halobacterium, Haloarcula.* Морфология клеток галобактерии весьма разнообразна — они могут быть палочковидной, кокковидной, квадратной и коробочковидной формы. Галобактерии способны развиваться на средах с высокими концентрациями NaCl (20—25%). Это так называемые экстремальные галофилы. Среди них имеются аэробы и факультативные анаэробы.

Необычная физиологическая особенность галобактерий — способность к особому типу фотосинтеза — фотофосфорилированию с участием пурпурной мембраны, в которой содержится пигмент бактериородопсин, поглощающий световую энергию. Кроме того, для них характерно использование ионов Na^+ в биоэнергетических процессах. Участвуют в превращении углерода и азота в засоленных почвах, соленых озерах с высокой температурой воды и низким содержанием кислорода, солеварнях и других субстратах.

Группа 5 — термоацидофильные «микоплазмы» — представлена одним родом — *Thermoplasma.* Это хемоорганотрофы, развивающиеся при высокой температуре (60 °С) и кислотности (pH 1—2). Аэробы. Обнаружены в Японии в горячих источниках.

Контрольные вопросы и задания

1. Расскажите о классификации и номенклатуре микроорганизмов. 2. На основании каких признаков представители царства *Procaryotae* разбиты на четыре отдела? 3. Назовите основных представителей грамположительных и

грамотрицательных бактерий, микоплазм и архебактерий. 4. Каковы отличительные признаки фотосинтезирующих бактерий классов аноксифотобактерии и оксифотобактерии? 5. В чем уникальность архебактерий?

Морфология и систематика эукариотных микроорганизмов

3.1. Водоросли — *Algae*

Водоросли — эукариотные организмы, осуществляющие фотосинтез с выделением кислорода и имеющие хлоропласты. Известны одноклеточные, нитчатые, колониальные (ценоцитные) формы, а также многоклеточные, состоящие из слабо дифференцированных клеток и тканей, которые образуют структуру, сходную с растениями, так называемый *таллом,* или *слоевище.* Слоевища могут быть представлены простыми нитями, шнуровидными тонкими нитями, шаровидными образованиями, пластинчатыми или кустистыми структурами с ложными листьями. Некоторые водоросли можно наблюдать только под микроскопом, размеры других достигают десятков метров.

Одноклеточные водоросли бывают без жгутиков и со жгутиками. Для большинства одноклеточных водорослей характерны два жгутика. Колониальные водоросли состоят из нескольких или многих клеток, одинаковых по форме и функциям. У многоклеточных водорослей отдельные клетки соединены *плазмодесмами.*

Общая морфологическая характеристика. Морфологическое разнообразие водорослей велико, но почти для всех видов, встречающихся в почве, характерны микроскопические размеры и одноклеточность. Встречаются также нити или колонии. Клетки водорослей окружены клеточной стенкой, состоящей из целлюлозы с примесью пектиновых веществ. У одних водорослей стенки клеток покрыты толстым слоем органических веществ, у других пропитаны кремнеземом. В клетке имеется цитоплазма, одно или много ядер, вакуоли и хлоропласты — органы фотосинтеза. У водорослей хлоропласты бывают самой разнообразной формы и окраски, но обязательно содержат пигмент хлорофилл. Цвет водорослей зависит и от других пигментов. У многих видов водорослей в хлоропластах содержатся особые белковые тельца — пиреноиды, около которых откладывается крахмал. Он может накапливаться и непосредственно в хлоропластах. Кроме крахмала, клетки водорослей могут синтезировать другие полисахариды, а также моносахара и масла. У этой

группы микроорганизмов известно три способа размножения: вегетативное, бесполое и половое.

Водоросли широко распространены в природе. Их обнаруживают в реках, морях, океанах, озерах, болотах, почвах и других субстратах. Водоросли, обитающие в пресной или морской воде, в основном свободноживущие, однако некоторые одноклеточные виды вступают в симбиоз с морскими беспозвоночными (губками, коралловыми полипами и др.). Наземные водоросли обитают как на поверхности почв, так и в их толще, а также на коре деревьев, скальных породах и т. п. Некоторые представители микроорганизмов данной группы вступают в симбиоз с грибами (аскомицетами) с образованием *лишайников* — двухкомпонентных ассоциаций, способных развиваться в крайне неблагоприятных условиях температуры и влажности.

Почвенные водоросли распространены повсеместно, главным образом в поверхностных слоях почвы, где условия влажности и освещенности для них наиболее благоприятны. Влага — самый важный экологический фактор, определяющий распространение водорослей.

Потребность водорослей в питательных веществах различна. Благодаря способности к фотосинтезу водоросли на свету используют углерод диоксида углерода. Источником азота для них служат минеральные соединения этого элемента. Нитраты водоросли усваивают легче других соединений.

Виды, обитающие в глубоких слоях почвы, нуждаются в источниках органического углерода, они берут его из растительных остатков или из продуктов обмена веществ бактерий. В таких условиях лучший источник азота для водорослей — аммонийный азот. Следовательно, для развития водорослей в глубине почвы благоприятно высокое содержание органических веществ, поэтому они и встречаются в больших количествах в окультуренных и садовых почвах.

Водоросли активно участвуют в процессах превращения азота, они переводят нитратный и аммонийный азот в органические соединения, входящие в состав клеток. Водоросли играют важную роль в круговороте веществ на Земле, так как продуцируют и накапливают органическое вещество, особенно в формирующихся почвах.

Систематика. Классификация водорослей основана на таких признаках, как химический состав клеточной стенки, строение и расположение жгутиков у подвижных клеток, характер фотосинтетических пигментов, а также природа образуемых клеткой запасных органических веществ. На основании перечисленных признаков водоросли делят на несколько крупных групп. Остановимся только на тех из них, представители которых широко распространены в почвах.

Зеленые водоросли *Chlorophyta* — самая обширная и разнообразная группа водорослей. Представлена одноклеточными формами, а также многоклеточными, для которых характерны нитчатые или плоские листовидные талломы. Зеленые водоросли разнообраз-

ны по морфологии клеток и организации таллома. Так, одноклеточные водоросли порядка *Chlorococcales* могут иметь круглые, серповидные или веретеновидные клетки. В ряде случаев виды данного порядка образуют колонии, состоящие из трех-четырех клеток. Для многих зеленых водорослей характерны жгутики, но есть и неподвижные виды.

Одноклеточные жгутиковые водоросли относят к порядку *Chlamydomonadales.* Клетки видов данного порядка имеют по два жгутика, однако при неблагоприятных условиях переходят в пальмеллоидную стадию, теряют жгутики, выделяют слизь, но продолжают делиться. Описанная стадия характерна для обитателей почвы. Для зеленых водорослей порядка *Ulotrichales* характерны нитчатые или пластинчатые (возникшие из нитчатых) талломы.

Размножаются зеленые водоросли бесполым и половым путем. При бесполом наблюдается деление и образование бесполых спор: неподвижных — автоспор и подвижных — зооспор. При половом размножении происходит конъюгация двух клеток, сливаются их ядра с образованием половых спор, впоследствии прорастающих в новые нити.

Желто-зеленые водоросли — *Xanthophyta.* В почвах встречаются одноклеточные и нитчатые формы желто-зеленых водорослей. Обнаружен вид с сифональной структурой таллома, представляющий собой одну сильно разросшуюся многоядерную клетку. Отличительный признак желто-зеленых водорослей — наличие разных жгутиков. Из двух жгутиков клетки или зооспоры обычно один длиннее другого. Оболочка клеток водорослей данной группы часто состоит из Н-образных половинок, способных иногда разделяться.

Размножаются желто-зеленые водоросли вегетативно, бесполым путем (зооспорами и автоспорами); очень редко наблюдается половой процесс — изогамия.

В почвах широко распространены одноклеточные желто-зеленые водоросли родов *Bumilleriopsis, Chamciopsis* и *Pleurochloris;* нитчатые виды родов *Heterothrix* и *Tribonema.* Представитель рода *Botrydium (B. granulatum)* имеет неклеточный таллом. Это пузыревидная водоросль диаметром до 1 мм, обитающая на поверхности сырой, хорошо удобренной почвы. К почве ботридиум прикрепляется бесцветными ветвящимися ризоидами.

Диатомовые водоросли *Bacillariophyta (Diatomeae)* представлены одноклеточными формами. Клеточные стенки содержат кремний и состоят из двух створок, заходящих одна за другую, подобно двум частям коробки. На клеточных стенках диатомовых водорослей виден рисунок. Для каждого вида характерен индивидуальный рисунок (тонкие ребрышки, линии, поры и т. п.). Диатомеи способны к скользящему движению благодаря особому току протоплазмы, выпускаемой через шов — поясок на поверхности клеточной стенки. В клетках водорослей данной группы откладываются запасные питательные вещества, главным образом в виде жира, а не крахмала. Диатомеи размножаются бесполым или половым путем. В почвах распространены виды родов *Hantzschia, Navicula, Nitzschia, Pinnularia* и др.

3.2. Простейшие — Protozoa

Простейшие — наиболее многочисленная и повсеместно распространенная в почвах группа одноклеточных микроорганизмов. Размеры их обычно составляют 5—20 мкм, клетки могут быть шаровидной, овальной, сплюснутой или разветвленной формы. Эти микроорганизмы обычно подвижны и пластичны, т. е. легко изменяют форму. Для простейших, обитающих в почве, характерна способность образовывать цисты, устойчивые к неблагоприятным условиям. Цисты отличаются высокой сопротивляемостью и жизнестойкостью, способствуют выживанию даже после длительного высушивания, обработки кислотами и т. п. Простейшие — обычно паразиты и хищники, но среди них есть и сапротрофы.

Число простейших в почве зависит от ее типа, содержания почвенного органического вещества, влажности, сезона года, растительности и других факторов. Населенность почвы простейшими колеблется в значительных пределах и может достигать нескольких сотен тысяч и миллионов клеток в 1 г абсолютно сухой почвы. Общая масса живых клеток на 1 га может быть от нескольких килограммов в лесных подзолистых почвах до нескольких тонн на орошаемых сероземах под люцерной и хлопчатником. Биомасса простейших уступает биомассе бактерий.

Сложные отношения складываются у простейших с другими почвенными микроорганизмами. Большинство видов почвенных простейших — бактериядные формы, причем обладающие определенной избирательностью в питании. Так, почвенные амебы кроме других бактерий активно поглощают клетки азотобактера. Уничтожая часть клеток, простейшие поддерживают численность азотобактера на определенном уровне. Кроме того, биологически активные вещества простейших положительно влияют на фиксацию азота атмосферы почвенными микроорганизмами.

Некоторые виды почвенных грибов и актиномицетов подавляют развитие простейших. В свою очередь, определенные формы простейших используют содержимое грибов для питания, пробуравливая стенки конидий.

Простейшие стимулируют рост и развитие высших растений. Они могут оказывать положительное действие на растения непосредственно, выделяя продукты обмена веществ, обогащающие ризосферу азотсодержащими соединениями, или участвуя в разложе-

нии сложных органических веществ до более простых, доступных для растений. Простейшие могут воздействовать на высшие растения и косвенно, влияя на численность, видовой состав и жизнедеятельность микробного населения почвы. В почве живут представители трех классов простейших: *Flagellata* (жгутиконосцы), *Rhizopoda* (саркодовые) и *Ciliata* (инфузории).

Класс I — *Flagellata,* или ***Mastigophora,*** — жгутиковые простейшие, имеющие один или несколько жгутиков. При размножении клетки жгутиковых простейших делятся в продольном направлении. В клетках некоторых видов жгутиконосцев содержатся пигменты, в том числе хлорофилл. Типичный представитель таких растительных жгутиконосцев, или фитомастигинов, — эвглена зеленая *{Euglena viridis)* способна к фотосинтезу. Описанные микроорганизмы обладают свойствами как животных, так и растений и входят как в ботаническую, так и в зоологическую классификацию. В некоторых случаях, например при потере в темноте хлорофилла, зеленые жгутиконосцы могут менять тип питания на осмотрофный. Поэтому их можно отнести к миксотрофам — организмам со смешанным типом питания.

В почвах живут также зеленые — *Chlamydomonas,* бурые — *Cryptomonas* и желтоватые — *Ochromonas* жгутиконосцы. Бесцветные жгутиконосцы, или зоомастигины, представлены как сапротрофами, так и формами с голозойным типом питания. К последним относят виды родов *Bodo, Cercomonas, Oicomonas, Manas.и др.*

Класс 2 — Rhizopoda, или ***Sarcodina.*** Среди саркодовых простейших, обитающих в почвах, следует отметить корненожек — голых и раковинных амеб. У корненожек превалирует амебоидный способ передвижения, хотя отдельные виды способны к образованию жгутиков. Характерная особенность амеб — непостоянство формы тела. Они не имеют жесткой клеточной стенки и способны образовывать временные протоплазматические отростки — *псевдоподии,* служащие для передвижения и «заглатывания» пищи.

Раковинные амебы относят главным образом к сапрофагам. Часть тела этих амеб заключена в панцирь, или раковину. Псевдоподии вытягиваются наружу через отверстие — устье, а раковина играет защитную роль. Строение панциря, имеющего характерную форму, положено в основу классификации раковинных амеб. Обитают виды данной группы простейших (преимущественно рода *Plagiopyxis)* в различных почвах, особенно много их в болотных почвах.

Класс 3 — *Ciliata,* или ***Ciliophora,*** — инфузории, или ресничные простейшие. Это очень большая и разнообразная группа организмов, широко распространенных в пресных водоемах. В почве простейших данного класса значительно меньше, чем жгутиковых и амеб. Инфузории в отличие от амеб имеют определенную и постоянную форму благодаря плотной, хотя и гибкой, наружной оболочке. Клетка инфузории округлая спереди и заостренная сзади. Поверхность ее покрывают многочисленные реснички (около 2500), сгруппированные в продольные косые или спиральные ряды. При помощи ресничек клетки движутся и подводят пищу к ротовому отверстию — цитостому. Клетки инфузорий достаточно сложно устроены: в цитоплазме различают экто- и эндоплазму, имеются макро- и микронуклеус, пищеварительные и сократительные вакуоли и различные включения. Клетка делится в поперечном направлении, а не в продольном, как у жгутиковых.

Представителей почвенных инфузорий выделяют в подклассы: *Holotricha (Colpoda, Paramecium)* — с равномерным расположением ресничек по всей поверхности клетки; *Spirotricha* — со спиральными рядами ресничек от заднего конца клеток к ротовому отверстию *(Stylonichia); Peritricha* — с клетками, которые как бы поперечно «срезаны» у ротового отверстия, причем ротовая ямка окружена двумя рядами укороченных ресничек; среди инфузорий данного подкласса есть прикрепленные формы со стебельком (род *Vorticella).*

3.3. Грибы — *Fungi*

Грибы — низшие эукариотные одноклеточные и мицелиальные хемоорганотрофные организмы. Их относят к особому царству — *Mycota.* Представителей грибов делят на *макро-* и *микромицеты.* Макромицеты образуют крупные плодовые тела, отсутствующие у микромицетов. У последних на протяжении всего жизненного цикла имеются только микроскопические структуры.

Общая морфологическая характеристика. Тело гриба, называемое *мицелием,* или *грибницей,* составляет разветвленные длинные нити, или *гифы.* У некоторых грибов нити гиф не имеют поперечных перегородок. Для большинства характерны гифы с поперечными перегородками — *септами,* разделяющими их на участки. На основании данного признака грибы делят на низшие — несептированные и высшие — септированные.

Грибы значительно крупнее бактерий и актиномицетов. Диаметр их гиф колеблется от 5 до 50 мкм и более. Клеточная стенка большинства грибов содержит хитин или близкие к нему соединения. Под клеточной стенкой находится зернистая цитоплазма. Она содержит большое количество рибосом, состоящих почти из одной РНК и служащих основным местом синтеза белка. В цитоплазме грибов есть митохондрии, в которых локализованы дыхательные ферменты, могут быть также включения волютина и жиров. В клетках грибов четко дифференцировано ядро, окруженное мембраной. Несептированный мицелий грибов содержит несколько ядер.

Наличие мицелия — один из отличительных признаков грибов. Отдельные участки мицелия грибов могут превращаться в специальные образования — *спорангии,* в которых формируются споры, служащие для сохранения или размножения вида. Способы размножения грибов весьма разнообразны. У них возможно вегетативное, бесполое и половое размножение. Специфичность размножения положена в основу систематики того или иного гриба.

Грибы широко распространены в природе. Их обнаруживают во всех естественных субстратах (почвах, растительных и животных остатках и т. п.), продуктах питания и т. д. Среди грибов есть не только сапротрофы, но и паразиты, и даже хищники. В почве грибы участвуют в разложении органических веществ, в том числе таких сложных соединений, как целлюлоза, лигнин. Грибы могут вызвать порчу пищевых продуктов, деревянных построек, изделий из каучука и резины, нефтепродуктов и т. д. Отдельные виды являются возбудителями болезней растений, животных и человека.

Систематика[1]**.** Рассмотрим некоторых представителей грибов, важных для сельскохозяйственного или промышленного производства. В царство *Mycota* входят слизевики, или миксомицеты (отдел *Myxomycota),* и собственно грибы, или истинные грибы (отдел *Eumycota).*

Миксомицеты — отдел Myxomycofa. Это группа своеобразных организмов, напоминающих по некоторым свойствам грибы, но в определенные периоды цикла развития сходных с амебами. Встречаются миксомицеты в виде слизистой массы, передвигаются, подобно амебам, выпуская псевдоподии. Тело этих микроорганизмов не разделено на клетки, в нем много ядер. Миксомицеты могут размножаться простым делением, но на определенной стадии развития две слизистые массы соединяются, образуя плодовое тело, в котором возникают споры. Последние, попадая в благоприятную среду, прорастают, затем начинают делиться, образуя амебоидные клетки. Некоторые из таких клеток — гамет сливаются друг с другом с образованием зиготы, которая делится и разрастается до многоядерной слизистой массы.

Истинные грибы — отдел *Eumycota*. Эту группу делят на ряд классов, краткая характеристика которых приведена ниже.

Класс *Chytridiomycetes* характеризуется полным отсутствием мицелия или ценоцитным (неклеточным) мицелием. Представители данного отдела размножаются бесполым (зооспорами) или половым путем. Зооспоры и гаметы (планогаметы) имеют один задний жгутик, построенный по типу кнута. Многие хитридиомицеты — типичные водные организмы, однако есть среди них и обитатели почвы, паразиты растений, а также виды, живущие на отмерших растительных остатках.

[1] Ранги таксонов грибов даны в соответствии с руководством Ю. Т. Дьякова «Введение в альгологию и микологию» (М., Изд-во Моск. ун-та, 2000).

Класс Zygomycetes — группа организмов, полностью утративших подвижные стадии развития. У его представителей наиболее часто отмечается половое размножение. Бесполое размножение осуществляется неподвижными спорангиеспорами, образующимися внутри спорангиев.

К описываемому классу в числе прочих относят представителей мукоровых грибов, широко распространенных в почвах. Мукоровые имеют хорошо развитый разветвленный одноклеточный мицелий, над которым возвышаются плодоносящие гифы — спорангиеносцы. Размножение бесполым путем происходит при помощи неподвижных спорангиеспор, образующихся внутри спорангиев. Среди часто встречающихся в почве мукоровых грибов можно отметить роды *Mucor, Thamnidium, Rhizopus* и др.

Класс Ascomycetes представляет самую обширную группу грибов с разветвленным многоклеточным мицелием. Размножение у аскомицетов происходит обычно при помощи конидий. Они размножаются и половым путем — *аскоспорами,* которые образуются после слияния ядер половых клеток — гамет в сумке — *аске.* В аске могут развиваться две, четыре, шесть или восемь аскоспор. Аски располагаются в образованиях различной формы — в аскокарпиях, или клейстотеках, — вместилищах без отверстий, перитециях — вместилищах с отверстием или апотециях, имеющих форму чаши или куба.

К представителям класса *Ascomycetes,* часто встречающимся в почве, относят виды родов *Aspergillus, Penicillium* и *Chaethomium.* Этим грибам свойственно размножение при помощи конидий, но иногда у них образуются сумки. Один из широко известных представителей отдела — спорынья.

Класс Basidiomycefes — мицелий этих грибов состоит из многоклеточных гиф. Ядро базидиомицетов дифференцированное. Половое размножение осуществляется *базидиями* — образованиями, сходными по функциям с сумками аскомицетов. Каждая базидия образуется после слияния ядер — гамет и представляет собой цилиндрическую клетку, на конце которой формируются четыре *базидиоспоры.* Последние отделяются и, попадая в благоприятные условия, развиваются в новый мицелий.

К базидиомицетам относят многих вредителей сельскохозяйственных растений, например возбудителей ржавчины и головни, вредителя древесины — домового гриба *Serpula lacrymans,* множество высших, в том числе съедобных, грибов, а также разнообразных сапротрофов, активно участвующих в разложении органических остатков.

Класс Deuteromycetes — сборная группа, включающая так называемые несовершенные грибы. Их тело состоит из расчлененных прозрачных или окрашенных многоклеточных гиф, иногда из почкующихся клеток. Размножаются исключительно бесполым путем, при котором образование конидий происходит на изолированных или расположенных группами конидиеносцах или в специальных образованиях, называемых *пикнидами.*

К дейтеромицетам относят грибы порядка *Sphaeropsidales, Melanconiales* и *Hyphomycetales,* или *Moniliales,* представители которых широко распространены в почве.

Грибы порядка *Sphaeropsidales* характеризуются конидиями, которые образуются в пикнидах, остающихся закрытыми или открывающихся наружу порами или трещинами. К данному классу относят среди других и род *Phoma,* виды которого образуют микоризу с корнями некоторых растений.

Порядок *Melanconiales* включает организмы, не имеющие пикнид. Конидии меланкониевых грибов расположены на конидиеносцах, соединенных в особые образования — *ацервулы.*

Грибы порядка *Hyphomycetales* имеют расчлененные разветвленные прозрачные или темноокрашенные гифы. Разнообразные по форме конидии грибов этой группы находятся на конидиеносцах, расположенных по одному или группами. В почве обитают виды многих родов, относящихся к данному классу: *Cephalosporium, Trichoderma, Cladosporium, Alternaria, Fusarium* и др.

Несовершенные грибы подразделяются на семейства в соответствии с типом мицелия и формой конидиеносцев. К несовершенным грибам относят также группу грибов с неустановленным способом полового и бесполого размножения — ***Mycelia sterilia,*** или **грибы со стерильным мицелием,** сюда входит ряд грибов *(Sclerotium, Rhizoctonia* и др.), имеющих значение в почвенных процессах.

Дрожжи и дрожжеподобные грибы относятся к классам *Ascomycetes, Basidiomycetes* и *Deuteromycetes.* Так, в класс *Ascomycetes* входит порядок *Endomycetales* — дрожжеподобные сумчатые грибы, образующие эндоспоры. К упомянутому классу относят семейство *Saccharomycetaceae,* представители которого почти лишены мицелия. Это одноклеточные организмы овальной формы, размножающиеся почкованием или делением.

В данное семейство входит хорошо изученный род *Saccharomyces,* многие виды которого, например *Saccharomyces cerevisiae,* имеют большое значение в пищевой промышленности. Эти дрожжи размножаются почкованием.

Виды рода *Schizosaccharomyces,* также относящегося к сахаромицетам, размножаются делением. Среди этих микроорганизмов есть возбудители спиртового брожения и дрожжи, вызывающие порчу вин, к ним относят и многие другие роды дрожжей, например *Nadsonia,* виды которого обусловливают порчу пищевых продуктов.

В класс Ascomycetes входят и наиболее типичные почвенные дрожжи рода *Lipomyces,*

Класс *Basidiomycetes* представлен дрожжами, у которых образуются половые структуры базидиального типа — базидиоспоры. Большая часть этих дрожжей родственна головневым грибам. Среди них красные дрожжи рода *Rhodosporidium* и розовые рода *Sporobolomyces,* обитающие на поверхности листьев растений, в бесполой стадии размножающиеся баллистоспорами.

К классу *Deuteromycetes* относят дрожжеподобные организмы, не имеющие эндоспор. Они размножаются почкованием. Некоторые виды рода *Torula* вызывают спиртовое брожение. У дрожжей рода *Rhodotorula* синтезируется розовый пигмент, они вызывают порчу пищевых продуктов. Существуют и болезнетворные дрожжи, например некоторые виды *Candida.*

В почве встречается значительное число видов дрожжей, основная масса которых не вызывает спиртового брожения. Дрожжей — возбудителей брожения чаще всего можно обнаружить в почвах виноградников.

К грибоподобным организмам в настоящее время относят представителей **класса *Oomycetes.*** Некоторые исследователи объединяют их в один таксон с водорослями.

Оомицеты — организмы с характерным половым процессом *(оогамия)* и подвижными зооспорами с двумя жгутиками — элементами бесполого размножения. Многие их представители — наземные облигатные паразиты, полный жизненный цикл которых проходит на растении-хозяине. К оомицетам относят многие фитопатогенные грибы, например роды *Pythium, Phytophtora,* вызывающие болезни сельскохозяйственных растений.

3.4. Вирусы

Вирусы — группа ультрамикроскопических облигатных внутриклеточных паразитов, способных размножаться только в клетках живых организмов (многоклеточных и одноклеточных). Среди них имеются возбудители заболеваний человека, животных, растений, насекомых, простейших и микроорганизмов.

Вирусы были открыты в 1892 г. *Д. И. Ивановским* при изучении причин гибели табака от мозаичной болезни, выражающейся в появлении пятен на листьях растений. Ученый обнаружил, что здоровое растение получает возбудителя с соком больного растения даже после пропускания этого сока через бактериологические фильтры. Следовательно, болезнь вызывает организм, который способен проходить через бактериологические фильтры. Эти микроорганизмы назвали фильтрующимися вирусами, а затем просто вирусами.

Вирусы обладают следующими характерными особенностями, отличающими их от других микроорганизмов:

- не имеют клеточного строения;
- не способны к росту и бинарному делению;
- не имеют собственных систем метаболизма;
- содержат нуклеиновые кислоты только одного типа — ДНК или РНК;
- используют рибосомы клетки-хозяина для образования собственных белков;
- не размножаются на искусственных питательных средах и могут существовать только в организме восприимчивого к ним хозяина.

Обычно вирусы существуют в двух формах — внеклеточной в виде так называемого *вириона* и внутриклеточной, называемой *репродуцирующимся,* или *вегетативным, вирусом*. У вириона отсутствует обмен веществ, он не растет и не размножается. Внутриклеточная форма представляет собой активный агент, который, попав в клетку хозяина (растения, животного, микроорганизма), использует ее биосинтетический и энергетический аппарат для репродукции новых вирусов, а впоследствии может вызвать и гибель самой клетки. Следовательно, только в клетке хозяина вирус способен функционировать и репродуцироваться, приобретая свойства живого организма.

Химический состав вирусов довольно прост. Число химических соединений, из которых они состоят, невелико. Вирусы представляют собой нуклеопротеиды и состоят из нуклеиновой кислоты и нескольких кодируемых ею белков. Нуклеиновые кислоты вирусов отличаются значительным разнообразием, превосходя в этом отношении даже клеточные формы жизни — эукариот и прокариот.

Как известно, в состав клеток входят ДНК и РНК, в то время как вирусы содержат только один тип нуклеиновой кислоты — ДНК или РНК. Поэтому все вирусы подразделяют на две группы — ДНК-геномные и РНК-геномные. Обычно вирусы растений содержат РНК-геномы, вирусы человека и животных как ДНК-, так и РНК-геномы. Почти все бактериофаги ДНК-геномны.

Сложно организованные вирусы (вирусы животных и человека) сложны по химическому составу и содержат дополнительные белковые или липопротеидные оболочки. Кроме нуклеиновой кислоты и белков, они содержат липиды в наружных оболочках и углеводы в составе белков наружных оболочек (гликопротеидов). Некоторое количество липидов есть у бактериофагов и ряда крупных вирусов растений. У некоторых сложных вирусов выявлены ферменты. У бактериофагов также обнаружены ферменты — лизоцим и аденозинтрифосфатаза.

Один из наиболее хорошо изученных фитопатогенных вирусов — *вирус табачной мозаики* (ВТМ). В 1935 г. *У. Стенли* выделил и получил этот вирус в кристаллической форме. При введении в расте-

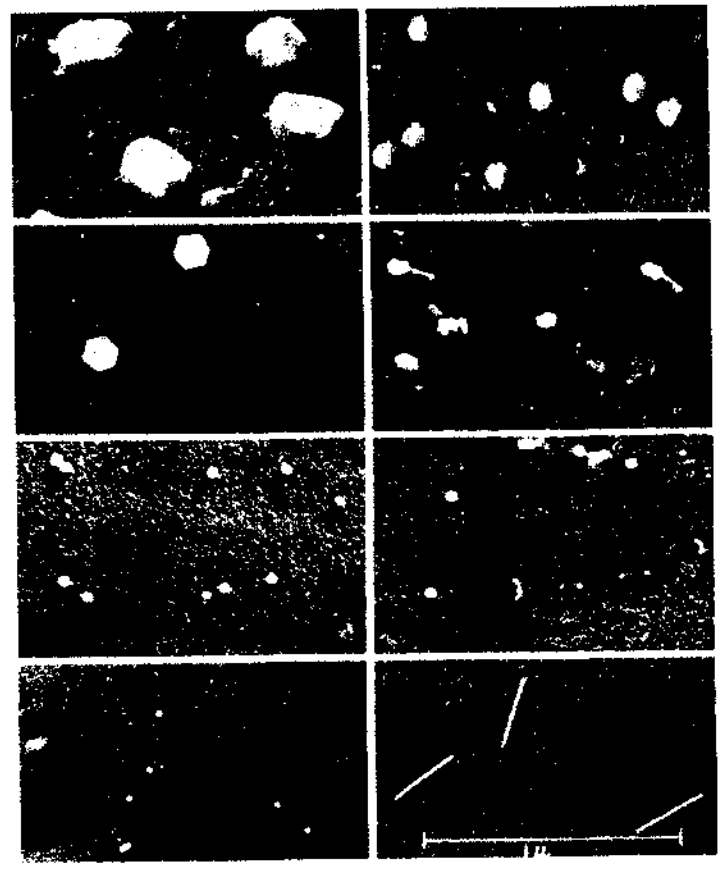


Рис. 28. Электронные фотографии вирусов животных, растений и бактерий: *слева* — коровьей оспы, заболеваний насекомых, бактериофага Т3, полиомиелита; *справа* — гриппа, бактериофага Т2, папилломы кроликов, мозаики табака

ние табака кристаллы вызывали симптомы мозаичной болезни. Получены в кристаллическом виде и многие другие вирусы.

Изучение вирусов под электронным микроскопом показало, что они разнообразны по форме и имеют довольно сложное строение. Различают следующие формы вирусов: *палочковидную,* при которой вирус имеет вид прямого цилиндра (вирус табачной мозаики); *нитевидную,* представляющую эластичные изгибающиеся нити (некоторые вирусы растений и бактерий); *сферическую,* сходную с многогранниками (вирусы животных и человека); *кубовидную,* по виду напоминающую параллелепипед с закругленными краями (вирусы животных и человека); *булавовидную,* характеризующуюся наличием головки и отростка (вирусы бактерий и актиномицетов) (рис. 28).

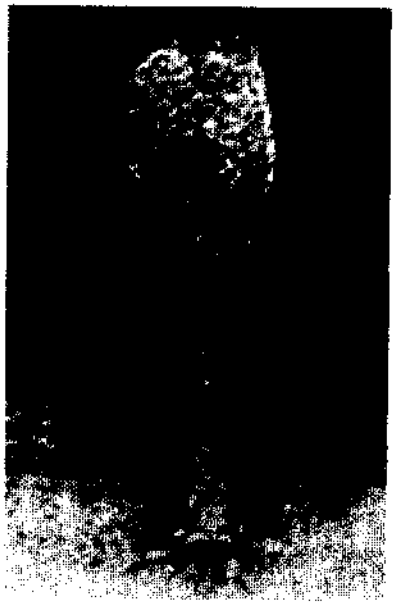


Рис. 29. Т-бактериофаг. Электронная микрофотография (по: С. Бреннер)

Внеклеточная форма существования вируса, вирион, состоит из нуклеиновой кислоты и белка. Нуклеиновая кислота уложена в виде спирали и окружена белковой оболочкой, называемой *капсидом.* Последний образован большим числом субъединиц белка — *капсомеров,* которые, в свою очередь, представлены одной или несколькими молекулами белка. Белковый капсид, объединенный с нуклеиновой кислотой (ДНК или РНК), носит название *нуклеокапсида.* По способу укладки капсомеров выделяют капсиды, построенные по спиральному и кубическому типам симметрии. В первом случае капсид имеет цилиндрическую форму, во втором — форму многогранника. К вирусам со спиральным типом симметрии относят вирус табачной мозаики.

Для многих вирусов бактерий, или *фагов,* характерен так называемый сложный тип симметрии: головка фага имеет форму многогранника (кубическая симметрия), хвостовой отросток — форму цилиндра (спиральная симметрия) (рис. 29).

Размеры вирусов определяют различными способами: по размеру пор фильтров, пропускающих вирусы, по скорости осаждения вирусов при центрифугировании и при помощи фотографий, полученных в электронном микроскопе. Размеры вирионов вирусов колеблются в довольно широких пределах — от 15 до 400 нм. В обычный световой микроскоп отдельные вирусные частицы не видны, но в пораженных вирусом клетках часто можно различить тельца-включения, представляющие собой, как считают, гигантские колонии вирусов.

Вирусы специфичны, они паразитируют только на определенных хозяевах — растениях, животных или микроорганизмах. Это обусловливает распределение вирусов на группы на основе типа хозяев. В последнее время при классификации вирусов принимают во внимание их строение, чувствительность к внешним факторам и т. д. Выделяют группы вирусов, патогенных для растений, животных и, наконец, для микроорганизмов. Вирусы бактерий и актиномицетов называют соответственно *бактериофагами* и *актинофагами.* Известны субмикроскопические агенты — *микофаги,* поражающие грибы, и *цианофаги,* паразитирующие на цианобактериях.

Вирусы не размножаются в почве, но могут долго сохраняться в ней, если условия исключают их инактивацию. Так сохраняются вирусы мозаичной болезни пшеницы, овса и табака, кольцевой пятнистости картофеля и др. Некоторые вирусы человека и животных, попадая в почву, остаются инфекционными в течение нескольких месяцев.

Фаги — облигатные паразиты микроорганизмов — открыли независимо друг от друга в 1915 г. Ф. *Туорт* и в 1917 г. *Ф. Д. Эррель.* Длина головки фага достигает 60—100 нм, отростка — 100—200 нм. Призматическая головка фага покрыта оболочкой из упорядоченно расположенных капсомеров. Внутри головки находится одна или две нити ДНК.

Отросток представляет собой белковый стержень, покрытый сверху чехлом из спирально расположенных капсомеров, способных к сокращению. Обычно отросток оканчивается базальной пластинкой с пятью-шестью выростами. От пластинки отходят тонкие нити — органы адсорбции. Через отросток из головки фага ДНК переходит в клетку микроорганизма.

Механизм проникновения бактериофага в бактерии подробно изучен. Обычно фаг адсорбируется чувствительной к нему клеткой бактерии. Затем содержимое головки (ДНК) переходит в бактерию, а оболочка остается снаружи. После нападения фага бактерия утрачивает способность к делению, перестает двигаться. Метаболизм бактериальной клетки перестраивается под влиянием ДНК фага, и клетка начинает производить продукты не собственного обмена, а бактериофага, и в результате в ней происходит интенсивное образование частиц бактериофага. Затем клеточная стенка бактерии растворяется, и из нее выходят зрелые бактериофаги. Одна клетка бактерии становится источником нескольких сотен и даже тысяч бактериофагов.

При наблюдении колоний бактерий на агаре лизирующее действие бактериофага видно по образованию прозрачных зон вокруг колоний, а на жидкой среде — по уменьшению мутности бактериальной суспензии.

Растворять (лизировать) данный вид бактерий способен только вирулентный к нему фаг. Нередко бактериальная клетка инфицируется фагом, который может в ней существовать, не вызывая лизиса. При размножении бактерии инфекционное начало переходит в дочерние клетки. Бактериофаги такого характера называют *умеренными,* а бактерий — передатчиков данных фагов — *лизогенными.* При определенных условиях лизогенные культуры бактерий могут быть лизированы находящимся в них фагом. Каждый фаг способен поражать бактерий одного вида или группы близких видов.

Исследовано большое число фагов, поражающих различных микроорганизмов. Известны фаги, лизирующие бактерии родов *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Streptococcus, Staphylococcus;* актино-

мицеты рода *Streptomyces;* микобактерии рода *Mycobacterium* и др. Фаги встречаются в воде, почве и других природных объектах. Некоторых фагов используют в медицине для профилактики заболеваний.

Контрольные вопросы и задания

1. Назовите основные группы водорослей и их свойства. 2. Какие группы простейших широко представлены в почве? 3. Чем отличаются микромицеты от миксомицетов? 4. Что представляют собой вирусы и какие организмы они способны заражать?

Глава4 Генетика микроорганизмов

Сохранение специфических структурных и функциональных свойств организмов, т. е. постоянство признаков на протяжении многих поколений, называют *наследственностью.* Впервые материалы для познания механизма наследственности были получены в XVII в. в связи с открытием спермы и яйца. Роль гамет в жизненном цикле высших организмов была постепенно изучена, и стало ясно, что свойства родителей передаются потомству посредством физического «вещества», переносимого в спермиях и яйцах. Дальнейшие наблюдения выявили, что данные генетические факторы содержатся в ядрах гамет как у растений, так и у животных.

4 . 1 . Наследственные факторы микроорганизмов

Установлено, что в эукариотных клетках — ядра, а в прокариотных — нуклеоиды служат местом нахождения генетического материала, который представлен ДНК с молекулярной массой $2{,}9 \cdot 10^9$ а.е.м.[1] и длиной молекулы 1100—1600 мкм. Молекулы ДНК бактерий имеют вид длинных двойных цепей полимеров — *полинуклеотидов,* состоящих из мономеров — *нуклеотидов.*

Каждый мононуклеотид включает одно из четырех азотистых оснований — аденин, гуанин, цитозин или тимин, одну молекулу пентозы и одну молекулу фосфорной кислоты. Обычно молекула ДНК состоит из двух комплементарных нитей, которые образуют двойную спираль. При этом аденин одной нити находится в паре с тимином другой, а гуанин аналогично связан с цитозином. Последовательность азотистых оснований в молекуле ДНК несет информацию, необходимую для синтеза белков. В бактериальной клетке ДНК имеет форму нити, замкнутой в виде кольца. Эта нить называется *бактериальной хромосомой.* Данная хромосома, как и хромосомы всех живых организмов, имеет отдельные участки — *гены* (фрагменты молекулы ДНК), дискретно расположенные и несущие генетическую информацию относительно всех признаков, присущих клетке. Ген — главный фактор, отвечающий за наследственные свойства микроорганизмов. Каждый наследственный признак контролируется соответствующими генами.

[1] А.е.м. — атомная единица массы, равная $1{,}66057 \cdot 10^{-27}$ кг.

Генетические исследования показали также, что конкретные признаки микроорганизмов обусловливают ферменты. Это послужило в свое время основанием для теории «один ген — один фермент», которая утверждает, что каждый ген определяет образование специфичного фермента. В дальнейшем оказалось, что гены кодируют не только ферменты, но и многие другие белки. Например, гены, которые несут информацию о синтезируемых микроорганизмами структурных белках, называют *структурными генами.* Транскрипция генов регулируется определенными *регуляторньши генами.*

Генетический материал микроорганизмов может содержаться не только в хромосоме, но и во внехромосомных структурах — *плазмидах,* расположенных автономно в цитоплазме или в интегрированном с хромосомой состоянии.

Информация, заключенная в гене, считывается и используется при синтезе специфичного ферментного белка. Наличие этого белка создает химическую основу для проявления определенного признака у микроорганизма. В итоге все наследственные признаки микроорганизмов представляют собой конечные продукты биохимических процессов, что в равной мере применимо и к физиологическим особенностям, и к морфологическим признакам.

Один ген может контролировать наследование одного признака или определять несколько или многие признаки, затрагивающие различные части клетки микроорганизма. Несколько генов могут также совместно контролировать проявление какого-либо одного признака.

В бактериальной хромосоме все гены расположены в линейной последовательности. Гены определенных признаков лежат в соответствующих местах хромосомы, называемых *локусами.* Бактерии обычно *гаплоидны,* т. е. имеют только один набор генов.

Полный набор генов, которым обладает клетка микроорганизма, составляет *генотип* данного микроорганизма. Проявление наследуемых морфологических признаков и физиологических процессов у индивидуумов называется *фенотипом* (от греч. *phaino* — являю). Сходные по генотипу микроорганизмы могут существенно различаться по фенотипу, т. е. способу проявления наследственных признаков. Фенотипические различия между микроорганизмами, одинаковыми по генотипу, называют *модификациями* (фенотипическими адаптациями). Таким образом, взаимодействие генетических

задатков с внешней средой может быть причиной возникновения различных фенотипов, даже если генотипы идентичны. Однако потенциальный размах таких фенотипических различий контролируется генотипом.

Модификации, как правило, существуют до тех пор, пока действует вызвавший их специфический фактор внешней среды, они не передаются потомкам и не наследуются ими. Так, обработка фенолом бактерий со жгутиками препятствует развитию жгутиков у этих организмов. Однако у потомства обработанных фенолом безжгутиковых бактерий, выращенного на среде без фенола, образуются нормальные жгутики.

Установлено, что практически все морфологические и физиологические признаки микроорганизмов прямо или косвенно контролируются генетической информацией, заключенной в ДНК.

Информация, которую несет **ДНК,** не представляет собой что-то абсолютно стабильное и неизменное. Если бы информация, передаваемая от одного поколения к другому, никогда не менялась, то диапазон реакций близкородственных организмов на факторы внешней среды был бы также постоянным и любое внезапное их изменение, оказавшееся вредным для микроорганизмов с застывшим генотипом, могло бы привести к исчезновению вида. Информация, передающаяся от поколения к поколению, нестабильна, что оказывается полезным для выживания вида.

Как уже отмечалось, *плазмиды* — это внехромосомные кольцевидные молекулы **ДНК** различной молекулярной массы, обладающие свойствами *репликона* — способностью к независимой репликации. Плазмиды — не обязательный генетический материал бактерий, необходимый для проявления ее жизнедеятельности. Они выявлены у 50% бактерий родов *Enterobacter* и *Pseudomonas,* у 10% бактерий рода *Bacillus.* В то же время плазмиды могут определять весьма сложные свойства бактерий, например способность к передаче генетического материала от донорских F^+-клеток к реципиентным F^--клеткам при конъюгации (F-плазмида); устойчивость к антибиотикам, сульфаниламидным препаратам (Л-плазмиды); способность к синтезу токсинов *(Ent-плазмида);* способность использовать нафталин, камфору, октан и другие сложные соединения; образование фимбрий, которыми энтеробактерии прикрепляются к кишечному эпителию, и др.

Все известные плазмиды подразделяют на конъюгативные и неконъюгативные. Конъюгативные плазмиды переносят собственную ДНК от клетки-донора в клетку-реципиент при конъюгации. Неконъюгативные плазмиды такой способностью не обладают. Молекулярная масса конъюгативных плазмид составляет от 26 до 75 . 10^6 и неконъюгативных — не более 10.10^6а.е.м. Некоторые плазмиды, например F-плазмида, обладают способностью существовать в клетках бактерий в двух состояниях: в физически независимом от хромосомы и в интегрированном с последней. Другие плазмиды также могут интегрировать в хромосому бактерий, но, как правило, только в определенных условиях.

При делении бактериальной клетки плазмиды, как правило, равномерно распределяются между дочерними клетками. Наследование плазмид в процессе жизненного цикла популяции бактерий обусловливается полуконсервативной репликацией плазмидной ДНК. Репликация плазмидной ДНК тесно связана с системами репликации и деления клеток бактерий, поэтому плазмиду рассматривают как автономный репликон в структурном, но не в функциональном отношении.

Обычно родственные плазмиды не могут сосуществовать в одной бактериальной клетке. Это явление, получившее название несовместимости, стало одним из главных признаков при классификации плазмид. Как правило, в бактериальной клетке остается только одна плазмида из группы несовместимости. Неродственные плазмиды совместимы в клетке, так как системы, которые регулируют процесс их репликации, не зависят друг от друга. Например, в клетках ряда видов из родов *Pseudomonas* и *Staphylococcus* выявлены плазмиды, относящиеся к десяти группам, а в клетках представителей семейств *Enterobacteriaceae* — к 40 группам.

Каждая группа несовместимости имеет несколько десятков плазмид, каждая из которых несет один или несколько генов. Следовательно, чем больше плазмид разных групп несовместимости будет находиться в клетке, тем больше дополнительной генетической информации будет иметь микроорганизм. Имеющаяся в плазмидах генетическая информация, не являясь в обычных условиях существования жизненно важной, может оказаться весьма необходимой в экстремальных условиях. Поэтому плазмиды считают факторами, увеличивающими жизнеспособность бактерий в организме хозяина и в окружающей среде.

В изменчивости микроорганизмов важную роль играют *транспозоны* — подвижные генетические элементы, представляющие собой сегменты ДНК, способные к внутри- и межхромосомным перемещениям (транспозициям), а также к перемещениям от плазмиды к плазмиде и от плазмиды к хромосоме. Транспозоны обладают рядом особых свойств. Они могут переносить фрагменты ДНК, заключенные между двумя транспозонами, и генерировать в ДНК полярные мутации, делеции и инверсии. Транспозоны способны также «включать» и «выключать» соседние с ними гены, поскольку в транспозонах есть промоторы и терминаторы транскрипции. Благодаря перечисленным свойствам транспозоны осуществляют регуляцию активности генов и дифференцировки клеток.

По степени сложности строения выделяют три типа бактериальных транспозонов: IS-элементы (insertion sequences), Tn-элементы (собственно транспозоны), мю-подобные фаги. IS-элементы содержат только гены, способствующие их транспозиции, поэтому не придают клеткам бактерий какой-либо легко распознаваемый фенотип. Однако, как и другие транспозоны, IS-элементы могут интегрировать внутри генов, выполняющих определенные функции.

Tn-элементы придают бактериям устойчивость к различным антибиотикам и солям тяжелых металлов, содержат информацию о синтезе энтеротоксина, гемолизина, о сбраживании лактозы и в принципе могут нести любые другие гены. Мю-подобные фаги — наиболее сложный транспозон — имеют внеклеточную форму существования. Известны и другие типы подвижных генетических элементов.

Биологическая роль транспозонов определяется прежде всего их способностью индуцировать мутации и геномные перестройки. Однако наиболее ярким показателем значения в клетке собственно транспозонов служит их способность переносить гены, определяющие устойчивость клеток к различного рода токсичным веществам. Правда, такой перенос осуществляется только внутри клетки, но именно благодаря ему данные гены включаются в плазмиды и вместе с ними распространяются в популяциях клеток разных видов, изменяя способность последних к выживанию в неблагоприятных условиях.

4.2. Механизмы, вызывающие изменение генетической информации

Мутации. Изменения генотипа, называемые *мутациями* (от лат. *mutare* — изменять), происходят спонтанно, т. е. случайно. Такие мутации вызывают резкие изменения единичных генов. Как правило, редкие ошибки репликации ДНК не сопровождаются массированными изменениями информации, вовлекающими большое число разнообразных признаков.

Мутация происходит, если в ДНК химически изменяется или выпадает нуклеотид, а также если в нее включается лишний нуклеотид в гене, что обусловливает проявление измененной информации, а следовательно, измененного белка и соответственно измененного признака организма. Выделяют генные и хромосомные мутации, различающиеся по числу мутировавших генов и характеру изменений в первичной структуре ДНК. Генные мутации обычно затрагивают только один ген, хромосомные распространяются на несколько генов.

Генные мутации, при которых происходит химическое изменение лишь одного нуклеотида, называют точковыми. Точковые мутации разбивают на несколько классов, различающихся по характеру изменений в ДНК, обусловленных мутагенным фактором. При мутациях, называемых *транзициями,* пурин в одной из цепей ДНК замещается другим пурином, а пиримидин в комплементарной цепи — другим пиримидином. Изменения, при которых происходит замена пурина пиримидином, именуют *трансверсиями.* К точковым мутациям относится также вставка лишнего нуклеотида. Последние составляют группу так называемых *мутаций со сдвигом рамки,* при которых происходит нарушение нормальной последовательности нуклеотидов в ДНК.

Возникшие в результате точковой мутации мутанты в ряде случаев по признакам «возвращаются» к исходной дикой форме благодаря обратной мутации — *реверсии.* Поэтому штамм бактерий с восстановленным фенотипом дикого типа называют *ревертантом.*

Хромосомные мутации связаны с крупными перестройками в отдельных фрагментах ДНК. Они проявляются в результате выпадения меньшего или большего числа нуклеотидов *(делеция),* или поворота участка ДНК на 180° *(инверсия),* или повторения какого-либо фрагмента ДНК *(дупликация).*

Особой формой изменчивости, в основе которой лежат мутации, представляется диссоциация (расщепление признаков) бактерий. Примером диссоциации может служить образование двух типов колоний при рассеве чистой культуры бактерий на твердой питательной среде. Первый тип — R-колонии (от англ. *rough* — неровный), имеющие неровные края и шероховатую поверхность, и второй тип — S-колонии (от англ. *smooth* — гладкий) круглой формы с гладкой поверхностью. В процессе диссоциации изменяется не только морфология колоний, но и физиолого-биохимические и другие свойства бактерий.

Мутации, вызываемые искусственно при помощи химических или физических агентов, которые поддаются контролю, называются индуцированными мутациями. Впервые индуцированные мутации дрожжей были получены при помощи рентгеновских лучей в 1925 г. *Г. А. Надсоном* и *Г. С. Филипповым.*

В тех случаях, когда фактор, вызвавший мутацию, неизвестен, ее считают спонтанной. Вызывать мутации могут различные химические вещества: алкилирующие соединения (этил- и метилметансульфонат, диметил- и диэтилсульфат), этиленимин, азотные и серные аналоги иприта, аналоги оснований, соединения мышьяка и хрома, уретан, креозот, деготь, органические перекиси, минеральные масла, половые гормоны, растительные ауксины, ростовые вещества бактерий и растений и другие, а также физические факторы: рентгеновское и ультрафиолетовое излучение, у-лучи и т. д. Механизм действия мутагенов различен.

До последнего времени геном бактерий рассматривали в определенной степени как пассивную мишень, подвергаемую повреждающему действию мутагенных факторов. При исследованиях бактерий выявлено, что их клетки обладают специальными системами, восстанавливающими повреждения ДНК. Восстановление, или *репарацию,* поврежденной ДНК осуществляют ферменты, которые находятся под контролем специальных генов. Клетки бактерий могут репарировать повреждения ДНК, вызванные как излучениями, так и химическими мутагенными веществами.

Единичный мутант у бактерий выявляют культивированием популяций в обстановке, благоприятной его росту. В практических условиях отбор форм измененного типа выполняют пересевом культуры на агаровую среду, где возможен рост только мутантов. Можно подобрать и жидкую избирательную среду, на которой мутант становится преобладающей частью популяции. В некоторых случаях мутации встречаются в достаточно большом количестве и их можно обнаружить без отбора.

Рекомбинации. У организмов развились и другие Механизмы, способствующие возникновению в потомстве резко измененной наследственности. Эти механизмы заключаются в следующей за этим немедленной перетасовке — рекомбинации генов, принадлежащих близкородственным, но генотипически различным организмам. При генетической рекомбинации в хромосому одной микробной клетки, служащей *реципиентом* (от лат. *recipientis* — получающий), встраиваются фрагменты хромосомы микроорганизма, служащего *донором* (от лат. *dono* — дарю).

Генетические рекомбинации у эукариот — это образование индивидуумов с новым сочетанием признаков в результате полового процесса. Новая особь получает несколько генов от одного родителя и несколько — от другого, генетически отличающегося родителя. Благодаря процессу рекомбинации увеличивается число наследственных изменений, на которые может воздействовать отбор.

У прокариот генетическая рекомбинация относится к так называемым *парасексуальным* процессам. Способность к рекомбинации генов может быть представлена в виде следующей примерной схемы:

Донор а б в г д е ж з
Реципиент А Б В Г Д Е Ж З → *Рекомбинант* АБвгдЕЖЗ

У микроорганизмов известны три процесса, посредством которых генетический материал от двух различных родителей может рекомбинировать. Это трансформация, конъюгация и трансдукция. Однако ни при одном из этих процессов не происходит истинного слияния клеток или полного слияния нуклеоидов. Лишь часть генетического материала клетки-донора передается клетке-реципиенту.

В такой неполной зиготе, называемой *мерозиготой,* сформированной в результате переноса генов, генетический материал реципиентной клетки называется эндогенным, а генетический фрагмент, переданный от донора, — экзогенным. Обычно экзогенная и эндогенная части соединяются и обмениваются сегментами немедленно после переноса.

Трансформация. Это процесс переноса генов, при котором часть ДНК клетки-донора, полученная либо экстрагированием, либо при естественном лизисе клеток, может проникать в родственную (одного и того же вида или близкородственных видов) бактериальную клетку-реципиент. В результате в ДНК реципиента включаются фрагменты хромосомы ДНК донора, что обусловливает изменение признаков бактерии-реципиента.

Процесс трансформации можно подразделить на несколько стадий:

- первая — контакт ДНК с поверхностью клетки;
- вторая — проникновение ДНК в клетку;
- третья — соединение трансформирующей ДНК с соответствующим фрагментом хромосомы реципиента.

Дальнейший процесс связан с рекомбинацией части экзогенной молекулы трансформирующей ДНК с реципиентной эндогенной хромосомной ДНК. Последняя стадия — репликация включенной в хромосому новой информации.

В лабораторных условиях искусственную трансформацию выполняют следующим образом. Извлекают ДНК определенного штамма бактерий, очищают и смешивают с клетками бактерий другого штамма, отличающегося от первого одним или несколькими наследственными свойствами. Культуру подопытного микроорганизма оставляют расти. Среди потомства можно обнаружить небольшое количество клеток с некоторыми свойствами штамма, из которого была извлечена ДНК.

Очень редко встречаются случаи, когда единичная бактериальная клетка приобретает в результате трансформации более чем одно новое свойство. Передача через ДНК большего числа признаков наблюдается лишь в том случае, если культура микроба-донора генетически близка к клеткам микроба-реципиента. При помощи трансформирующейся ДНК могут передаваться такие признаки, как капсулообразование, синтез необходимых клетке веществ, ферментативная активность, устойчивость к ядам, антибиотикам и другим лекарственным веществам.

Трансформация отмечена у многих видов бактерий, в частности у представителей родов *Bacillus, Rhizobium, Streptococcus* и др. С использованием трансформации получено много штаммов микроорганизмов, представляющих большое практическое значение.

Конъюгация — процесс, при котором сблизившиеся родительские клетки соединяются при помощи конъюгационных мостиков, через последние происходит обмен генетическим материалом. Конъюгацию исследовали у различных видов бактерий *(Escherichia, Shigella, Salmonella, Pseudomonas),* она хорошо изучена у *Escherichia coli.*

Возможность клетки стать донором определяется специфическим половым фактором F(от англ. *fertility* — плодовитость), который при конъюгации переносится из одной бактериальной клетки в другую. Клетки, связанные конъюгацией, называют F^+-клетками. Клетки бактерий, не имеющие F-фактора, служат реципиентами генетического материала и обозначаются *F*. Половой фактор *F* относится к числу конъюгативных плазмид и представляет собой кольцевую молекулу ДНК молекулярной массой $64 \cdot 10^6$ а.е.м.

F-плазмида обусловливает образование на поверхности клетки одной или двух так называемых половых фимбрий, получивших название *F-пили,* способствующих соединению клеток-доноров с клетками-реципиентами, а также обеспечивает независимую от хромосомы репликацию собственной ДНК и образование продуктов, которые управляют переносом генетического материала как самой F-плазмиды, так и хромосомы клетки. F-плазмида располагается в цитоплазме автономно, вне бактериальной хромосомы. Бактерию с F-плазмидой называют плазмидосодержащим трансконъюгантом. F-плазмида обладает способностью включаться (интегрировать) в определенные места бактериальной хромосомы и становиться ее частью. В таком случае бактерия получает название хромосомального трансконъюганта. F-плазмида может быть утрачена вследствие ее распада под действием дезоксирибонуклеазы. В последнем случае бактерия обозначается как абортивный транс-конъюгант.

В результате интеграции F-плазмиды в состав бактериальной хромосомы образуется так называемый *Hfr-штамм* (от: High frequency of recombination — высокая частота рекомбинации). Когда происходит скрещивание *Hfr-штамма* с F^--бактериями, то, как правило, F-фактор не передается, а гены хромосомы бактерии передаются с довольно высокой частотой. В начале процесса конъюгации клетки-доноры F^+ или *Hfr* соединяются с клетками-реципиентами (благодаря наличию у доноров *F-пилей).* Впоследствии между клетками образуется конъюгационный мостик, и через него из клетки-донора в клетку-реципиент передается генетический материал — F-плазмиды или хромосомы. Обычно при конъюгации передается только одна цепь ДНК-донора, а вторая цепь (комплементарная) достраивается в клетке реципиента. Перенос, как правило, начинается с одного конца хромосомы и продолжается с последующим переносом других участков ее (рис. 30).

Рис. 30. Конъюгация клеток *Escherichia coli:* продолговатая клетка — F^+; круглая — F^-. Электронная микрофотография

Переносу генетического материала можно препятствовать в любое время, разделяя конъюгирующие пары при помощи сильного встряхивания суспензии микроорганизмов, находящихся в жидкой среде. В этом случае только некоторые свойства мужских клеток переносятся в женскую клетку и проявляются в потомстве. Рано или поздно перенос прекращается в большинстве конъюгирующих пар и тогда, когда их искусственно не разделяют. Это происходит потому, что конъюгационный мостик непрочен и легко разрушается, не влияя на жизнеспособность клеток.

Таким образом, в результате конъюгации реципиентная F-клетка превращается в мерозиготу, содержащую вследствие самопроизвольного прерывания переноса генетического материала только часть хромосомы F^+-донора в дополнение к собственной хромосоме. В результате *кроссинговера* (перекрест хромосом, при котором гены меняются местами) образуется новая комбинация генетического материала. В зависимости от места расположения подвергающегося обмену генетического материала в потомстве могут возникнуть рекомбинанты неодинакового типа.

Трансдукция у бактерий. Это перенос генетического материала от одной бактериальной клетки к другой посредством бактериофага. Другими словами, фаг при этом играет как бы роль гаметы, перенося в клетку-реципиент фрагмент ДНК клетки-донора. Трансдукция происходит при участии умеренных фагов.

Известны три главных типа трансдукции: общая (неспецифическая), локализованная (специфическая) и абортивная. При неспецифической трансдукции различные фрагменты ДНК передаются от бактерий-доноров к бактериям-реципиентам с помощью умеренных трансдуцирующих фагов. При этом принесенный фагом фрагмент ДНК донора способен включаться в гомологическую область ДНК клетки-реципиента при рекомбинации.

Специфическая трансдукция характеризует способность фага переносить от бактерий-доноров к бактерии-реципиенту только определенные гены. Это обусловлено тем, что образование трансдуцирующего фага происходит в результате соединения его ДНК строго определенными бактериальными генами, расположенными на хромосоме клетки-донора. Считают, что каждая частица фага переносит или только один бактериальный ген, или несколько близко расположенных генов.

При абортивной трансдукции принесенный фагом фрагмент хромосомы клетки-донора не включается в хромосому клетки-реципиента, а располагается в ее цитоплазме автономно и в таком виде функционирует. При делении клетки-реципиента трансдуцированный фрагмент ДНК-донора может передаваться только одной из двух дочерних клеток, т. е. наследуется однолинейно, в связи с чем утрачивается в потомстве.

При трансдукции возможен перенос генов, контролирующих питательные особенности бактерий, их устойчивость к лекарственным веществам, ферментативную активность, наличие двигательного аппарата (жгутики) и другие свойства. Перенос признаков в процессе трансдукции обнаружен у представителей родов *Bacillus, Pseudomonas, Salmonella, Escherichia* и др.

4.3. Практическое использование достижений генетики микроорганизмов и генной инженерии в микробиологии

Получение наследственно измененных форм микроорганизмов расширило возможности их использования в сельскохозяйственном и промышленном производстве, а также в медицине. Основной метод получения новых форм микроорганизмов — индуцирование мутаций воздействием различными мутагенами на дикие, существующие в природе культуры. Таким методом удается создавать мутантов, которые выделяют в десятки и сотни раз большее количество ценных продуктов (антибиотиков, ферментов, витаминов, аминокислот и т. д.) по сравнению с дикими формами микроорганизмов.

Процесс получения высокопродуктивных штаммов микроорганизмов состоит из многих этапов. Сначала на культуру микроорганизма воздействуют различными мутагенными факторами с последующим отбором наиболее продуктивного штамма. Мутантный штамм могут подвергнуть дальнейшему воздействию мутагенов и последующему отбору еще более продуктивных форм. Часто из тысяч бесполезных мутантов отбирают только один высокопродуктивный штамм. В последние годы методом радиационного и химического мутагенеза микроорганизмов получено большое число промышленных штаммов микроорганизмов — продуцентов нужных человеку веществ.

Особенно широкие перспективы переделки наследственной природы организмов сулит развитие *генной,* или *генетической, инженерии* — раздела молекулярной генетики, разрабатывающего методы создания новых генетических структур с заданной информацией и способы их переноса в клетки прокариот и эукариот.

Полученные методом генной инженерии новые генетические молекулы представляют собой рекомбинантные ДНК, включающие два компонента — вектор (переносчик) и клонируемую «чужеродную» ДНК. Поскольку переносчик должен обладать свойствами репликона и обусловливать репликацию вновь созданной рекомбинантной ДНК, то вектором обычно служат такие репликоны, как плазмиды, умеренные фаги и вирусы животных. Все упомянутые переносчики имеют циркулярно замкнутую структуру ДНК. Клонируемая ДНК — это фрагмент ДНК, несущий необходимый ген (или гены), контролирующий образование нужного вещества.

Существуют различные приемы получения рекомбинантных молекул ДНК. Наиболее простой из них начинается с обработки изолированных молекул ДНК-вектора и ДНК, несущей необходимый ген, ферментами-рестриктазами (эндонуклеазы рестрикции), расщепляющими взятые молекулы ДНК в строго определенном месте с образованием однонитчатых, комплементарных друг другу концов, так называемых «липких концов». Таков первый этап получения рекомбинантных ДНК, его иначе называют «разрезание» молекул ДНК при помощи эндонуклеаз рестрикции. Второй этап заключается в обработке полученных линейных молекул ДНК ферментом полинуклеотидлигазой, которая «сшивает» две разные молекулы в одну рекомбинантную ДНК. На третьем этапе рекомбинантные молекулы вводят в клетки тех или иных бактерий методом трансформации. На завершающем, четвертом, этапе выполняют клонирование трансформированных клеток.

Методом генной инженерии уже получены рекомбинантные молекулы ДНК, несущие информацию для образования таких важных веществ, как интерферон, инсулин, гормон роста человека и другие, в клетках кишечной палочки. По-видимому, тем же методом можно будет создать и такие бактерии, которые, потеряв свою болезнетворность, помогут выработать иммунитет против многих инфекционных болезней животных и человека. В промышленности

благодаря использованию генной инженерии появятся высокопродуктивные микроорганизмы, создающие белки, ферменты, витамины, антибиотики, ростовые вещества и другие нужные продукты.

Возможно, будут получены новые сорта растений и породы животных, устойчивые к заболеваниям и в полной мере наделенные хозяйственно ценными свойствами. Метод генной инженерии поможет вывести формы растений, обладающие способностью к связыванию молекулярного азота атмосферы. Такие растения, вероятно, можно будет получить после введения в их геном генов от микроорганизмов, фиксирующих азот из воздуха.

В связи с разработкой и совершенствованием методов генной инженерии, показавших возможность передачи не только естественных генов живых организмов, но и искусственно синтезированных, открываются блестящие перспективы для научно-технического прогресса не только в медицине и промышленности, но и в сельскохозяйственном производстве.

Контрольные вопросы и задания

1. Что представляет собой функциональная единица наследственности? 2. Какова роль генов-регуляторов? 3. Что такое плазмиды? 4. Каковы свойства транспозонов и их роль в изменчивости микроорганизмов? 5. В каких формах может выражаться генотипическая изменчивость? 6. Покажите на примерах значение генных и хромосомных мутаций в изменении генетической информации. 7. Какие существуют формы диссоциации? 8. Перечислите типы генетической рекомбинации у прокариот. 9. Каково практическое значение генной инженерии в микробиологии?

Микроорганизмы и окружающая среда

Условия внешней среды имеют в жизни микроорганизмов такое же большое значение, как и в жизни любого живого существа. Влажность, температура, кислотность среды, наличие кислорода и другие факторы влияют на рост микроорганизмов и распространение их в природе.

5.1. Влажность среды

Микроорганизмы способны жить и размножаться только в присутствии свободной воды, находящейся в среде главным образом в капельно-жидком виде. Растворенные в такой воде питательные вещества могут поступать в микробную клетку.

Большое влияние на рост микроорганизмов оказывает концентрация растворенных в воде соединений. Если их мало, раствор называется *гипотоническим.* При оптимальной концентрации этих веществ создаются условия для лучшего роста микроорганизма. Увеличение концентрации вещества приводит к задержке роста организма в связи с повышением осмотического давления в окружающей среде. Раствор с высоким осмотическим давлением называется *гипертоническим.*

В растворах, имеющих более высокое осмотическое давление, чем внутри микробной клетки, последние жить не могут. Это объясняется тем, что вода выходит из клетки наружу, клетка обезвоживается и протопласт сжимается. Данное явление носит название *плазмолиза.* В среде с очень низким осмотическим давлением вода будет поступать внутрь клетки, оболочка которой может лопнуть, такое явление называют *плазмоптизом.*

Осмотическое давление раствора выражают в единицах осмолярности. Осмолярным называют раствор, содержащий один осмоль вещества в 1 л растворителя. Способность микроорганизмов развиваться в средах с достаточно широко варьирующей осмолярностью называют осмотолерантностью. Осмотолерантность организмов обусловлена тем, что внутриклеточная осмолярность их всегда выше, чем осмолярность внешней среды. Микроорганизмы, способные переносить достаточно высокие концентрации растворенных веществ, но лучше растущие при более низком осмотическом давлении раствора, носят название *осмотолерантных.*

Осмотическое давление клетки у грамположительных бактерий достигает $3 \cdot 10^6$ Па, у грамотрицательных — $4 \cdot 10^5$ — $8 \cdot 10^5$ Па. Следовательно, в растворах с высоким осмотическим давлением — около $9 \cdot 10^6$ — $9 \cdot 10^7$ Па (15—20%-ный NaCl) — создаются условия, в которых невозможен рост бактерий и ряда других организмов.

Высокое осмотическое давление среды не препятствует росту лишь некоторых микроорганизмов, называемых *осмофильными,* т. е. «любящими» высокое осмотическое давление. Так, многие плесени из родов *Aspergillus* и *Penicillium* растут на едва увлажненных субстратах. Осмотическое давление в их клетках достигает $2 \cdot 10^5$ — $2{,}5 \cdot 10^5$ Па. Даже мед иногда разлагают дрожжи, которые растут при содержании сахара 70—80%. Подобные осмофильные дрожжи развиваются только при высокой концентрации сахара, но не выносят высокой концентрации солей.

Существуют организмы, способные жить лишь при очень высоких концентрациях солей (NaCl). Это *галофильные,* т. е. «любящие» высокую концентрацию солей, организмы (от лат. *halo* — соль). Они представлены двумя основными типами: умеренными галофилами, которые развиваются при содержании соли 1—2%, хорошо растут в среде с 10% соли, но выносят даже 20%-ную ее

концентрацию (большинство бактерий не переносят концентрации NaCl выше 5%), и экстремально галофильными архебактериями родов *Halobacterium* и *Halococcus,* которые требуют содержания 12—15% солей и способны хорошо расти в насыщенном 32%-ном растворе NaCl. Галофилы обнаружены среди различных групп микроорганизмов (прокариот и эукариот).

Действие высоких концентраций солей на микроорганизмы может быть обусловлено как самим растворенным веществом, так и его влиянием на активность воды (a_w). Любое вещество, которое содержится в растворителе, притягивает молекулы растворителя и, следовательно, снижает их подвижность. Активность воды определяют по уравнению

$$a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{OB}{100} = \frac{n_2}{n_1 - n_2},$$

где P и P_o — соответственно давление пара раствора и растворителя (чистой воды); OB — относительная влажность воздуха в системе; n_1 и n_2 — соответственно число молей растворителя и растворенного вещества.

Величины a_w, лимитирующие рост различных бактерий, колеблются в пределах 0,99—0,60. Большая часть микроорганизмов не растут при активности воды ниже 0,95, а микроорганизмы, растущие при активности воды ниже 0,60, до настоящего времени не известны. При низкой водной активности лучше всего развиваются мицелиальные грибы и дрожжи. Большинство бактерий требуют достаточно высоких значений a_w (0,99—0,90).

Считают, что не всегда можно заранее сказать, будет ли растворенное вещество оказывать на бактерии специфическое воздействие или влиять на доступность воды. Например, ряд бактерий и дрожжей на средах с сахарами растут при значительно более низких значениях a_w, чем на средах с солями. В то же время минимальное значение a_w, при котором могут развиваться некоторые штаммы болезнетворных бактерий (стафилококк, сальмонеллы и др.), в растворах Сахаров и солей одинаково и равно 0,85. Для роста каждого микроорганизма имеется свое оптимальное значение a_w.

Если водная активность станет ниже оптимума a_w в присутствии того или иного растворенного вещества, то микроорганизм вынужден будет тратить часть доступной энергии на осморегуляцию, обеспечение энергией транспортных систем и синтез низкомолекулярных осмопротекторов (пролина, бетаина, глутаминовой кислоты и др.). При пониженной водной активности организм находится в условиях осмотического стресса, что приводит к уменьшению скорости роста и снижению общего количества образуемой биомассы. Неспособность микроорганизмов расти на средах с высокими концентрациями солей (NaCl) или Сахаров успешно используют в

пищевой промышленности для консервирования различных продуктов.

Водная активность раствора меняется двумя путями — матричным и осмотическим. *Осмотическое* изменение водной активности происходит в результате взаимодействия молекул воды с растворенными веществами, *матричное* определяется адсорбцией молекул воды на поверхностях твердых субстратов.

Установлено, что микроорганизмы проявляют более высокую чувствительность к матричному водному стрессу, чем к осмотическому. В том случае, если бактериальная клетка подвергается осмотическому стрессу, она может использовать какое-то количество растворенных веществ из среды и повысить концентрацию внутри клетки. При матричном стрессе, который наблюдается в среде с низкой концентрацией растворенных веществ, микроорганизмы не способны поглощать осмотически активные вещества. Такие микробы вынуждены либо сами вновь синтезировать растворимые вещества, либо осуществлять деградацию внутриклеточных макромолекул.

Большое внимание уделяют изучению значения воды для микроорганизмов в засушливых условиях и роли воды в жизнедеятельности микроорганизмов в природе.

Обстоятельные исследования влияния недостатка воды (водного стресса) или высушивания на живые организмы выполнены на грибах, бактериях, водорослях и др. Установлено, что большинство микроорганизмов переносят высушивание хорошо. Наиболее устойчивые к обезвоживанию компоненты почвенного микробоценоза — грибы. Способность грибов переносить водный стресс и функционировать при низком водном потенциале[1] важна для поддержания непрерывности круговорота питательных веществ в природе.

Существует предположение о том, что при недостатке воды бактерии используют метаболическую воду, образующуюся в клетке в результате окисления органического вещества кислородом воздуха. Так, из 1 кг глюкозы организм может получить 600 г воды по уравнению

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O$$

Устойчивость к обезвоживанию у разных бактерий неодинакова. Например, численность жизнеспособных клеток *Pseudomonas,* внесенных в воздушно-сухую почву после выдерживания в течение месяца, снижается в 100 раз. В то же время *Azotobacter* остается жизнеспособным в почве даже через десятки лет ее хранения в воздуш-

[1] *Водный потенциал* — количество термодинамической работы, которая должна быть затрачена организмом для извлечения воды. Потенциал воды обычно выражают в барах (1 бар = 10^6 дин • $см^{-2}$). Потенциал чистой воды равен 0. Все растворы по отношению к чистой воде имеют отрицательные потенциалы, выражаемые в отрицательных барах.

мальная — выше которой роста не происходит. Данные три температурные точки называют *кардинальными,* и они весьма характерны для определенных видов и даже штаммов бактерий.

Микроорганизмы становятся недеятельными, если температура окружающей среды опускается несколько ниже О °С, большинство их не может жить при температуре выше 40 °С, в то же время отдельные виды размножаются при 70—75 и даже 105 °С.

По отношению к температуре микроорганизмы можно подразделить на три группы: психрофилы и психротрофы (от греч. *psychria* — холод, *phileo* — люблю, *trophe* — питание), достаточно быстро развивающиеся при 0 °С, мезофилы (от греч. *mesos* — средний, промежуточный), растущие в пределах умеренных температур, и термофилы (от греч. *therme* — тепло), развивающиеся при температуре выше 45—50 °С. Для перечисленных групп характерны разные кардинальные температуры.

К *облигатным,* или *истинным, психрофилам* относят микроорганизмы, оптимальная температура развития которых составляет 15 °С или ниже, а максимальная не превышает 20 °С. Эти микробы распространены только в местах с постоянно низкой температурой. Они формируют естественный микробоценоз регионов вечного холода. В подобных условиях жизнь мезофилов исключена.

Психрофильные бактерии распространены в арктических районах земного шара, где их обнаруживают в пробах из почв, вечных снегов высокогорных районов, горных ледников, морен, наносов холодных пещер, в воде колодцев и родников. В 1 г почвы Антарктиды содержатся сотни и даже тысячи клеток микроорганизмов. Естественной средой обитания психрофильных бактерий служат океаны (средняя температура у поверхности воды 5 °С, около дна 1—2 °С), где микроорганизмы могут обитать независимо друг от друга либо входить в состав микробного ценоза морских животных и растений. Среди психрофилов есть формы, вызывающие заболевания рыб и морских растений.

Психротрофные, или *психроактивные* организмы развиваются при 0 °С, однако их температурный оптимум выше, чем у психрофилов, и составляет 25—30 °С, максимум около 35 °С. Микроорганизмы данной подгруппы иногда называют *факультативными психрофилами;* их довольно часто обнаруживают в почве и воде не только в условиях холодного, но и умеренного климата. Психротрофы могут развиваться в пищевых продуктах, которые хранятся при низких температурах. Например, в молоке обитают психротрофы, относящиеся к родам *Pseudomonas, Alcaligenes, Chromobacterium, Flavobacterium.* В мясе при температуре хранения ниже 0 °С размножаются психроактивные псевдомонады, грамположительные бактерии и даже патогенные или токсигенные виды, в том числе *Clostridium botulinum* типа Е.

Согласно современным представлениям, психрофилы способны развиваться при низкой температуре благодаря следующим особенностям:

- клетки психрофилов содержат ферменты, имеющие низкую температуру активации и в связи с этим способные наиболее эффективно функционировать при низкой температуре; при температуре выше 30 °С данные ферменты прекращают свою деятельность;
- несмотря на низкую температуру, проницаемость мембран психрофилов остается высокой в связи с большим количеством ненасыщенных жирных кислот, содержащихся в липидах, в результате мембраны не замерзают;
- свойство образовывать полисомы психрофилы не утрачивают при низкой температуре.

Температурный оптимум для *мезофилов* составляет 30—45 °С, минимум — 10—15 °С. В указанную группу входит большинство микроорганизмов, в том числе болезнетворные. Для бактерий, патогенных для человека и теплокровных животных, температурный оптимум около 37 °С.

Термофилы — теплолюбивые микроорганизмы, развиваются в зоне высоких температур (выше 45—50 °С). Термофильные микроорганизмы подразделяют на облигатные, факультативные, термотолерантные, а также экстремально термофильные и гипертермофильные. Облигатные термофилы имеют температурный оптимум 65—70 °С, минимальная температура, при которой возможен их рост, — 40—42 °С; факультативные термофилы имеют температурный максимум 50—60 °С, минимум — менее 20 °С; термотолерантные — температурный максимум 45—50 °С, наконец, экстремально термофильные могут существовать при температурах от 60 до 93 °С и выше. Среди гипертермофилов следует отметить ряд архебактерий. Так, архебактерии *Pyrodictium occultum* и *P. brockii* развиваются при температуре 105 °С, но выдерживают и 110°С.

Возможность существования термофилов при высокой температуре обусловлена следующими особенностями:

- составом липидных компонентов клеточных мембран, а именно высоким содержанием длинноцепочечных C_{17}—C_{19} насыщенных жирных кислот с разветвленными цепями;
- высокой термостабильностью белков и ферментов (последние имеют низкую молекулярную массу и содержат значительное количество ионов кальция);
- термостабильностью клеточных ультраструктур.

Термофильные бактерии широко распространены в природе. Постоянное место обитания термофильных бактерий — термальные (горячие) источники. В таких источниках могут развиваться термо-

фильные эубактерии и архебактерии, аэробные и анаэробные, фототрофные, хемолитоавтотрофные и гетеротрофные микроорганизмы. В термальных источниках с температурой 45—50 °С наблюдается развитие разнообразных цианобактерий.

Термофилы принимают непосредственное участие в саморазогревании навоза, компостов, сена, зерна и т. д. В последние годы данную группу организмов широко используют в биотехнологической промышленности для получения витаминов, ферментов, молочной кислоты, кормового белка и других ценных для сельского хозяйства и медицины веществ. Термофильные формы имеются не только среди бактерий, но и среди водорослей, грибов и простейших.

Микроорганизмы по-разному относятся к предельным (низким и высоким) температурам. Если температуру жидкого азота (—190 °С) или жидкого водорода (—252 °С) микробные клетки переносят, сохраняя после размораживания способность к росту, то под влиянием высоких температур они довольно быстро погибают. Высокие температуры (60 °С и выше) вызывают разрушение цитоплазматической и других мембранных структур, повреждение нуклеиновых кислот, коагуляцию белков и инактивацию ферментов у психрофильных и мезофильных микроорганизмов. Обычно при 60— 70 °С погибают вегетативные клетки указанных организмов. Споры бактерий способны выдерживать температуру кипения воды в течение нескольких часов.

Нагревание до температуры выше 100—120 °С используют в микробиологии для полного уничтожения вегетативных форм микроорганизмов и их спор. Это наиболее удобный и надежный метод стерилизации (от лат. *sterilis* — бесплодный). Существует несколько способов стерилизации с использованием высокой температуры. Чаще всего применяют стерилизацию *сухим жаром* (для сухих объектов) при температуре 160 °С в течение 2 ч и стерилизацию *паром в автоклаве* (для влажных объектов) при 120 °С в течение 15—20 мин.

5.3. Кислотность среды

Кислотность среды, в которой обитают микроорганизмы, оказывает на них большое влияние. Это один из наиболее важных факторов, определяющих рост и размножение микроорганизмов, так как он действует на организм непосредственно или косвенно через ионное состояние и доступность многих ионов и метаболитов, стабильность макромолекул. Значения реакции среды определяют состояние веществ в окружающей среде.

Для большинства микроорганизмов оптимальны значения реакции среды около pH 7. Очень кислая или очень щелочная реакции обычно токсичны для бактерий. Предельные ее значения, выше

и ниже которых известные в настоящее время микроорганизмы прекращают рост и размножение, приблизительно равны pH 1 и pH 11. При pH 1 могут существовать лишь немногие бактерии и грибы, при pH 11 — отдельные виды водорослей, грибов и бактерий.

По отношению к кислотности среды микроорганизмы разделяют на ряд групп. Для роста большей части прокариот оптимальна среда, близкая к нейтральной. Данные организмы носят название *нейтрофилов*. Большинство нейтрофилов развиваются в диапазоне значений pH 4—9. К нейтрофилам относят, например, *Bacillus subtilis, Streptococcus faecalis, Escherichia coli* и др. Среди нейтрофилов много представителей, обладающих кислото- и щелочеустойчивостью, т. е. толерантностью. Кислототолерантными являются молочнокислые, уксуснокислые, маслянокислые и другие микроорганизмы, а щелочетолерантными, устойчивыми к pH 9—10, — энтеробактерии и др.

Существуют бактерии, для которых предпочтительна щелочная реакция среды (pH 10 и выше). Такие организмы называют *алкалофильными*. Известны также виды бактерий, способные развиваться в очень кислой среде (pH 3 и менее); это *ацидофильные* микроорганизмы. Среди бактерий данных групп есть облигатные формы, неспособные развиваться в нейтральной среде, и факультативные, проявляющие такую способность.

Известны микроорганизмы, которые растут при экстремальных значениях реакции среды. Например, представитель облигатных экстремальных ацидофилов *Thiobacillus thiooxidans* может развиваться при pH 0,5—6,0 (оптимум 2,0—3,5).

Грибы и дрожжи хорошо размножаются и при низком (pH 2—3) и довольно высоком его значении (pH 8—10). Многие грибы предпочитают кислую среду и лучше растут при pH 5—6.

Значительная часть бактерий, несмотря на то что не растет при кислотности ниже pH 4,5, могут выносить реакцию среды с pH 1 или даже pH 0,1, не подвергаясь заметному угнетению. Это так называемые *ацидотолерантные,* или кислотоустойчивые, микроорганизмы. К ним принадлежат тионовые бактерии, окисляющие сероводород и серу, некоторые другие микроорганизмы.

Среди бактерий обнаружено несколько видов, устойчивых к щелочной среде (pH 8,5 и выше). Сюда следует отнести *Bacillus pasteurii* — бактерию, расщепляющую мочевину и хорошо растущую при реакции среды, близкой к pH 11. B. *alcalophilus,* выделенная из сточной воды, способна расти в диапазоне pH 9—11,5. Выделены и другие бациллы, очень устойчивые к щелочной среде. Цианобактерии могут развиваться в природной среде с pH 7,5—10, некоторые из этих бактерий имеют оптимум pH 10.

В процессе жизнедеятельности некоторые микроорганизмы могут выделять кислые или щелочные продукты. Например, образо-

вание аммиака при разложении мочевины и белков ведет к подщелачиванию среды.

Считают, что способность микроорганизмов к росту при низких или высоких значениях реакции среды обеспечивает им определенные преимущества в конкурентной борьбе с большинством организмов. Несмотря на то что развитие бактерий возможно в целом в диапазоне pH 1 — 11, кислотность среды их цитоплазмы варьирует в ограниченном диапазоне, вблизи pH 7. Нейтральная реакция цитоплазмы оптимальна для большинства микроорганизмов, так как ряд важных компонентов клеток разрушается в кислой (ДНК, АТФ) или щелочной среде (РНК, фосфолипиды).

Отрицательное влияние высокой кислотности среды на большинство микроорганизмов используют при консервировании пищевых продуктов, приготовлении маринадов, квашении капусты, силосовании и т. д.

5.4. Присутствие молекулярного кислорода в среде

Молекулярный кислород — важный экологический фактор. Его содержание в атмосфере составляет 21%. По отношению к молекулярному кислороду все микроорганизмы можно разбить на ряд групп. Микроорганизмы, нуждающиеся в кислороде для жизни, получили название *облигатных* (строгих) *аэробов*. В эту группу входит большая часть бактерий и грибов.

Среди аэробов есть микроорганизмы, которые потребляют кислород, но хорошо растут только при содержании его в значительно меньшей концентрации, чем в воздухе. Подобные организмы называют *микроаэрофилами*.

Чувствительность микроаэрофилов к молекулярному кислороду значительно различается у отдельных видов: представители рода *Campylobacter* хорошо растут при содержании 5—10% O_2; нитчатая серная бактерия рода *Beggiatoa* развивается при 0,6—6%, а некоторые виды бактерий могут расти только при содержании кислорода, составляющем всего несколько сотых процента от атмосферного. Подобная чувствительность микроорганизмов к высоким концентрациям молекулярного кислорода связана с инактивацией в данных, условиях ряда жизненно важных ферментных систем.

Присутствие молекулярного кислорода в среде может негативно сказаться не только на микроаэрофилах, но и на облигатных аэробах при содержании его в атмосфере выше 50%. В таких условиях рост многих бактерий угнетается. Большинство аэробных бактерий имеют достаточно совершенные системы защиты от окислителей и могут расти в атмосфере чистого молекулярного кислорода и даже при повышенном давлении O_2.

Широкое распространение микроаэрофильных бактерий можно объяснить тем, что в почвах, водоемах и других природных средах содержание молекулярного кислорода существенно ниже, чем в атмосфере. К микроаэрофилам относятся молочнокислые бактерии (род *Lactobacillus),* нитчатые скользящие бактерии (род *Beggiatoa),* ряд видов рода *Bacillus* и др.

Некоторые микроорганизмы совсем не используют кислород. Их называют *анаэробами*. Они бывают двух типов: *облигатные анаэробы* — для них кислород токсичен, а *аэротолерантные анаэробы* — не погибающие при контакте с кислородом.

Токсичность кислорода для облигатных анаэробов объясняется тем, что эти организмы не имеют особых ферментов — супероксиддисмутазы и каталазы, обычно содержащихся в клетках аэробов и аэротолерантных анаэробов и защищающих организм от токсичных продуктов кислородного обмена (H_2O_2 и др.).

К облигатным анаэробам относятся представители родов *Methanobacterium, Methanosarcina, Clostridium, Treponema* и др.

Существуют *факультативные анаэробы* — микроорганизмы, способные переключаться с аэробного на анаэробный тип метаболизма, например некоторые кишечные бактерии, представители рода *Serratia* и др. В зависимости от условий среды факультативно анаэробные микроорганизмы могут иметь либо окислительный, либо бродильный тип обмена. Так, многие дрожжи способны при доступе воздуха окислять сахар до CO_2 и H_2O, а в анаэробных условиях они вызывают спиртовое брожение, при котором сахар превращается в этиловый спирт и диоксид углерода.

К факультативно анаэробным бактериям относятся представители родов *Bacillus, Vibrio, Escherichia,* патогенные бактерии родов *Salmonella, Shigella, Staphylococcus* и др.

5.5. Другие факторы среды

Давление. Микроорганизмы относительно слабо чувствительны к вариациям гидростатического давления. Обычное давление не оказывает существенного влияния на микробные клетки. Увеличение давления до определенного предела не сказывается и на росте почвенных микроорганизмов, однако на определенном уровне начинает тормозить их рост и размножение. Умеренное давление ($1 \cdot 10^7$ — 5.10^7 Па) угнетает рост и размножение микроорганизмов. Очень высокое гидростатическое давление может полностью остановить их рост. При давлении выше 5.10^7 Па не растут большинство микроорганизмов. Существуют и виды, обитающие в грунтах и водах океанов, способные размножаться при высоком давлении. Среди выделенных из глубин океанов имеются *баротолеранпные*

микроорганизмы, размножающиеся при нормальном атмосферном давлении, но хорошо переносящие и высокое давление.

Микроорганизмы, называемые *барофильными,* размножаются лучше при гидростатическом давлении, значительно более высоком, чем обычное атмосферное. Снижение давления обусловливает замедленный рост этих организмов и нарушение процессов деления, что приводит к образованию нитевидных клеток. Облигатно барофильные бактерии не способны размножаться при давлении $1{,}01 \cdot 10^5$ Па.

В связи с этим возникло направление в микробиологии — *баробиология микроорганизмов,* которая изучает роль гидростатического давления как экологического фактора, оказывающего влияние на распространение и активность микроорганизмов в глубине морей и океанов или под землей.

Химические вещества. Действие химических веществ на микроорганизмы зависит от природы вещества, его концентрации, особенностей микроорганизма и факторов внешней среды (температуры, состава среды, времени воздействия и т. д.). По характеру действия химические соединения делят на несколько групп: антисептики, ионы тяжелых металлов, антибиотики.

Антисептики (от греч. *anti* — против, *septicos* — гнилостный) — органические и неорганические вещества, обладающие бактерицидным действием. К ним относят спирты, альдегиды, эфиры, фенолы, галогены, перманганат калия, перекись водорода и многие другие.

Действие органических антисептиков значительно усиливается при совместном использовании с поверхностно-активными веществами, увеличивающими смачивающую способность жидкости (жирные кислоты, мыла, детергенты). Механизмы действия бактерицидных веществ разнообразны. Это может быть повреждение клеточной стенки, растворение липидов цитоплазматической мембраны, денатурация белков, нарушение процессов клеточного деления, усиление окислительных процессов, приводящих к гибели клетки, и т. д.

Ионы тяжелых металлов (свинец, кадмий, ртуть, медь, серебро и т. д.) в небольших концентрациях оказывают стимулирующее действие на развитие микроорганизмов, так как служат для них микроэлементами, входящими в состав тех или иных ферментов. При повышении концентрации солей тяжелых металлов наблюдается их бактерицидный эффект. Бактерицидное действие тяжелые металлы могут оказывать в концентрациях: Hg^{2+}, Ag^{+} — 10^{-8}—10^{-6} М; Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} — 10^{-6}—10^{-4} М. Механизмы токсичного действия тяжелых металлов на бактериальную клетку заключаются в ингибировании синтеза белка и РНК или нарушении координации этих жизненно важных процессов.

Характер действия многих антисептиков — *бактерицидный* или *бактериостатический* — зависит от концентрации соединения в среде, т. е. его токсичность определяется дозой. Кроме того, среди микроорганизмов есть формы, устойчивые к действию общих клеточных и метаболических ядовитых веществ (фенол, окись углерода, сероводород и др.), отдельные виды обладают способностью использовать эти соединения в качестве источников питания. Считают, что устойчивость микроорганизмов к токсичным веществам во многих случаях определяется плазмидами.

Растворы токсичных соединений применяют как дезинфицирующие средства в медицине, пищевой промышленности. В сельском хозяйстве их используют для химической дезинфекции (протравливания) семян и почвы. Такого рода дезинфекция обычно направлена против определенного возбудителя заболевания и называется частичной дезинфекцией.

Антибиотики (от греч. *anti* — «противо...», *bios* — жизнь) — соединения, синтезируемые, как правило, микроорганизмами и обладающие способностью в небольших концентрациях оказывать избирательное токсичное действие на другие микроорганизмы. Известно более 5000 различных антибиотиков. Антибиотики принадлежат к разным группам соединений (углеродсодержащие, аминоглюкозиды, хиноны, пептиды, макролиды и др.). Механизмы их противомикробного действия могут быть самыми разными (нарушение синтеза клеточной стенки, ингибирование синтеза белка, РНК, ДНК и т. д.). Антибиотики нашли широкое применение в медицине и сельском хозяйстве. Однако в результате широкого внедрения этих веществ в практику появились устойчивые к ним формы микроорганизмов.

В выработке устойчивости бактерий к антибиотикам и другим токсичным веществам участвуют трансмиссивные плазмиды, несущие гены множественной лекарственной устойчивости — *R-факторы* (от англ. *resistance* — устойчивость). R-факторы обусловливают устойчивость микроорганизмов к нескольким (девять и более) группам веществ — антибиотикам, лекарственным веществам, солям тяжелых металлов и др. Гены, которые определяют устойчивость бактерий, могут находиться в транспозонах, способных перемещаться в разные участки хромосомы и на плазмиды. Распространению множественной лекарственной устойчивости бактерий способствует комбинация трансмиссивной плазмиды с транспозоном.

Влияние на микроорганизмы токсичных веществ в небольших концентрациях, не вызывающих их гибели, рассматривают как один из вариантов *стрессовых* (от англ. *stress* — напряжение) *воздействий.* В таких условиях включаются специальные механизмы клеточного метаболизма, которые обеспечивают выживание бактерий.

Излучения. Свет — фактор, необходимый для роста фотосинтезирующих микроорганизмов, например цианобактерий, зеленых и пурпурных бактерий, которые имеют пигменты, обеспечивающие возможность поглощать энергию светового луча и превращать ее в химическую. Для большинства других бактерий радиация, видимая и невидимая, как правило, является бесполезной или даже вредной.

Энергия излучения переносится порциями, называемыми *квантами*. Количество энергии изменяется в зависимости от длины волны: чем больше длина волны света, тем меньше дает он энергии.

Так, кванты инфракрасного света, имеющего длину волны более 1200 нм, содержат такое незначительное количество энергии, что не способны вызывать химических изменений в поглощающей их материи, и вся энергия превращается в тепло. Данное обстоятельство объясняет хорошо известный тепловой эффект инфракрасных ламп. Энергия радиации с длиной волны от 1200 (близкая к инфракрасным лучам) до 200 нм (ультрафиолетовые лучи) достаточна для того, чтобы произвести фотохимические изменения в поглощающих молекулах или атомах. При длине волны 200 нм и менее (рентгеновские лучи, а-частицы, космические лучи) энергия квантов столь высока, что молекулы ионизируются. Радиацию данного рода относят к ионизирующей.

Клетки организмов содержат многие виды молекул, химическая структура которых позволяет поглощать лучистую энергию. Такие молекулы могут подвергаться фотохимическим реакциям. Нуклеиновые кислоты и белки — важнейшие составные части живой клетки — обладают структурами, допускающими очень сильное поглощение ультрафиолетового (УФ) света. Фотохимические изменения, возникающие в результате действия УФ, очень вредны для микроорганизмов. Следовательно, ультрафиолетовый свет — сильный бактерицидный агент, поэтому ультрафиолетовые лампы используют для стерилизации воздуха.

Различают ближнее УФ-излучение, среднее и дальнее. *Ближнее УФ-излучение* имеет длину волны 400—320 нм и даже при не очень высоких дозах оказывает на бактерии определенное негативное воздействие — замедляет скорость роста, угнетает индукцию ферментов и др. Относительно высокие дозы ближнего УФ-излучения вызывают мутагенный и летальный эффекты. Гибель клетки вследствие ближнего УФ-излучения связана с повреждением ДНК и мембран.

Среднее УФ-излучение с длинами волн 320—290 нм и *дальнее* с длинами волн 290—200 нм оказывают на микроорганизмы довольно сходное действие. Эти виды излучения обладают высокими мутагенным и летальным эффектами, что объясняется интенсивным поглощением ДНК электромагнитного излучения в области 240—

300 нм (среднее и дальнее УФ-излучение) с максимумом поглощения в области 254 нм. Главный механизм, обусловливающий летальный и мутагенный эффекты, — образование пиримидиновых (тимин, цитозин) димеров в ДНК, препятствующих ее репликации. УФ-излучение приводит также к образованию сшивок ДНК с белком, разрыву цепей, денатурации ДНК и другим повреждениям.

Однако УФ-излучение не всегда вызывает гибель клеток микроорганизмов, многие из них обладают механизмами *репарации* (устранения повреждений). Так, повреждения, вызванные не очень высокой дозой УФ-излучения, могут быть частично сняты при обработке клеток бактерий видимым светом с длиной волны 400 нм. Такую обработку называют *фотореактивацией,* ее можно проводить только в течение нескольких часов после действия УФ-излучения. Выявлено, что в таких реактивированных клетках действует фермент, при участии которого расщепляются димеры тимина. В клетках бактерий, устойчивых к УФ-излучению, синтезируются ферменты, которые устраняют повреждения ДНК и без реактивации светом.

Видимое излучение также оказывает некоторое отрицательное воздействие на микроорганизмы, особенно лишенные пигмента. Поэтому микроорганизмы, живущие на поверхности субстратов, подвергающихся воздействию солнечных лучей, содержат в клетках каротиноидные пигменты, защищающие клетку от повреждений, вызываемых УФ- и видимым излучением.

Многие бактерии, обнаруживаемые в воздухе, например микрококки, также содержат каротиноидные пигменты, поэтому и не гибнут на солнечном свету.

Ионизирующая радиация (рентгеновские лучи, а-частицы, у-излучение и др.) с длиной волны менее 10 нм в низких дозах оказывает мутагенное действие на микроорганизмы, в высоких — летальное. Ионизирующие излучения в отличие от ультрафиолетового вызывают не только прямые, но и косвенные повреждения ДНК, что связано с образованием свободных радикалов и органических перекисей. Указанные повреждения проявляются главным образом в одноцепочечных или двухцепочечных разрывах молекулы ДНК.

Существуют и резистентные к ионизирующей радиации бактерии. *Радиорезистентность* у них варьирует в довольно широких пределах и зависит от систем репарации и регуляции. Весьма высока радиоустойчивость некоторых кокков, изолированных из облученных продуктов. Так, очень высокоустойчив к УФ- и у-излучению кокк *Deinococcus radiodurans,* который способен репарировать двухнитевые разрывы ДНК, гибельные для многих бактерий. Ионизирующую радиацию используют для стерилизации различных материалов, консервирования пищевых продуктов и т. д. При этом свойства стерилизуемого материала не изменяются.

5.6. Взаимодействие факторов внешней среды

Мы рассмотрели раздельное влияние различных физических и химических факторов внешней среды на микроорганизмы. Однако в действительности изолированное действие отдельного фактора весьма редкое явление. В природе, а нередко и в условиях искусственной культуры на микроорганизмы оказывает действие множество факторов среды одновременно. Подчас это резко меняет эффективность рассматриваемого фактора. Так, реакция среды влияет на летальный эффект температуры: бактерии гораздо легче могут быть уничтожены при нагревании в кислой среде, чем в нейтральной или щелочной. Летальный эффект рентгеновских лучей сильно повышается в присутствии молекулярного кислорода. В то же время бактерии могут быть защищены от воздействия рентгеновских лучей, если облучение идет в среде, компоненты которой находятся в восстановленном состоянии.

Таким образом, термины «оптимальная температура» или «оптимальная реакция среды» для данного вида бактерий имеют реальное значение, если все другие факторы внешней среды известны. Сложность взаимодействия между отдельными ее факторами чрезвычайно затрудняет определение оптимальных условий роста микроорганизмов. Тем не менее данный вопрос имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

Взаимоотношения микроорганизмов. Микроорганизмы в природной обстановке живут в тесной взаимосвязи друг с другом и прочим населением окружающей среды. Взаимоотношения между микроорганизмами могут приносить им как пользу, так и вред, а также быть антагонистическими. Существуют взаимоотношения, при которых микроорганизмы, развиваясь в составе одного ценоза, не оказывают друг на друга ни положительного, ни отрицательного влияния. Такие отношения квалифицируют как нейтрализм (от лат. *neutralis* — не принадлежащий ни тому, ни другому).

Микроорганизмам, развивающимся в тех или иных природных средах (почвы, водоемы и т. д.), приходится выдерживать борьбу за существование с видами, с которыми у них складываются конкурентные отношения. Конкуренция (от лат. *concurrere* — сталкиваться) — это взаимоотношения между видами, которые соревнуются за питание на одних и тех же субстратах. Различают конкуренцию *пассивную,* проявляющуюся в потреблении субстратов, равно необходимых обоим микроорганизмам, или *активную,* если продукты обмена веществ одного из конкурентов подавляют жизнедеятельность другого.

Большое значение в конкурентной борьбе организмов имеет их способность использовать большее или меньшее разнообразие субстратов. Поэтому выделяют две стратегии приспособления: «генералисты», использующие для питания разнообразные вещества, и «специалисты», способные использовать только один или несколько определенных субстратов. «Генералисты» легче находят питательный субстрат, однако «специалисты» растут быстрее и получают преимущество при избытке имеющегося субстрата значительно быстрее, чем «генералисты», его потребляя.

В ряде случаев наблюдаются ассоциативные взаимоотношения между микроорганизмами. Последовательно изменяя компоненты среды, микроорганизмы создают благоприятные условия для существования других микроскопических существ. Например, аэробы, поглощая кислород, благоприятствуют развитию анаэробов.

Продукты жизнедеятельности одних видов микробов могут служить источником энергии, питательных или ростовых веществ для других. Нитрифицирующие бактерии получают необходимую им энергию при окислении аммиака, образующегося в результате жизнедеятельности аммонифицирующих бактерий. Для других микроорганизмов аммиак служит источником азота. Продукты обмена веществ бактерий, расщепляющих целлюлозу, используются фиксаторами азота и т. д.

Широко распространен и такой тип взаимоотношений микроорганизмов, как синтрофия (от греч. *syn* — вместе, *trophe* — пища, питание). Указанные взаимоотношения наблюдаются в тех случаях, когда два или более вида бактерий способны осуществлять совместно процесс, который ни один из них не в состоянии выполнить в отдельности.

Существуют сообщества разноименных микроорганизмов или микро- и макроорганизмов в условиях тесного и длительного пространственного контакта, когда партнеры взаимно приспосабливаются к совместному существованию. Такие взаимоотношения между организмами называют симбиозом (от греч. *symbiosis* — совместная жизнь).

По характеру взаимоотношений между партнерами различают несколько типов симбиоза[1]: комменсализм, мутуализм и паразитизм.

Комменсализм (от лат. *com* — вместе и *mensa* — стол, трапеза) — тип симбиоза, когда один из партнеров симбиотической системы (комменсал) возлагает на другого партнера (хозяина) регуляцию своих взаимоотношений с окружающей средой, однако при этом не вступает с ним в тесный контакт. Базой для подобного симбиоза могут быть общее пространство, пища, кров и т. п. Комменсалы — это микроорганизмы, которые живут на внешних покровах и во

[1] Следует отметить, что термин «симбиоз» часто встречается и в более узком смысле, когда под ним подразумевают лишь взаимовыгодные, неантагонистические формы сосуществования организмов.

внутренних органах высших животных и растений. Например, эпифиты, колонизующие надземные части растений (листья, стебли), живут как комменсалы.

Отдельные типы симбиоза существенно различаются и относительной выгодой, которую получает каждый из партнеров сообщества. При *мутуалистическом* (от лат. *mutuus* — взаимный) *симбиозе* оба партнера извлекают пользу от взаимосуществования, при этом ни один из них не может существовать без другого. *Паразитический* (от греч. *parasites* — нахлебник) *симбиоз* полезен только одному из партнеров (паразиту), в то время как второй (хозяин) не получает ничего, а часто даже приобретает различной степени повреждения. Обычно паразит использует тело хозяина как среду обитания либо источник пищи.

Тип симбиоза может изменяться при смене условий окружающей среды, и взаимоотношения, бывшие ранее взаимовыгодными, могут стать паразитическими, и наоборот.

По степени взаимозависимости партнеров выделяют факультативный и облигатный симбиоз. При *факультативном симбиозе* партнеров можно культивировать друг без друга. Если симбионтов нельзя культивировать в изолированном виде, то симбиоз называют *облигатным*.

Примерами мутуалистического симбиоза служат случаи развития или полового размножения некоторых дрожжей и грибов лишь в присутствии других микроорганизмов. Взаимоотношения подобного рода обусловливаются, по всей вероятности, образованием микробами-спутниками веществ типа ауксинов или других факторов роста, которые нужны другому микроорганизму для прохождения определенных фаз развития. Многие виды бактерий, нуждающихся в витамине B_{12}, получают его от других видов микроорганизмов, синтезирующих данное соединение. Широко известны и такие взаимоотношения, как симбиоз гриба с растением при образовании микориз, симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми растениями, симбиоз целлюлозоразлагающих бактерий, обитающих в рубце крупного рогатого скота, с животным и др.

Паразитический симбиоз широко распространен в мире микроорганизмов. Известны микоплазмоподобные организмы, паразитирующие на колониях водорослей, грибов, бактерий. На некоторых формах одноклеточной водоросли *Chlorella* паразитирует мелкий вибрион *Vampirovibrio chlorellavorus.* Этот облигатный паразит прикрепляется к оболочке водоросли и существует за счет поступающих из ее клетки веществ. Примером паразитического симбиоза может служить и инфекционная болезнь, при которой хозяин постепенно ослабевает и в конце концов может погибнуть.

В микробных сообществах наблюдается и тип взаимоотношений, который рассматривается как хищничество, когда одна группа микроорганизмов использует другую в качестве пищи. Примером хищника служит *Bdellovibrio bacteriovorus* (в переводе — пиявковибрион, пожирающий бактерии). Паразит прикрепляется к клеточной стенке бактерии-жертвы, проникает внутрь, начинает питаться, быстро увеличивается в размерах и размножается. Когда содержимое клетки переварено, клеточная стенка пораженной бактерии разрушается, молодые вибрионы выходят наружу и заражают новые бактериальные клетки. Каждый вид рода *Bdellovibrio* поражает свой вид бактерий. Преимущественно эти организмы питаются грамотрицательными бактериями, в частности псевдомонадами и энтеробактериями. Виды рода *Bdellovibrio* встречаются в почве и воде.

Отдельные миксобактерии способны лизировать клетки бактерий и питаться их содержимым. Некоторые бактерии и грибы образуют специальные приспособления для захвата микроорганизмов и мелких животных, например так называемые «ловчие сети». Запутавшиеся в них существа погибают и лизируются, после чего служат источником пищи. Ряд видов грибов живет за счет грибов других видов. Мицелий грибов, в свою очередь, часто разрушается актиномицетами.

Бактерии служат пищей для основной массы простейших, причем набор используемых для питания бактерий у различных простейших варьирует.

Антагонизм (от греч. *antagonisma* — спор, борьба) — тип взаимоотношений, когда один вид микроорганизма задерживает или подавляет развитие другого. В тех случаях, когда оба микроорганизма взаимно угнетают друг друга, тип взаимоотношений называют *аменсализмом* (от лат. *a* — удаление, отказ и *mensa* — стол, кушанье).

Подавление конкурентов может быть обусловлено накоплением продуктов обмена веществ бактериальной клетки, особенно таких, как кислоты или щелочи. Например, в процессе развития уксуснокислых бактерий в среде накапливается значительное количество уксусной кислоты, что исключает возможность роста многих других микроорганизмов. Клетки некоторых бактерий выделяют экзоферменты (протеазы, лизоцимы), стимулирующие разрушение клеток других организмов. Определенным видам бактерий, актиномицетов, грибов и других свойствен синтез весьма специфических продуктов обмена, угнетающих или полностью подавляющих рост других видов. Данные вещества называют антибиотиками.

Антибиотики — химические вещества, образующиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, способные подавлять рост микробов и даже убивать их (см. также с. 109). В некоторых случаях антибиотики способствуют выживанию микроорганизмов в естественной среде обитания (почва, водоемы и др.). Например, они служат защитой микроорганизма от других микроорганизмов. Из-

вестны антибиотики, вырабатываемые грибами (пенициллин), актиномицетами (стрептомицин) и бактериями (грамицидин С). Антибиотики, как известно, широко применяют в медицине и сельском хозяйстве.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое водная активность раствора и как она влияет на рост микроорганизмов? 2. Каковы особенности галофильных бактерий? 3. Поясните понятие «кардинальные температуры». 4. В чем сущность адаптации психрофильных и термофильных бактерий? 5. Какими механизмами обусловлена токсичность молекулярного кислорода? 6. В чем заключается эффект действия ультрафиолетового излучения на микроорганизмы? 7. Какова устойчивость различных бактерий к повышенному давлению? 8. На каких механизмах основана конкуренция у бактерий? 9. Дайте определение понятиям: симбиоз, синтрофия, паразитизм, антагонизм.

Глава 6 Питание микроорганизмов

Микроорганизмы, как и все другие живые существа, нуждаются в пище, которая поступает в их клетки из окружающей среды. *Пищей* обычно называют вещества, которые, попав в живой организм, служат либо источником энергии для процессов жизнедеятельности, либо материалом для построения составных частей клетки.

6.1. Способы питания и поступления в клетку различных веществ

Потребность в питательных веществах микроорганизмы могут удовлетворять непосредственно усваивая их или предварительно преобразуя в доступную форму. Известны два способа питания живых существ — голозойный и голофитный.

При *голозойном* способе питания живой организм захватывает или заглатывает плотные частицы пищи, которая затем переваривается в пищеварительном тракте. Указанный способ питания характерен для животных (от простейших до высших). При *голофитном* способе питания живые существа, не имеющие специальных органов для заглатывания и пищеварения, используют питательные вещества, всасывая их в виде относительно небольших молекул из водного раствора. Данный способ питания свойствен растениям и микроорганизмам.

Полимерные органические соединения (полисахариды, белки и др.) микроорганизмы не могут поглощать и использовать непосредственно в обмене веществ клетки. Такие вещества должны быть вначале расщеплены на простые соединения, для которых клеточная мембрана проницаема. Крупные молекулы расщепляются экзоферментами, экскретируемыми клетками микроорганизмов в среду. Такое внешнее, или внеклеточное, переваривание свойственно только микроорганизмам.

Поступление воды и растворенных в ней питательных веществ из окружающей среды внутрь микробной клетки, а также выход продуктов обмена происходят через клеточную стенку, капсулу и слизистые слои. Капсула и слизистые слои представляют собой достаточно рыхлые образования и, возможно, не оказывают значительного влияния на транспорт веществ, тогда как клеточная стенка служит существенным барьером для поступления питательных соединений в клетку.

Активную роль в поступлении в клетку питательных веществ играет цитоплазматическая мембрана. Чтобы обеспечить нормальную жизнедеятельность микроорганизма, последняя должна быть проницаемой для питательных веществ и кислорода, поступающих в клетку, а также для продуктов обмена, выходящих наружу. Поступление воды и растворенных в ней веществ через цитоплазматическую мембрану — активный процесс: живая микробная клетка никогда не находится в равновесии с веществами окружающей среды, проходящими через ее мембрану.

Транспорт питательных веществ. Выделяют несколько типов транспортных систем, при помощи которых вещества из окружающей среды проходят через цитоплазматическую мембрану: пассивную диффузию, облегченную диффузию, активный транспорт и перенос групп (радикалов). Причем два из них (пассивная и облегченная диффузия) обеспечивают только транспорт, но не накопление веществ в микробной клетке, в то время как активный транспорт способствует аккумуляции веществ внутри клетки.

При *пассивной диффузии* транспорт вещества происходит через цитоплазматическую мембрану под действием разности концентраций (для неэлектролитов) или разности электрических потенциалов (для ионов) по обе стороны мембраны. Экспериментами показано, что, за исключением воды, только кислород и некоторые ионы проходят через цитоплазматическую мембрану в результате пассивной диффузии. Скорость такого переноса веществ весьма незначительна. Определенное значение пассивная диффузия приобретает при нарушениях жизнедеятельности бактериальной клетки.

Транспорт большинства растворенных веществ осуществляется через мембрану при действии специальных механизмов переноса. Для этого служат молекулы-переносчики, циркулирующие между

внешним и внутренним пограничными слоями цитоплазматической мембраны. Считают, что данные переносчики связывают молекулы растворенных веществ на ее внешней стороне, транспортируют их к внутренней, где освобождают, и молекулы питательного вещества поступают в цитоплазму без изменения. Такие связанные с цитоплазматической мембраной переносчики, представляющие собой субстратспецифичные связывающие белки, называют пермезами, или транслоказами.

Транспорт растворенных веществ, осуществляемый переносчиками, может быть в виде облегченной диффузии и активного транспорта. Движущей силой *облегченной диффузии* служит разница в концентрации какого-либо вещества по обе стороны мембраны. Молекула вещества соединяется с молекулой-переносчиком у наружной поверхности мембраны, и образовавшийся комплекс диффундирует через мембрану к ее внутренней стороне. Там он диссоциирует, и освобожденное вещество оказывается внутри клетки. Затем переносчик диффундирует к наружной поверхности и может присоединить новую молекулу вещества.

Облегченная диффузия не требует расхода энергии, если наружная концентрация вещества выше внутренней, так как оно перемещается «вниз» по химическому градиенту. Скорость процесса зависит от концентрации вещества в наружном растворе. Предполагают, что выход продуктов обмена веществ из микробной клетки также происходит по типу облегченной диффузии при участии переносчиков.

Активный транспорт связан с работой специфических транспортных белков (пермеаз, транслоказ и др.), которые также находятся в цитоплазматической мембране. В этом случае растворенные вещества переносятся в клетки микроорганизмов «вверх» по химическому градиенту (или против градиента концентрации). Считают, что большинство веществ проникает в клетку микроорганизма в результате активного транспорта. Источниками энергии для транспортных процессов служат АТФ, протонный потенциал и фосфоенолпируват. Существуют системы «первичного» и «вторичного» активного транспорта.

В системах *«первичного» активного транспорта* используется химическая энергия. Необходимость использования энергии для поддержания активного транспорта объясняется теми изменениями, которые претерпевает переносчик: когда он обращен к внешней поверхности мембраны, то обладает высоким сродством к субстрату, а когда к внутренней — низким сродством к субстрату. Возможность транспортировать вещества против градиентов концентраций часто используется клетками бактерий для получения этих веществ из окружающей среды, где их концентрация мала, что обычно для

природных условий. При отсутствии источников энергии накопления веществ внутри не происходит.

Подсчитано, что перенос молекулы тиогалактозида через цитоплазматическую мембрану кишечной палочки требует затраты одной молекулы АТФ. Предполагая, что активный перенос других соединений связан с подобным же расходом АТФ, можно понять, какое значительное количество энергии на транспорт веществ в клетку потребляет растущий и размножающийся микроорганизм. В отдельных случаях на активный транспорт может затрачиваться почти вся энергия, вырабатываемая в микробной клетке.

В системах *«вторичного» активного транспорта* для переноса против градиента концентрации через мембрану многих веществ, в том числе неорганических и органических ионов, Сахаров, используется энергия протонного потенциала. В процессе дыхания в локализованной в мембране дыхательной цепи осуществляется вывод протонов. В результате перемещения протонов через мембрану за счет энергии дыхания создается градиент электрохимического потенциала (называемый также протонным потенциалом, или протондвижущей силой) между наружной и внутренней сторонами мембраны. Протонный потенциал обусловливает фосфорилирование, т. е. синтез АТФ, или используется непосредственно транспортными системами. Протонный потенциал (Др) определяется мембранным потенциалом (Ду), имеющим отрицательное значение внутри клетки, и градиентом протонов (АрН), имеющим внутри клетки щелочной показатель в соответствии с уравнением

$$Др = Ду — z.\ ДрН\ (мВ),$$

где z = 59 мВ при 25 °С.

Для поддержания протонного потенциала микроорганизм непрерывно выкачивает за пределы своей клетки протоны и другие ионы (Na^+). В этих целях используются специфичные транспортные белки, имеющиеся в мембране. Каждому транспортному белку присуща определенная функция. Способность белка катализировать одновременный и однонаправленный транспорт одного протона и одной молекулы субстрата, например сахара (лактозы, глюкозы и др.), называют *симпортом*. *Унипорт* наблюдается, когда белок осуществляет перенос только одного субстрата (без протона), *антипорт* — когда он осуществляет перенос двух разных субстратов, обычно ионов, в противоположных направлениях.

У многих микроорганизмов сахара (фруктоза, глюкоза и другие родственные вещества) транспортируются в клетку при помощи фосфотрансферазной системы переноса групп (радикалов). Данный процесс отличается от активного транспорта тем, что субстрат попадает внутрь бактериальной клетки в химически модифицированной форме — чаще всего в виде фосфатного эфира. Движущая сила рас-

сматриваемого процесса состоит в том, что внутри цитоплазматической мембраны сахар связывается в результате реакции с фосфорилированным ферментом (фосфотрансферазная система, источником энергии в этой реакции служит фосфоенолпируват), образующийся в итоге фосфорный эфир освобождается и поступает в цитоплазму. Химическая природа транспортируемого вещества при переносе не меняется.

Таким образом, удовлетворение пищевых потребностей микроорганизмов зависит не только от внутреннего комплекса ферментов, необходимого для утилизации определенных соединений, но и от действия специфических транспортных механизмов.

6.2. Пищевые потребности микроорганизмов

Основную часть микробной клетки составляет вода (80—90% общей массы). В состав клеток микроорганизмов входят следующие элементы (% массы сухого вещества): углерод — 50; кислород — 20; азот — 14; водород — 8; фосфор — 3; сера — 1; калий — 1; натрий — 1; кальций — 0,5; магний — 0,5; хлор — 0,5; железо — 0,2; другие элементы — 0,3. В очень небольших количествах в состав клетки входят микроэлементы цинк, медь, кобальт, стронций, марганец и др.

Для биосинтеза основных макромолекул клетки, из которых формируются клеточная стенка, мембраны, нуклеоид, цитоплазма и другие компоненты, микроорганизмы должны получать все эти элементы в составе источников питания.

Помимо питательных элементов, используемых для построения структурных частей клетки, микроорганизмы нуждаются в постоянном источнике энергии, которая расходуется на биосинтез, транспорт веществ и другие жизненные процессы в клетке.

Углерод. Наибольшее значение для питания микроорганизмов имеет углерод, составляющий в сухом веществе клеток около 50%. Потребности различных микроорганизмов в источниках углерода весьма разнообразны. Фотосинтезирующие организмы, использующие энергию солнечного света, и бактерии, получающие энергию при окислении неорганических веществ, потребляют наиболее окисленную форму углерода (CO_2) как единственный или главный источник углерода. Превращение CO_2 в органические соединения клетки представляет собой восстановительный процесс, который идет со значительным потреблением энергии. Поэтому большую часть энергии, получаемой от солнечного света или от окисления восстановленных неорганических соединений, данные физиологические группы микроорганизмов расходуют на восстановление CO_2 до уровня органического вещества.

Другие организмы получают углерод главным образом из органических веществ, а необходимую энергию — при окислении этих

соединений. Следовательно, органические вещества служат одновременно и источником углерода, и источником энергии.

Питательная ценность органических источников углерода зависит от строения их молекул. Для большинства микроорганизмов лучший источник углерода — органические соединения, содержащие частично окисленные атомы углерода (группы —CHOH, —CH_2OH, —COH). Отсюда можно сделать вывод о высокой питательной ценности веществ, содержащих спиртовые группы.

Значительно хуже ассимилируются вещества с большим количеством полностью восстановленных атомов углерода (радикалы —CH_3 и =CH_2). К числу соединений, содержащих метиловые и метиленовые радикалы, относятся газообразные углеводороды, парафин, высшие жирные кислоты и т. д. Почти совсем не усваиваются органические соединения, содержащие углерод только в форме карбоксила (—COOH), например щавелевая кислота.

Считают, что питательная ценность органических соединений связана с легкостью их перехода в углеводы или близкие к ним соединения, которые затем превращаются в вещества с тремя атомами углерода (пируват). Усвояемость органических соединений зависит не только от их растворимости и степени окисленности атомов углерода, но и от пространственной конфигурации молекул. Большинство активных компонентов клетки микроорганизма — соединения оптически деятельные, причем клетка обычно усваивает только определенные оптические изомеры, например сахара, относящиеся к D-ряду, аминокислоты — к L-ряду. Очень немногие микроорганизмы обладают ферментами, превращающими один оптический изомер в другой.

Поглощенные микробной клеткой органические вещества вовлекаются в сопряженные окислительно-восстановительные процессы. Часть атомов углерода окисляется до соединений с группами —CO и —COOH, которые затем преобразуются в CO_2, другая часть, восстановившись до групп —CH_3, =CH_2 и ≡CH, входит в состав аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, высших жирных кислот и т. п.

Микроорганизмы значительно различаются по способности усваивать разные соединения углерода и синтезировать из них составные части клетки. Некоторые виды удивительно всеядны. Однако известно и множество различных специализированных микроорганизмов, которые нуждаются в определенных соединениях. Существуют виды, использующие для питания нефть, газообразные углеводороды, парафины. Резина, гудрон, капрон и другие синтетические материалы и даже пестициды после попадания в почву начинают разлагаться при участии микроорганизмов. Практически не существует органических соединений, которые не усваивались бы микроорганизмами.

Специфичность набора органических соединений, свойственная каждому виду микроорганизмов, используется для физиологической характеристики вида и для классификации микроорганизмов.

Ряд микроорганизмов, использующих углерод органических соединений, нуждаются и в диоксиде углерода как в питательном веществе, однако в очень небольших количествах, так как он потребляется лишь в некоторых биосинтетических реакциях. Поскольку CO_2 нормально продуцируется большинством микроорганизмов, использующих органические вещества, их биосинтетические потребности могут удовлетворяться в процессе метаболизма. Тем не менее полное удаление CO_2 из среды, в которой культивируют микроорганизмы, часто задерживает или прекращает их рост. Некоторым бактериям и грибам для роста необходима довольно высокая концентрация CO_2 в атмосфере (5—10%).

Азот. Микроорганизмы нуждаются в источниках азотного питания. Азот служит материалом для образования аминных (NH_2) и иминных (NH) групп в молекулах аминокислот, пуринов и пиримидинов, нуклеиновых кислот и других веществ клетки. Самый доступный источник азота для многих микроорганизмов — ионы аммония (NH_4^+) и аммиак (NH_3), достаточно быстро проникающие в клетку и трансформирующиеся в амино- и иминогруппы.

Аммонийные соли органических кислот предпочтительнее для питания микроорганизмов, чем минеральные аммонийные соли, поскольку последние являются физиологически кислыми, и при потреблении NH_3 в среде накапливаются анионы неорганических кислот (SO_4^{2-}, HPO_4^{2-}, Cl^-), что влечет за собой сильное снижение pH среды.

Соли азотной кислоты в отличие от минеральных аммонийных солей не являются физиологически кислыми. После потребления NO_3^- микроорганизмами остаются ионы металлов (K^+, Mg^{2+}, Na^+), что способствует подщелачиванию среды. Не все микроорганизмы могут восстанавливать окисленные соединения азота и потреблять нитраты или нитриты. В целом большинство микроорганизмов способны использовать минеральные соединения азота.

Существуют виды, способные усваивать молекулярный азот воздуха и строить из него необходимые компоненты клетки. Эти виды имеют большое значение в обогащении пахотного слоя связанными соединениями азота. Известно большое число групп микроорганизмов (бактерий и цианобактерий), способных к азотфиксации.

Наряду с минеральными источниками многие микроорганизмы могут потреблять азот из органических соединений, которые одновременно служат и источниками углерода. Использование органических источников азота связано с отщеплением от них NH_3 и поглощением последнего клеткой. Некоторые микроорганизмы могут ассимилировать аминокислоты, употребляя их как готовые «строительные блоки».

Усвояемость органических источников азота весьма различна. Белки, представляющие собой высокомолекулярные соединения, не проникают в клетку. Поэтому белками могут питаться только микроорганизмы, выделяющие в среду экзоферменты, расщепляющие молекулы белков до пептидов и аминокислот. Указанными свойствами обладают многие микроорганизмы.

Обычно микроорганизмам, использующим только органические соединения азота, например аминокислоты, требуется определенный набор этих веществ. Высокая чувствительность подобных организмов к присутствию в среде некоторых аминокислот позволила разработать микробиологический метод их качественного и количественного определения.

Сера. Как и азот, сера — необходимый компонент клеточного материала всех организмов, в которых она встречается главным образом в восстановленной форме (сульфидная группа). Зеленые растения ассимилируют соединения серы в окисленном состоянии в виде сульфатов и восстанавливают их для включения в биосинтез.

Большинство микроорганизмов может использовать сульфаты как питательное вещество, но существуют бактерии, нуждающиеся для биосинтеза в источниках восстановленной серы.

Источником серы для них могут служить неорганические сульфиды, тиосульфаты и содержащие серу органические соединения.

Другие элементы питания микроорганизмов. Наряду с углеродом, азотом и серой микроорганизмы используют отельные количества калия и фосфора, небольшие — натрия, магния, кальция, железа.

Фосфор входит в состав ряда важных органических соединений клетки (нуклеиновые кислоты, фосфолипиды, коферменты и др.). Ряд органических соединений фосфора (АТФ и АДФ) используются в живых организмах как аккумуляторы энергии, высвобождающейся в ходе окислительных процессов. Без фосфора микроорганизмы не развиваются. В отличие от азота и серы фосфор встречается в составе органических веществ только в окисленном состоянии (H_3PO_4). Он никогда не вступает в прямое соединение с углеродом, только по типу эфирной связи через кислородный мостик (—О—). Фосфор поступает в клетки микроорганизмов в виде молекулы фосфорной кислоты, в неизменной форме участвует в различных биохимических превращениях. Наилучший источник фосфора — соли ортофосфорной кислоты.

Калий играет существенную роль в углеводном обмене микроорганизмов и синтезе клеточного вещества.

Магний входит в состав бактериохлорофилла у зеленых и пурпурных бактерий, хлорофилла у цианобактерий, а также служит активатором ряда ферментов. Этот элемент находится в клетке

главным образом в ионном состоянии или в составе нестойких органических соединений. Источником калия и магния могут быть их соли.

Кальций также необходим для роста бактерий (например, *Azotobacter, Clostridium pasteurianum* и др.). Источником кальция служат его водорастворимые соли.

К числу незаменимых питательных элементов, хотя и требующихся микроорганизмам в небольших количествах, относится железо. Оно входит в составе особой органической группировки (гема) в коферменты некоторых важных ферментов (например, цитохромов), участвующих в дыхании микроорганизмов. Источником железа могут быть сульфаты и другие его соли.

Микроорганизмам необходимы также микроэлементы, которые потребляются в малых количествах, но без них невозможно осуществление важнейших жизненных функций. Они входят в состав ферментов. Например, медь входит в состав порфиринов, участвующих в переносе кислорода в процессах дыхания, молибден — в состав фермента нитрогеназы, осуществляющей фиксацию азота из атмосферы.

Кроме источников основных питательных веществ (органогенные элементы, зольные и микроэлементы), многие микроорганизмы нуждаются в специфических соединениях, которые регулируют рост и называются факторами роста. К ним относят витамины и витаминоподобные вещества, пурины и пиримидины, аминокислоты и ряд других соединений. Не обнаруживающие потребности в факторах роста микроорганизмы называются *прототрофами,* нуждающиеся в том или ином ростовом веществе — *ауксотрофами*.

6.3. Типы питания

В соответствии с принятой сейчас классификацией микроорганизмы по типу питания разделяют на ряд групп в зависимости от источников энергии и углерода. Так, выделяют *фототрофов,* использующих энергию солнечного света, и *хемотрофов,* энергетическим материалом для которых служат разнообразные органические и неорганические вещества.

В зависимости от того, в какой форме микроорганизмы получают из окружающей среды углерод, их подразделяют на две группы: *автотрофные* («сами себя питающие»), использующие в качестве единственного источника углерода диоксид углерода, и *гетеротрофные* («питающиеся за счет других»), получающие углерод в составе довольно сложных восстановленных органических соединений.

Таким образом, по способу получения энергии и углерода микроорганизмы можно подразделить на фотоавтотрофы, фотогетеротрофы, хемоавтотрофы и хемогетеротрофы. Внутри группы в зависимости от природы окисляемого субстрата, называемого донором электронов (Н-донором), в свою очередь, выделяют *органотрофов,* окисляющих органические вещества, и *литотрофов* (от греч. *lithos* — камень), окисляющих неорганические вещества. Поэтому в зависимости от используемого микроорганизмами источника энергии и донора электронов следует различать фотоорганотрофы, фотолитотрофы, хемоорганотрофы и хемолитотрофы. Таким образом, выделяют восемь возможных типов питания (табл. 1).

Каждый тип питания характерен для большего или меньшего числа микроорганизмов. Ниже приведено описание наиболее распространенных типов питания и дан краткий перечень микроорганизмов, их осуществляющих.

Таблица 1

Возможные типы питания микроорганизмов (по: Е. Н. Кондратьева, 1996)

Источник энергии	Окисляемый субстрат (донор водорода)	Источник углерода	
		органические соединения	диоксид углерода
Свет	Органические соединения	Фотоорганогетеротрофия	Фотоорганоавтотрофия
То же	Неорганические соединения	Фотолитогетеротрофия	Фотолитоавтотрофия
Органические соединения	Органические соединения	Хемоорганогетеротрофия	Хемоорганоавтотрофия
Неорганические соединения	Неорганические соединения	Хемолитогетеротрофия	Хемолитоавтотрофия

Фотолитоавтотрофия. Это тип питания, характерный для микроорганизмов, использующих энергию света для синтеза веществ клетки из CO_2 и окисляющих при фотосинтезе неорганические соединения (H_2O, H_2S, S^0). К данной группе относят цианобактерии, пурпурные серные бактерии и зеленые серные бактерии.

Цианобактерии, как и зеленые растения, восстанавливают CO_2 до органического вещества, используя в качестве донора электронов воду:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O)^1 + O_2$$

[1] Символом (CH_2O) в приводимых уравнениях обозначено органическое вещество, уровень восстановленности которого соответствует углеводам.

Пурпурные серные бактерии (сем. *Chromatiaceae)* содержат бактериохлорофиллы *a* и *b,* обусловливающие способность данных микроорганизмов к фотосинтезу, и различные каротиноидные пигменты. Для восстановления CO_2 в органическое вещество бактерии данной группы используют как донор электронов H_2S. При этом в цитоплазме накапливаются гранулы серы, которая затем окисляется до серной кислоты:

$$CO_2 + 2H_2S \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + 2S$$

$$3CO_2 + 2S + 5H_2O \xrightarrow{h\nu} 3(CH_2O) + 2H_2SO_4$$

Многие пурпурные серные бактерии являются облигатными анаэробами.

Зеленые серные бактерии (сем. *Chlorobiaceae)* содержат зеленые бактериохлорофиллы *c, d,* в небольшом количестве — бактериохлорофилл а, а также различные каротиноиды. Они являются строгими анаэробами, как пурпурные серные бактерии способны окислять в процессе фотосинтеза сероводород, сульфид, сульфит, тиосульфат, серу, в большинстве случаевдоSO_4^{2-}

Фотоорганогетеротрофия. Это тип питания, характерный для микроорганизмов, которые получают энергию в процессе фотосинтеза, а в качестве доноров электронов могут использовать простые органические соединения, например органические кислоты, спирты. Такой тип питания характерен для пурпурных несерных бактерий.

Пурпурные несерные бактерии (сем. *Rhodospirillaceae)* содержат бактериохлорофиллы *a* и *b,* а также различные каротиноиды.

Большинство этих бактерий не способны окислять сероводород и серу.

Хемолитоавтотрофия. Это тип питания, характерный для микроорганизмов, получающих энергию при окислении неорганических соединений, таких, как H_2, NH_4^+, NO_2^-, Fe^{2+}, H_2S, S°, SO_3^{2-}, $S_2O_3^{2-}$, CO и др. Углерод для построения всех компонентов клеток хемолитоавтотрофы получают из диоксида углерода. Такой тип питания также называют *хемосинтезом*.

Явление хемосинтеза у микроорганизмов (железобактерий и нитрифицирующих бактерий) было открыто в 1887—1890 гг. известным русским микробиологом С. Н. Виноградским. Хемолитоавтотрофию осуществляют нитрифицирующие бактерии (окисляющие аммиак или нитриты), серные бактерии (окисляющие сероводород, элементарную серу и некоторые другие неорганические соединения серы), водородные бактерии (окисляющие водород до воды), железобактерии (способные окислять соединения двухвалентного железа) и т. д.

Представление о количестве энергии, получаемой при процессах хемолитоавтотрофии, вызываемых указанными бактериями, дают следующие реакции:

$$NH_3 + 1\,{}^1\!/_2\, O_2 \longrightarrow HNO_2 + H_2O + 2{,}8 \cdot 10^5 \text{ Дж}$$

$$HNO_2 + {}^1\!/_2\, O_2 \longrightarrow HNO_3 + 0{,}7 \cdot 10^5 \text{ Дж}$$

$$H_2S + {}^1\!/_2\, O_2 \longrightarrow S + H_2O + 1{,}7.10^5 \text{ Дж}$$

$$S + 1\,{}^1\!/_2\, O_2 + H_2O \longrightarrow H_2SO_4 + 5{,}0.10^5 \text{ Дж}$$

$$H_2 + {}^1\!/_2\, O_2 \rightarrow H_2O + 2{,}3 \cdot 10^5 \text{ Дж}$$

$$2FeCO_3 + {}^1\!/_2\, O_2 + 3H_2O \longrightarrow 2Fe(OH)_3 + 2CO_2 + 1{,}7.\ 10^5 \text{ Дж}$$

Хемоорганогетеротрофия. Это тип питания, характерный для микроорганизмов, получающих необходимую энергию и углерод из органических соединений. Среди данных микроорганизмов известны многие аэробные и анаэробные виды, обитающие в почвах и других субстратах.

Среди хемоорганогетеротрофов выделяют сапротрофов, живущих за счет разложения мертвых органических материалов, и паразитов, питающихся в тканях живых организмов. В последнем случае имеются в виду *паратрофия* и *паратрофы,* т. е. облигатные внутриклеточные паразиты, которые вне клетки хозяина развиваться не могут (риккетсии и др.).

Считают, что в живом мире наиболее широко распространены два типа питания — фотолитоавтотрофия и хемоорганогетеротрофия. Первый тип питания характерен для высших растений, водорослей и ряда бактерий, второй — для животных, грибов и многих микроорганизмов. Остальные типы питания встречаются лишь у отдельных групп бактерий, живущих в особых, специфичных условиях среды.

Установлена способность многих микроорганизмов переходить с одного типа питания на другой. Например, водородокисляющие бактерии при наличии O_2 на средах с углеводами или органическими кислотами способны переключаться с хемолитоавтотрофии на хемоорганогетеротрофию. Поэтому их называют *факультативными хемолитоавтотрофами*. Микроорганизмы, неспособные расти в отсутствие специфичных неорганических доноров электронов (например, нитрифицирующие и некоторые другие бактерии), называют *облигатными хемолитоавтотрофами*.

У микроорганизмов наблюдается так называемая *миксотрофия*. Это тип питания, при котором микроорганизм — миксотроф — одновременно использует различные возможности питания, например сразу окисляя органические и минеральные соединения, или источником углерода для него одновременно могут служить диоксид углерода и органическое вещество и т. д.

В природе широко распространены микроорганизмы, источниками энергии и углерода для которых служат одноуглеродные соединения (метан, метанол, формиат, метиламин и др.). Данные микроорганизмы называют C_1 -использующими формами, или метилотрофами, а тип их питания — *метилотрофией*. В группе метилотрофных бактерий выделяют облигатные и факультативные виды.

Первые способны расти в результате использования только одноуглеродных соединений, вторые — и на средах с другими веществами. Среди метилотрофов есть микроорганизмы разных систематических групп.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие способы питания характерны для микроорганизмов? 2. Каковы механизмы «первичного» и «вторичного» активного транспорта веществ в бактериальную клетку? 3. Какие источники углерода присущи автотрофам и какие — гетеротрофам? 4. На какие группы делят микроорганизмы в зависимости от источника используемой ими энергии? 5. Что такое хемосинтез? 6. В чем заключается специфика миксотрофов и метилотрофов?

Глава 7 Метаболизм микроорганизмов

Питательное вещество, поступившее внутрь клетки микроорганизма, участвует во множестве разнообразных химических реакций. Все химические проявления жизнедеятельности микроорганизмов носят общее название ***метаболизма,*** или ***обмена веществ.*** Метаболизм включает две группы жизненно важных процессов — катаболизм (энергетический обмен) и анаболизм (биосинтез).

7.1. Основные понятия

Катаболизм и анаболизм. ***Катаболизм*** — это комплекс процессов расщепления пищевых веществ — углеводов, жиров и белков, которые происходят в основном за счет реакций окисления, в результате чего выделяется энергия. У микроорганизмов различают основные формы катаболизма — *брожение* и *дыхание* (аэробное или анаэробное). При брожении наблюдается неполный распад органических веществ с высвобождением незначительного количества энергии и накоплением богатых энергией конечных продуктов (этилового спирта, молочной, масляной и других кислот). При аэробном дыхании обычно осуществляется полное окисление органических веществ с выходом большого количества энергии и образованием бедных энергией конечных продуктов (CO_2 и H_2O). Высвобождающаяся при катаболизме органических веществ свободная энергия аккумулируется в форме энергии фосфатных связей аденозинтрифосфата **(АТФ).**

Биосинтез, или ***анаболизм,*** объединяет процессы синтеза макромолекул клетки (нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и т. д.) из более простых соединений, присутствующих в окружающей среде. Реакции биосинтеза связаны с потреблением свободной энергии, которая вырабатывается в процессах дыхания, брожения (а также фотосинтеза) и сохраняется в форме АТФ. Катаболизм и биосинтез протекают одновременно, многие реакции и промежуточные продукты для них общие.

Ферменты. Глубокое понимание процессов метаболизма микроорганизмов вряд ли возможно без предварительного знакомства с ролью и значением ферментов. ***Ферменты*** — биологические катализаторы. Они катализуют тысячи химических реакций, из которых слагается метаболизм организма. Известно уже около двух тысяч ферментов. По химической природе ферменты — глобулярные белки молекулярной массой от 10 000 до нескольких миллионов. Название ферменту во многих случаях дают по веществу, на которое он действует, с изменением окончания на «-аза». Например, целлюлаза катализует гидролиз целлюлозы до целлобиозы, уреаза — гидролиз мочевины *(urea)* до аммиака и CO_2 и т. п. Однако чаще фермент получает наименование, которое указывает на природу катализуемой им химической реакции.

Современная классификация ферментов также строится с учетом природы реакций, которыми они управляют. Согласно разработанной Комиссией по ферментам Международного биохимического союза классификации, выделяют шесть главных классов ферментов.

1. Оксидоредуктазы. Эти ферменты катализуют окислительно-восстановительные реакции, играют большую роль в процессах биологического получения энергии. К ним относятся дегидрогеназы (НАД, НАДФ, ФАД), цитохромы *(b, c,* с, *a, a_3),* ферменты, участвующие в переносе водорода, электронов и др.

2. Трансферазы. Катализуют перенос отдельных радикалов, частей молекул или целых атомных группировок от одних соединений к другим. Например, ацетилтрансферазы переносят остатки ацетата $-CH_3CO$, а также молекулы жирных кислот; фосфотрансферазы, или киназы, обусловливают перенос остатков фосфорной кислоты $H_3PO_3^{2-}$. Известны и другие трансферазы (аминотрансферазы, фосфорилазы и т. д.).

3. Гидролазы. Катализуют реакции расщепления и синтеза белков, жиров и полисахаридов с участием воды. К данному классу относят протеолитические ферменты (или пептидгидролазы), действующие на белки или пептиды; гидролазы глюкозидов, осуществляющие каталитическое расщепление углеводов и глюкозидов *В-фруктофуранозидаза, а* -глюкозидаза, *а*- и *В*-амилаза, *В*-галактозидаза и др.); эстеразы, катализующие расщепление и синтез сложных эфиров (липазы, фосфатазы).

4. Лиазы. Включают ферменты, катализующие отщепление от субстратов определенных химических групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп радикалов к двойным связям. Так, пируватдекарбоксилаза катализует отщепление CO_2 от пирувата:

$$\underset{\text{Пируват}}{CH_3COCOOH} \longrightarrow \underset{\text{Ацетальдегид}}{CH_3COH} + CO_2$$

К лиазам относится также фермент альдолаза, расщепляющий шестиуглеродную молекулу фруктозо-1,6-бисфосфата на два трехуглеродных соединения.

5. Изомеразы. Участвуют в превращении органических соединений в их изомеры. При изомеризации происходит внутримолекулярное перемещение атомов, атомных группировок, различных радикалов и т. п. Изомеризации подвергаются углеводы и их производные, органические кислоты, аминокислоты и т. д. К данной группе относятся триозофосфатизомераза, глюкозофосфатизомераза и др.

6. Лигазы. Катализируют синтез сложных органических соединений из простых. Например, аспарагинсинтетаза управляет синтезом амида аспарагина из аспарагиновой кислоты и аммиака с обязательным участием АТФ, дающей энергию для этой реакции:

$$\text{Аспарагиновая кислота} + NH_3 + \text{АТФ} \longrightarrow \text{Аспарагин} + \text{АДФ} + H_3PO_4$$

К группе лигаз относят карбоксилазы, катализующие присоединение CO_2 к различным органическим кислотам. Например, фермент пируваткарбоксилаза катализует синтез оксалоацетата из пирувата и CO_2.

В соответствии со строением ферменты делят на два больших класса: простые белки и сложные белки. К первому классу относят гидролитические ферменты, ко второму, более многочисленному, — ферменты, управляющие окислением и участвующие в реакциях переноса различных химических групп. Ферменты второго класса кроме белковой части, называемой *апоферментом,* имеют небелковую группу, определяющую активность фермента, — *кофактор.* В отдельности белковая и небелковая части лишены ферментативной активности. Они приобретают свойства ферментов после соединения. Комплекс апофермента с кофактором называют *голоферментом.*

Кофакторами могут быть ионы металла (Fe, Cu, Co, Zn, Mo и др.), сложные органические соединения (называемые коферментами) либо те и другие вместе. Коферменты обычно играют роль промежуточных переносчиков электронов, атомов, групп, которые в результате ферментной реакции перемещаются с одного соединения на другое. Кофермент, прочно связанный с ферментным белком, называют *простетической группой* фермента. Многие коферменты идентичны определенным витаминам группы В или представляют собой их производные.

К коферментам относят, например, активные группы дегидрогеназ — никотинамидадениндинуклеотид (НАД) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). В перечисленные коферменты входит никотиновая кислота (витамин группы В). Витамины есть в составе и других коферментов: тиамин (витамин B_1) в составе тиаминпирофосфокиназы, участвующей в обмене пирувата; пантотеновая кислота — в составе кофермента А; рибофлавин (витамин B_2) представляет собой простетическую группу флавопротеиновых ферментов. Значение витаминов в питании живых организмов обусловлено как раз тем, что они входят в состав коферментов.

По современным представлениям, ферменты ускоряют химические реакции, понижая свободную *энергию активации* (количество энергии, необходимое для перевода при данной температуре всех молекул одного моля вещества в активированное состояние).

Ферменты обладают следующими основными свойствами: увеличивают скорость реакции, но сами в данной реакции не расходуются; их присутствие не влияет ни на природу, ни на свойства конечного продукта (продуктов) реакции; очень незначительное количество фермента вызывает превращение больших количеств субстрата; активность ферментов определяется реакцией среды, температурой, давлением и концентрацией как субстрата, так и самого фермента; для каждого фермента характерен свой оптимум температуры и реакции среды.

Многие ферментативные реакции обратимы, хотя активность фермента редко бывает одинаковой в обоих направлениях.

Обычно ферментативная реакция начинается со связывания ферментом определенного субстрата. Как правило, фермент взаимодействует только с одним субстратом и катализует его трансформацию в другой субстрат до установления равновесия. Следовательно, каждый фермент характеризуется субстратной специфичностью (т. е. взаимодействует только с одним субстратом и продуктом его трансформации) и специфичностью действия (катализируют только одну из многочисленных реакций, которым может подвергнуться данный субстрат).

В связи с высокой специфичностью ферментативных реакций полагают, что участок молекулы фермента, называемый *каталитическим центром,* к которому присоединяется молекула субстрата, обладает специфичной пространственной конфигурацией, которая «впору» лишь «своей» молекуле субстрата и не соответствует никаким другим молекулам.

Несмотря на незначительные размеры, каждая клетка микроорганизма может производить множество разнообразных ферментов с различными функциями. Обычно ферменты, участвующие в метаболизме, содержатся в клетке организма и поэтому называются внутриклеточными ферментами, или *эндоферментами.* Отдельные фер-

менты выделяются клетками микроорганизмов в окружающую среду и называются внеклеточными ферментами, или *экзоферментами*. Как правило, во внешнюю среду выделяются гидролитические ферменты, разлагающие соединения большой молекулярной массы, которые не могут проникнуть в клетку микроорганизма. Продукты же разложения легко поглощаются клеткой и используются ею в качестве питательных веществ. В разнообразии ферментов, позволяющих микроорганизмам усваивать соединения различной химической природы, заключается огромная роль микрофлоры в круговороте веществ в природе.

Получение энергии. Клетка любого организма запасает энергию в форме соединений, обладающих так называемыми *макроэргическими связями*. При гидролитическом расщеплении макроэргических связей энергия освобождается и может быть использована для биосинтетических реакций. Аккумуляторами и переносчиками энергии служит ряд соединений: аденозинтрифосфат (АТФ), аденозиндифосфат (АДФ), цитозинтрифосфат (ЦТФ), уридинтрифосфат (УТФ), гуанозинтрифосфат (ГТФ), креатинфосфат, ацетилфосфат и другие соединения. Важнейшим переносчиком энергии является АТФ.

Образование АТФ идет с расходом энергии, поэтому эта реакция происходит только сопряженно с энергетически полезными реакциями. Так, АТФ образуется в результате фотосинтетического фосфорилирования, окислительного фосфорилирования (фосфорилирование в дыхательной цепи) и фосфорилирования на уровне субстрата, т. е. фотосинтеза, дыхания и брожения, которые будут рассмотрены ниже.

Энергетически богатые связи (макроэргические фосфатные связи) обозначают символом $\sim PO_4$. Отщепление концевого фосфата сопровождается выделением $3{,}4 \cdot 10^4$ — $5{,}0 \cdot 10^4$ Дж вместо $1{,}3 \cdot 10^4$ Дж, как при разрыве обычных химических связей.

Следовательно, образование соединений с макроэргическими связями составляет основной механизм, благодаря которому в клетках микроорганизмов запасается и сохраняется некоторое количество энергии, расходуемое по мере надобности для биосинтеза, а также для механического движения и осморегуляции. Следовательно, АТФ представляет собой универсальный переносчик химической энергии между реакциями, поставляющими энергию, и реакциями, потребляющими ее.

Окисление и восстановление органических соединений (биологическое окисление) начали изучать в 1780 г., когда французский ученый *А. Л. Лавуазье* обнаружил, что животные поглощают кислород из воздуха и выделяют CO_2. Процесс биологического окисления назвали *дыханием*. Оно свойственно и высшим растениям. Под понятием «окисление» в то время подразумевали процесс соединения вещества с кислородом, а под понятием «восстановление» — процесс отщепления кислорода от вещества.

Сейчас окисление представляют как процесс отнятия от вещества двух атомов водорода, что равносильно удалению двух электронов и двух протонов. Поэтому процесс теперь носит название *дегидрирования*. В противоположность ему восстановление того или иного соединения представляет собой присоединение двух атомов водорода или двух электронов и двух протонов. Последний процесс называют *гидрированием*.

Окисление может быть представлено следующим образом:

$$AH_2 \longrightarrow A + 2H$$

$$B + 2H \longrightarrow BH_2$$

Суммарная реакция показывает окисление AH_2 при помощи В:

$$AH_2 + B \longrightarrow BH_2 + A$$

В этой реакции AH_2 — восстановитель, или донор водорода, В — окислитель, или акцептор водорода.

Понятие окисления применимо и к реакциям, связанным только с переносом электронов. Так, реакцию, при которой атомы или молекулы теряют электроны *(e^-),* называют *окислением,* обратный процесс — присоединение электронов — *восстановлением*. Например, превращение закисного железа в окисное происходит с потерей электрона и представляет собой реакцию окисления:

$$Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + e^-$$

Ни электроны, ни атомы водорода не могут накапливаться в среде как таковые. Они должны быть акцептированы каким-либо другим химическим соединением. Поэтому каждое окисление обязательно сопровождается восстановлением.

Переносчиками водорода в реакциях биологического окисления и восстановления служат главным образом два пиридиновых нуклеотида (коферменты анаэробных дегидрогеназ) — никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Отнимая водород от окисляемого субстрата, эти соединения переходят в восстановленную форму ($НАД \cdot H_2$ и $НАДФ.H_2$) и переносят водород на другой акцептор. $НАД \cdot H_2$ передает водород главным образом на промежуточные продукты брожения или в дыхательную цепь, $НАДФ.H_2$ чаще участвует в реакциях биосинтеза клетки.

7.2. Брожение

Брожение — окислительно-восстановительный процесс, приводящий к образованию АТФ, в котором окислителем и восстановителем служат органические соединения, образующиеся в ходе самого брожения.

При брожении субстрат разлагается до конечных продуктов, причем суммарная степень окисления продуктов та же, что и степень окисления сбраживаемых веществ. Необходимость точного окислительно-восстановительного равновесия обусловливает ограничение соединений, которые могут подвергаться брожению: такие соединения не должны быть ни слишком сильно восстановленными, ни слишком сильно окисленными. Чаще всего при брожении микроорганизмы используют углеводы, некоторые органические кислоты, аминокислоты, пурины и пиримидины. Образование АТФ во время брожения идет путем фосфорилирования на уровне субстрата.

Брожение вызывают облигатные или факультативные анаэробы, и оно, как правило, может осуществляться только в строго анаэробных условиях. Как установил в 1860 г. Л. Пастер, *брожение — это жизнь без кислорода*. Согласно современным представлениям, живые организмы возникли в то время, когда кислорода в атмосфере Земли не было. Поэтому брожение необходимо рассматривать как простейшую форму биологического окисления, которое обеспечивает получение необходимой для жизни энергии в анаэробных условиях.

Известно много типов брожения. Каждый из них дает специфические конечные продукты и свойствен отдельной группе микроорганизмов. Многие виды брожения играют важную роль в хозяйственной деятельности человека.

Брожение схематично можно представить в две стадии. Первая стадия — превращение глюкозы в пируват — включает разрыв углеродной цепи глюкозы и отщепление двух пар атомов водорода. Данная стадия составляет окислительную часть брожения и может быть изображена следующим образом:

$$\underset{\text{Углевод}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{Пируват}}{2CH_3COCOOH} + \underset{\text{Водород (принимаемый акцептором, например НАД)}}{[4H]}$$

На второй, восстановительной, стадии атомы водорода используются для восстановления пирувата или образованных из него соединений. Например, при молочнокислом брожении пируват восстанавливается в лактат:

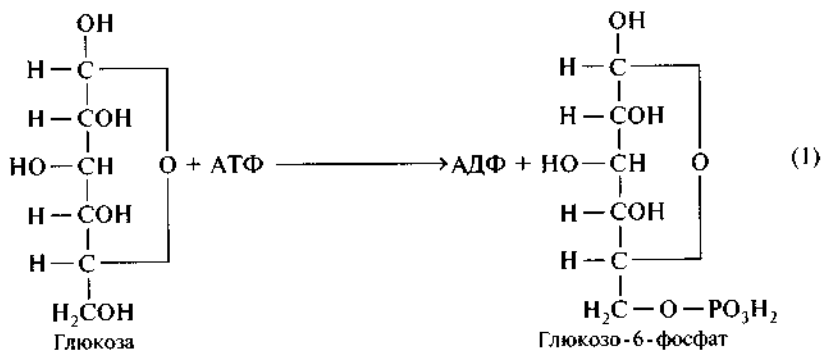
$$\underset{\text{Пируват}}{2CH_3COCOOH} + \underset{\text{Водород}}{[4H]} \longrightarrow \underset{\text{Лактат}}{2CH_3CHOHCOOH}$$

При других бродильных процессах (спиртовом, маслянокислом и т. т.) вторая стадия протекает иначе (см. ниже).

Образование пирувата из углеводов совершается как серия последовательных реакций. Это катаболические реакции, общие для брожения и аэробного дыхания. У микроорганизмов известно три пути образования пирувата из углеводов. Первый путь сначала был обнаружен у дрожжей и в мышцах животных, затем у бактерий;

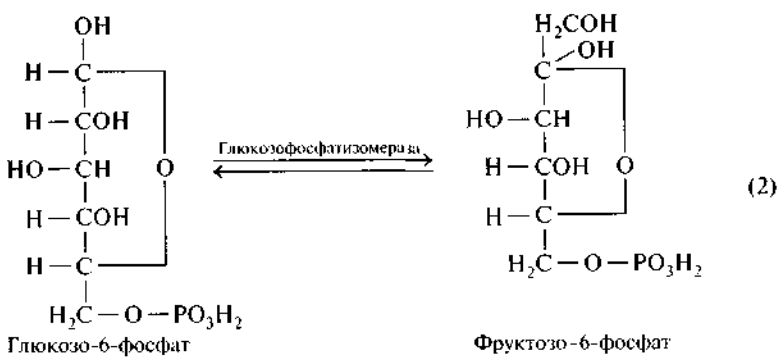
он присущ облигатным и факультативным анаэробам. Этот путь известен как *«путь Эмбдена—Мейергофа—Парнаса»,* или «фруктозобисфосфатный путь»; его называют также *гликолизом.* Второй путь известен как окислительный *пентозофосфатный,* или гексозомонофосфатный, или *«схема Варбурга—Диккенса—Хореккера»;* осуществляется у многих микроорганизмов, как прокариот, так и эукариот. Третий путь называют *«путь Энтнера—Дудорова»,* или «КДФГ-путь» (2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконат-путь); найден только у отдельных групп микроорганизмов, в основном у анаэробных бактерий.

Путь Эмбдена—Мейергофа—Парнаса, или гликолиз. Представляет собой ряд реакций, каждую из которых катализует специфический фермент. Гликолитические реакции в микробной клетке начинаются с фосфорилирования глюкозы (в форме фосфатов сахара более реакционноспособны). При этом происходит взаимодействие глюкозы с АТФ под влиянием фермента гексокиназы с образованием глюкозо-6-фосфата (фосфатная группа присоединяется к шестому атому углерода) и АДФ. От АТФ переносится только концевая фосфатная группа и остается аденозиндифосфат:



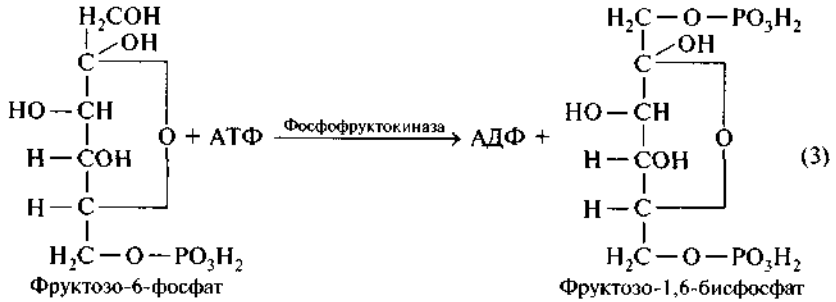
(1)

Глюкозо-6-фосфат под влиянием фермента глюкозофосфатизомеразы превращается во фруктозо-6-фосфат:



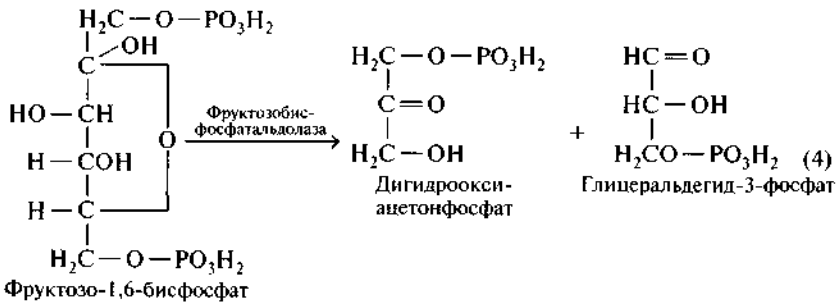
(2)

На первый атом углерода, образовавшегося фруктозо-6-фосфата, при помощи фермента фосфофруктокиназы переносится от АТФ вторая фосфатная группа (снова фосфорилирование). Образуется фруктозо-1,6-бисфосфат (фруктоза с фосфатными группами при первом и шестом атомах углерода):



(3)

На следующем этапе происходит разрыв фруктозо-1,6-бисфосфата при участии фермента фруктозобисфосфатальдолазы на два трехуглеродных сахара: глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат, которые могут превращаться друг в друга под действием фермента триозофосфатизомеразы:

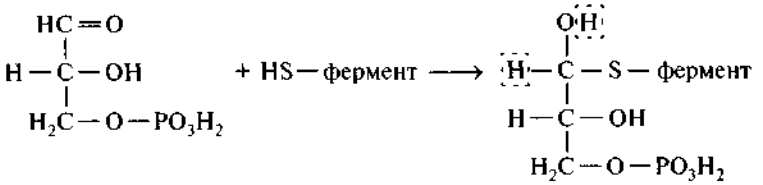


(4)

В связи с тем что дигидроксиацетонфосфат подвергается превращению в глицеральдегид-3-фосфат, в последующих реакциях участвуют две молекулы глицеральдегид-3-фосфата.

В дальнейшем происходит окисление глицеральдегид-3-фосфата, катализуемое ферментом глицеральдегидфосфатдегидрогеназой. Данный фермент представляет собой белок с необычно высоким содержанием активных сульфгидрильных групп (SH) и связан с коферментом ($НАД^+$). Вначале осуществляется связывание альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата с SH-группой глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. При этом образуется группировка

, способная отдавать водород молекуле НАД:



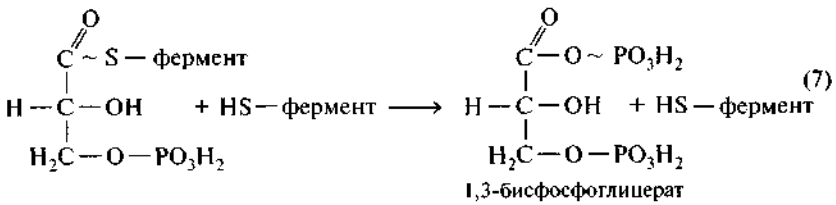
(5)

Затем наблюдается дегидрирование глицеральдегид-3-фосфата, когда два атома водорода отщепляются от его молекулы и переносятся на связанный с ферментом НАД:

(6)

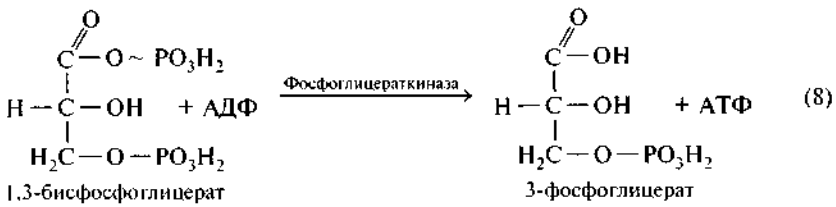
Дегидрирование глицеральдегид-3-фосфата — окислительная реакция, сопровождающаяся выделением энергии.

Далее происходит перенос глицеральдегид-3-фосфата вместе с макроэргической связью на фосфорную кислоту, в результате чего образуется 1,3-бисфосфоглицерат с макроэргической связью и свободный HS-фермент:



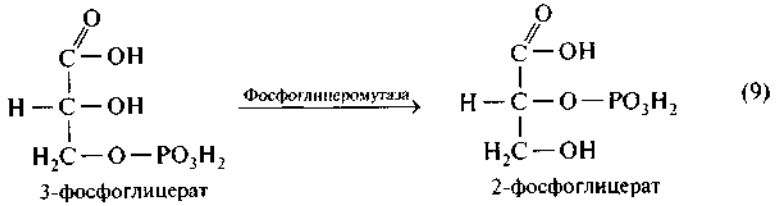
(7)

Фосфатная группа при первом углеродном атоме в цепи присоединена макроэргической связью и может под действием фосфоглицераткиназы взаимодействовать с АДФ с образованием АТФ:



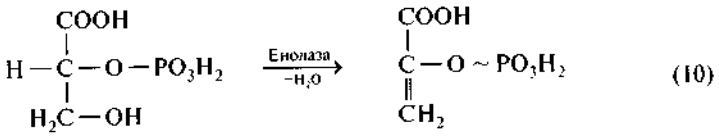
(8)

Следовательно, на данном этапе осуществляется фосфорилирование на уровне субстрата. Затем 3-фосфоглицерат подвергается перестройке под влиянием фосфоглицеромутазы и изомеризуется в 2-фосфоглицерат:



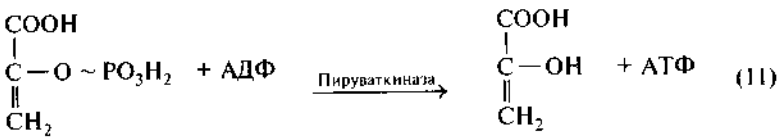
3-фосфоглицерат — 2-фосфоглицерат (9)

При отщеплении молекулы воды (дегидратации) с участием фермента енолазы из 2-фосфоглицерата образуется фосфоенолпируват, обладающий макроэргической связью:



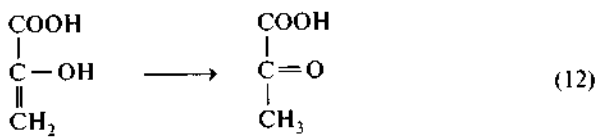
2-фосфоглицерат — Фосфоенолпируват (10)

Фосфоенолпируват под влиянием пируваткиназы отдает фосфатную группу и запас энергии молекуле АДФ с образованием АТФ и енолпирувата:



Фосфоенолпируват — Енолпируват (11)

Так при превращении глюкозы в пируват формируется вторая макроэргическая фосфатная связь. Енолпируват самопроизвольно превращается в более устойчивую форму — пируват:



Енолпируват — Пируват (12)

При гликолизе атомы водорода, освобождающиеся при сбраживании углевода, не попадают непосредственно на конечный акцептор, а переносятся на НАД; всего образуются две молекулы НАД $.H_2$. Поскольку НАД присутствует в клетке в очень небольших количествах, брожение может продолжаться, если восстановленный НАД.H_2 снова окисляется. Последнее происходит во второй стадии брожения, в которой восстановленный НАД. H_2 переносит атом водорода к конечному акцептору водорода.

При трансформации глюкозы в пировиноградную кислоту по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса выделяется свободная энергия, достаточная для образования четырех молекул АТФ: двух при окислении глицеральдегид-3-фосфата и еще двух при дегидратировании 2-фосфоглицерата. Однако две из них требуются для превращения глюкозы в фруктозо-1,6-бисфосфат, и только две молекулы АТФ поставляют энергию для процессов синтеза.

Баланс гликолиза можно записать следующим образом:

Глюкоза —> *2* Пируват + 2АТФ + 2НАД • H_2

Максимальное количество энергии, которое получает организм в результате гликолиза, составляет 2.10^5 Дж. Поскольку в расчете на каждую молекулу глюкозы при гликолизе образуются только две молекулы АТФ, микроорганизмы в анаэробных условиях вынуждены сбраживать очень большие количества сахара, чтобы обеспечить себя необходимой энергией для биосинтетических процессов. Вся ферментная система гликолиза локализируется в цитоплазме клетки.

Пентозофосфатный путь отличается от пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса тем, что не приводит непосредственно к образованию пирувата. В ходе пентозофосфатного пути происходит окисление только одного из углеродных атомов субстрата, который освобождается в форме CO_2. Первая реакция представляет собой фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата с последующим дегидрированием, сопряженным с восстановлением НАДФ и образованием 6-фосфоглюконолактона.

Затем 6-фосфоглюконолактон при участии фермента глюконолактоназы гидролизуется до 6-фосфоглюконата. Данное соединение дегидрируется дегидрогеназой до 3-кето-6-фосфоглюконата, из которого путем декарбоксилирования образуется пентозофосфат и рибулозо-5-фосфат. Из последнего при изомеризации образуется ксилулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат. В дальнейшем образовавшиеся рибозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат включаются в ряд транскетолазных реакций (перенос ферментом транскетолазой глицеральдегидной группы $CH_2OH—CO—$) и трансальдолазных реакций (перенос ферментом трансальдолазой трехуглеродной дигидроксиацетоновой группы $CH_2OH—CO—CHOH—$) и снова превращаются в глюкозо-6-фосфат. Следовательно, пентозофосфатный путь циклически. Считают, однако, что пентозофосфатный путь на одном из этапов обычно переходит в путь Эмбдена—Мейергофа—Парнаса.

При прохождении через пентозофосфатный цикл каждых шести молекул глюкозы происходит полное окисление одной молекулы глюкозо-6-фосфата до CO_2 и восстановление шести молекул $НАДФ^+$ до НАДФ.H_2.

Основное назначение пентозофосфатного пути — поставлять пентозы (главным образом рибозо-5-фосфат), необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, и обеспечивать образование большей части НАДФ.H_2, необходимого для синтеза жирных кислот, стероидов и т. д.

Превращение глюкозы в пировиноградную кислоту может также проходить по **пути Энтнера—Дудорова.** При этом глюкоза фосфорилируется молекулой АТФ при участии фермента гексокиназы. Продукт фосфорилирования — глюкозо-6-фосфат — дегидрируется до 6-фосфоглкжоната. Под действием фермента фосфоглюконатдегидрогеназы от него отнимается вода и образуется 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконат (КДФГ). Последний расщепляется специфичной альдолазой на пируват и глицеральдагид-3-фосфат.

Глицеральдегид далее подвергается действию ферментов пути Эмбдена—Майергофа—Парнаса и трансформируется во вторую молекулу пирувата.

При расщеплении глюкозы по пути Энтнера—Дудорова образуется одна молекула АТФ и две молекулы НАД.H_2. У бактерий, расщепляющих глюкозу таким путем, отсутствуют ферменты, необходимые для образования из пирувата лактата и других кислот.

Промежуточным продуктом преобразования сахара по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса служит пируват. В дальнейшем в серии последовательных реакций он претерпевает превращения, характер которых зависит от ферментных особенностей того или иного возбудителя брожения.

Можно привести примеры, поясняющие это. Выше было указано, что при молочнокислом брожении, вызываемом некоторыми бактериями, пируват восстанавливается в лактат. Транспорт водорода осуществляется в данном случае восстановленным НАД:

$$\underset{\text{Пируват}}{CH_3COCOOH} + 2H + 2e^- = \underset{\text{Лактат}}{CH_3CHOHCOOH}$$

Если пируват образуется при превращениях по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса, лактат будет единственным продуктом брожения, суммарная реакция брожения:

$$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCOOH$$

В приведенных примерах пируват служит только акцептором атомов водорода, выделяющихся при окислении глицеральдегид-3-фосфата (реакция 6).

При спиртовом брожении, вызываемом дрожжами и протекающем по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса, сахар превращается в этанол и диоксид углерода. Клетки дрожжей содержат пируватдекарбоксилазу, которая катализирует следующую реакцию:

$$CH_3COCOOH = CH_3COH + CO_2$$

Этанол получается при восстановлении ацетальдегида НАД • H_2, образовавшегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата. Другими словами, при данном виде брожения ацетальдегид служит конечным акцептором водорода:

$$CH_3COH + 2H^+ + 2e^- = CH_3CH_2OH$$

Общее уравнение спиртового брожения может быть представлено в следующем виде:

$$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

Молочнокислое и спиртовое брожения — широко распространенные бродильные процессы. Существуют и другие типы брожений, различающиеся составом конечных продуктов, среди которых могут быть различные органические кислоты, спирты, CO_2 и газообразный водород. На второй стадии некоторых типов брожения образуется свободная энергия, что увеличивает запас АТФ в клетке.

7.3. Дыхание

Дыхание — окислительно-восстановительный процесс, идущий с образованием АТФ; роль доноров водорода (электронов) в нем играют органические или неорганические соединения, акцепторами водорода (электронов) в большинстве случаев служат неорганические соединения. Как уже отмечалось, если конечный акцепор электронов — молекулярный кислород, дыхательный процесс называют *аэробным дыханием*. У некоторых микроорганизмов конечным акцептором электронов служит не молекулярный кислород, а иные соединения, такие, как нитраты, сульфаты и карбонаты. В таком случае говорят об *анаэробном дыхании*.

Аэробное дыхание. Оно присуще многим микроорганизмам. Однако есть как строгие аэробы, так и факультативные анаэробы, способные расти и в присутствии и при отсутствии кислорода. У факультативных анаэробов возможен синтез АТФ при брожении, а в присутствии молекулярного кислорода способ получения АТФ у них меняется — начинает осуществляться дыхание. К факультативным анаэробам относятся также микроорганизмы, у которых анаэробное дыхание происходит при использовании нитратов как акцепторов электронов. Микроорганизмы, осуществляющие анаэробное дыхание, при котором акцепторами электронов служат сульфаты и карбонаты, — строгие анаэробы. Считают, что микроорганизмы могут использовать в дыхательном процессе любые природные органические соединения, однако степень окисления этих веществ должна быть меньше, чем степень окисления CO_2.

В процессе аэробного дыхания выделяют две фазы. Первая включает серию реакций, благодаря которым органический субстрат окисляется до CO_2, а освобождающиеся атомы водорода перемещаются к акцепторам. Данная фаза состоит из цикла реакций гликолиза, приводящих к образованию пирувата, и цикла реакций, известного под названием цикла Кребса, или цикла трикарбоновых кислот **(ЦТК).** Вторая фаза представляет окисление освобождающихся атомов водорода кислородом с образованием **АТФ.** Обе фазы совместно ведут к окислению субстрата до CO_2 и H_2O и образованию биологически полезной энергии в виде АТФ и др.

Цикл Кребса. В цепи реакций, входящих в цикл Кребса (рис. 31), первичный распад углевода (гликолиз) идет как при брожении, но образовавшийся пируват подвергается иным превращениям. При участии мультиферментного комплекса пируватдегид-

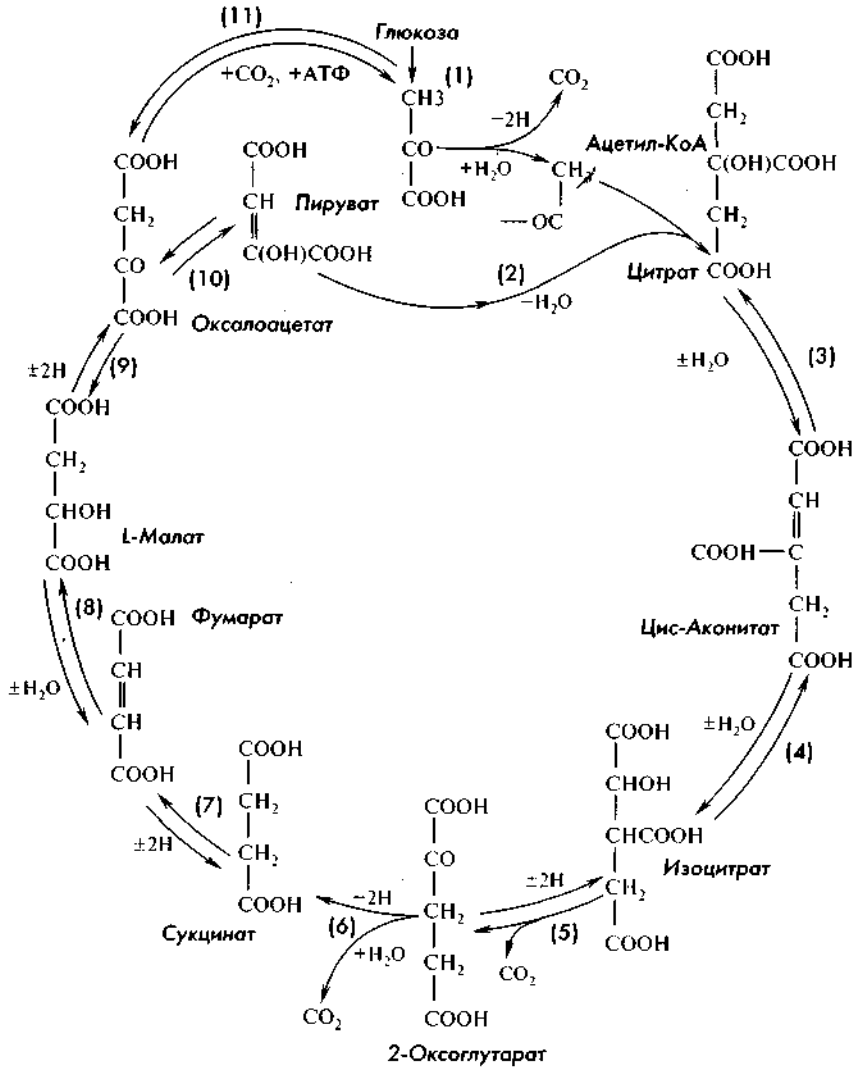


Рис. 31. Цикл Кребса (по: В. Л. Кретович):
(I), (6) — система окислительного декарбоксилирования; (2) — иитратсинтаза; кофермент А; (3), (4) — акоиитатгидратаза; (5) — изоцитратдегидрогеназа; (7) — сукцинатдегидрогеназа; (8) — фумаратгидратаза; (9) — малатдегидрогеназа; (10) — спонтанное превращение; (11) — пирубаткарбоксилаза

рогеназы происходит декарбоксилирование образовавшегося при гликолизе пирувата до ацетальдегида или ацетата.

Последний соединяется с коферментом одного из окислительных ферментов — коферментом А (KoA-SH), образуя ацетил-KoA. Под действием фермента цитратсинтазы двууглеродный ацетил-KoA (CH_3—CO—KoA) реагирует с молекулой оксалоацетата, содержащей четыре атома углерода, в результате образуется соединение с шестью атомами углерода — цитрат:

$$CH_3COCOOH + H_2O = CO_2 + CH_3COOH + 2H^+ + 2e^-$$
$$CH_3COOH + COOHCOCH_2COOH = COOHCH_2COHCOOHCH_2COOH$$

Цитрат под влиянием фермента аконитатгидратазы теряет молекулу воды и превращается в цис-аконитат, который под действием того же фермента присоединяет H_2O и превращается в изоцитрат.

При воздействии изоцитратдегидрогеназы, активной группой которой служит НАДФ, от изоцитрата отщепляются два атома водорода, в результате чего он превращается в оксалосукцинат. От последнего, в свою очередь, под действием фермента декарбоксилазы отщепляется молекула диоксида углерода. В образовавшемся 2-оксоглутарате число атомов углерода равно пяти.

Под влиянием ферментного комплекса *а*-кетоглутаратдегидрогеназы с активной группой НАД 2-оксоглутарат превращается в сукцинат, теряя CO_2 и два атома водорода. Затем следуют реакции окисления сукцината в фумарат при участии фермента сукцинатдегидрогеназы с активной группой ФАД, превращения фумарата в L-малат при участии фумаратгидратазы (фумаразы), окисления L-малата в оксалоацетат, катализуемого малатдегидрогеназой с активной группой НАД.

Перечисленные превращения сопровождаются отщеплением двух пар атомов водорода. Оксалоацетат взаимодействует с коферментом А, и цикл повторяется снова. Каждая из десяти реакций цикла трикарбоновых кислот, за исключением одной, легко обратима. Углеродные атомы ацетил-KoA освобождаются в виде двух молекул CO_2. В реакциях ферментного дегидрирования атомы водорода удаляются четырьмя разными дегидрогеназами.

В трех из четырех указанных реакций окисления атомы водорода присоединяются к $НАД^+$ (или $НАДФ^+$), и лишь в случае сукцинатдегидрогеназы они непосредственно переносятся на флавинадениндинуклеотид (ФАД). Образуется также одна молекула АТФ. В ходе описанных реакций в трансформируемые соединения может включаться вода. Ферменты ЦТК располагаются в цитоплазматической мембране микроорганизмов. Суммарную реакцию цикла трикарбоновых кислот можно представить в виде уравнения:

$$CH_3COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + [8H^+]$$

В цикле трикарбоновых кислот образуется ряд промежуточных продуктов, играющих роль предшественников для реакций биосинтеза макромолекул микробной клетки. Поэтому большинство ферментов цикла Кребса есть и у облигатных анаэробов (некоторые из них не имеют только фермента, катализующего трансформацию

2-оксоглутарата в сукцинат). В цикл Кребса вовлекаются и продукты катаболизма жирных кислот и некоторых аминокислот.

Следовательно, цикл трикарбоновых кислот имеет большое значение не только для дыхания, но и для биосинтеза. В соответствии с ним идут превращения, в которых все источники углерода используются для синтеза необходимых микроорганизмам соединений. В этом состоит биологический смысл цикла Кребса, продукты превращения которого легко трансформируются в аминокислоты, белки, жиры, углеводы и т. д. и становятся частью структуры клетки.

У отдельных микроорганизмов, усваивающих простые источники углерода, например ацетат, встречается модифицированная форма ЦТК, известная под названием *глиоксилатного цикла* (открыт *Корнбергом* и *Кребсом* в 1957 г.).

Дыхательная цепь переноса электронов. При всех реакциях дегидрирования в цикле Кребса атомы водорода, отщепляющиеся при участии специфических дегидрогеназ, акцептируются коферментами НАД и НАДФ, затем переносятся по цепи переносчиков. Однако фактически осуществляется перенос как атомов водорода, так и электронов. Ядра атомов водорода свободно перемещаются по растворителю в виде протонов. Такую систему транспорта электронов и протонов называют *дыхательной,* или ***электронтранспортной,*** *цепью.* Цепь переноса водорода и электронов содержит *переносчики* — молекулы различных групп, представляющие собой окислительно-восстановительные ферменты — флавопротеиды, хиноны и цитохромы.

Простатическими группами *флавопротеидов* служат флавинадениндинуклеотид (ФАД) или флавинмононуклеотид (ФМН). Флавопротеиды передают атомы водорода от восстановленных пиримидиновых нуклеотидов к последующим переносчикам дыхательной цепи. *Хиноны* (более распространен *убихинон* или *кофермент Q)* представляют собой небелковые переносчики небольшой молекулярной массы; они способны переносить водород или электроны и представляют собой промежуточные компоненты между флавопротеидами и цитохромами.

Цитохромы — белки относительно небольшой молекулярной массы. Простетическая группа цитохромов — гем. Данные ферменты переносят не водородные атомы, а электроны. Известны цитохромы *a, a_3 ,b , c, d* и ряд других. В цитохромах роль переносящего электроны компонента играет железо гема. Обычно железо гема находится в окисленной форме (Fe^{3+}), но после присоединения электрона оно переходит в восстановленную форму.

Каждый атом водорода, поступающий от кофермента *Q,* распадается на ион водорода и электрон: $H \longrightarrow H^+ + e^-$. Электрон, в свою очередь, присоединяется к иону железа: $Fe^{3+} + e^- \longrightarrow Fe^{2+}$.

Ионы водорода поступают в раствор, они используются позднее в конце дыхательной цепи. Электрон от цитохрома *b* переходит к цитохрому *c* и затем к цитохрому *aa_3 ,* называемому цитохромоксидазой. Цитохромоксидаза содержит помимо железа еще и медь и представляет собой конечную оксидазу, которая реагирует с кислородом и передает ему электроны:

$$O_2 + 4Fe^{2+} \longrightarrow 2O^{2-} + 4Fe^{3+}$$

В итоге такого необратимого конечного окисления вся цепь переносчиков электронов переходит в окисленное состояние, а молекулярный кислород восстанавливается до H_2O. При переносе атомов водорода и электронов на отдельных участках дыхательной цепи выделяется значительное количество свободной энергии. Чтобы закрепить освобождающуюся энергию, в микробной клетке существует механизм, объединяющий в единый процесс выделение энергии и образование богатых энергией фосфатных связей АТФ. Процесс называют **окислительным фосфорилированием.** Наличие окислительного фосфорилирования, т. е. фосфорилирования, сопряженного с функционированием цепи переноса электронов, является важнейшим отличием процессов дыхания от брожения, при котором фосфорилирование осуществляется только на уровне субстрата.

Известны три участка в дыхательной цепи, где осуществляется сопряжение окисления и фосфорилирования — от НАД до ФАД; от цитохрома *b* до цитохрома с,; от цитохрома *a* до цитохрома *aa_3* (рис. 32). Дыхательная цепь у прокариотов локализована в цитоплазматической мембране. Считают, что при транспорте электронов происходит вывод ионов H^+ через мембрану в наружную среду. В результате между наружной и внутренней сторонами мембраны создается градиент концентрации ионов H^+ — трансмембранный электрохимический градиент, или протонный потенциал, энергия которого идет на синтез АТФ. Данный синтез катализуется ферментом АТФ-синтазой, обусловливающим сопряжение процесса переноса водорода и электронов в дыхательной цепи с фосфорилированием.

Все аэробные и факультативно анаэробные бактерии имеют дыхательную цепь. Причем ферменты, катализующие процессы переноса электронов в этой цепи и окислительного фосфорилирования, локализованы в цитоплазматической мембране.

Многие из анаэробных микроорганизмов не имеют цепи переноса электронов. Поэтому в присутствии кислорода воздуха в среде происходит непосредственный транспорт водорода флавиновыми дегидрогеназами (ФАД) на кислород, что приводит к образованию перекиси водорода H_2O_2. Перекись водорода чрезвычайно токсична. Удалить ее могут два фермента — каталаза и пероксидаза, однако у анаэробных бактерий они, как правило, отсутствуют. Таким обра-

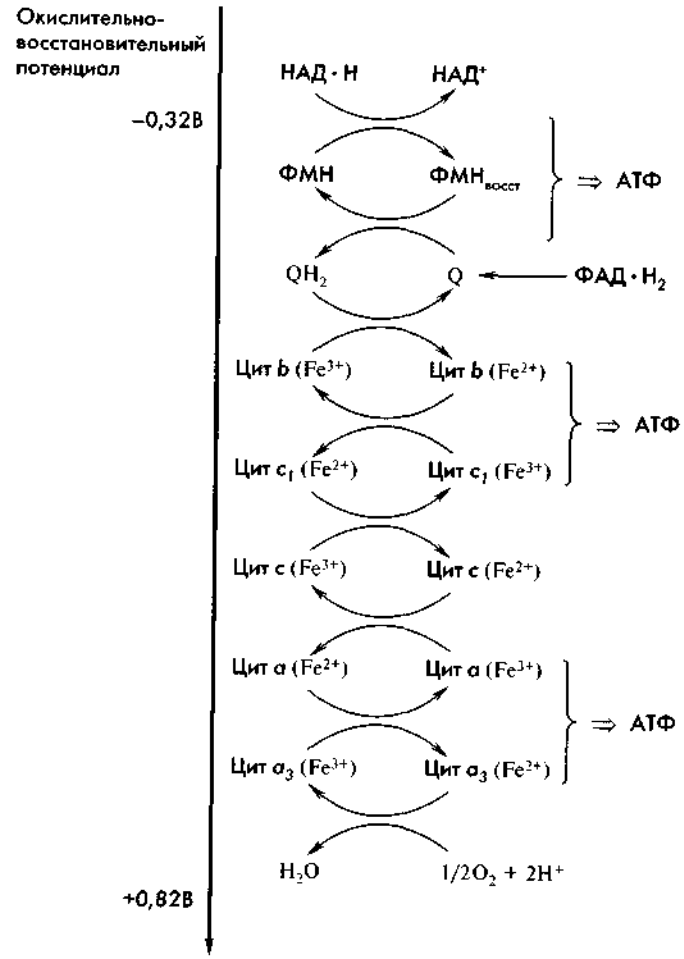


Рис. 32. Дыхательная цепь переноса электронов в митохондриях

зом, одна из причин токсичного действия кислорода на анаэробные микроорганизмы — образование и аккумуляция перекиси водорода в их клетках в летальных дозах.

В результате окислительного фосфорилирования большая часть энергии пирувата становится доступной для микроорганизмов. Суммарно полное окисление глюкозы можно выразить следующим уравнением:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6H_2O + 6CO_2 + 28{,}8.10^5 \text{ Дж}$$

Рассмотрим выход энергии при дыхании. Полное окисление одного моля (180 г) глюкозы дает 38 молей АТФ. Каждая связь АТФ равна приблизительно 3,4. 10^4 Дж, а 38 молекул АТФ дают 12,9- 10^5 Дж. При сжигании одного моля глюкозы в калориметре выделяется в виде тепла около $28{,}8.10^5$ Дж. Превращение глюкозы в клетках микроорганизмов в форму, пригодную для использования (АТФ), сопровождается выделением $12{,}9.10^5$ Дж, или 44,1% всей энергии. Следовательно, более 50% энергии, заключенной в глюкозе, рассеивается в виде тепла.

В отличие от дыхания брожение — процесс, при котором отщепляемые от органического вещества электроны передаются на органические же соединения. При брожении роль акцептора электронов играет обычно какое-нибудь органическое соединение, образующееся в ходе процесса. Одновременно высвобождается лишь очень незначительная часть той химической энергии, которая потенциально заключена в энергии связей молекулы глюкозы и освобождается при полном окислении ее до CO_2 и H_2O. В этом легко убедиться, сравнив количество выделившейся свободной энергии при анаэробном расщеплении глюкозы до лактата и при окислении ее до CO_2 и H_2O:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 2{,}0 \cdot 10^5 \text{Дж}$$
$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 28{,}8 \cdot 10^5 \text{ Дж}$$

Продукты брожения глюкозы в анаэробных условиях не могут быть использованы микробной клеткой, поэтому выводятся из нее. При этом они еще содержат значительную часть энергии, которая была заключена в молекуле глюкозы. Для получения того же количества энергии, которое выделяется при окислении глюкозы во время дыхания, в анаэробных условиях микроорганизмам приходится расходовать гораздо больше молекул глюкозы, чем в условиях аэробиоза.

Как было указано выше, хемолитоавтотрофные бактерии получают энергию в результате окисления неорганических соединений: H_2, NH_4^+, NO_2^-, Fe^{2+}, H_2S, S^0, SO_3^{2-}, $S_2O_3^-$, CO. В большинстве случаев эти бактерии имеют цепь переноса электронов, во многих отношениях сходную с соответствующей системой других аэробных микроорганизмов. Перенос электронов по данной цепи приводит к образованию АТФ.

Неполное окисление органических соединений. Дыхание обычно связано с полным окислением органического субстрата. Другими словами, конечные продукты распада, например углеводов, — только CO_2 и H_2O. Некоторые бактерии, в частности представители рода *Pseudomonas* и ряд грибов, не до конца окисляют углеводы. Образующиеся не полностью окисленные органические соединения, такие, как глюконовая, фумаровая, лимонная, молочная, уксусная кислоты и другие, аккумулируются в среде. Дыхание указанных организмов иногда неправильно называют аэробным, или окислительным, брожением, в то время как неполное окисление имеет гораздо меньше общего с брожением, чем с обычным дыханием. Неполное

окисление, например, протекает лишь в присутствии кислорода, а брожение кислорода не требует. С энергетической точки зрения неполное окисление — выгодный для микроорганизмов процесс.

Анаэробное дыхание. Как отмечалось в параграфе 7.1, некоторые микроорганизмы способны использовать для окисления органических или неорганических веществ не молекулярный кислород, а другие окисленные соединения, например соли азотной, серной и угольной кислот, превращающиеся при этом в более восстановленные соединения. Процессы идут в анаэробных условиях, и их называют ***анаэробным дыханием:***

$$2HNO_3 + 12H^+ \longrightarrow N_2 + 6H_2O + 2H^+$$
$$H_2SO_4 + 8H^+ \longrightarrow H_2S + 4H_2O$$

У микроорганизмов, осуществляющих такое дыхание, конечным акцептором электронов будет не кислород, а неорганические соединения — нитраты, сульфаты и карбонаты. Таким образом, различия между аэробным и анаэробным дыханием заключаются в природе конечного акцептора электронов.

Основные типы анаэробного дыхания приведены в таблице 2. Есть также данные об использовании бактериями в качестве акцепторов электронов Mn^{4+}, хроматов, хинонов и др.

Таблица 2

Типы анаэробного дыхания у прокариот (по: М. В. Гусев, Л. А. Минеева, 1992, с изменениями)

Энергетический процесс	Конечный акцептор электронов	Продукты восстановления
Нитратное дыхание и нитрификация	NO_3^-, NO_2^-	NO_2^-, NO, N_2O, N_2
Сульфатное и серное дыхание	SO_4^{2-}, S^0	H_2S
«Железное» дыхание	Fe^{3+}	Fe^{2+}
Карбонатное дыхание	CO_2	CH_4, ацетат
Фумаратное дыхание	Фумарат	Сукцинат

Свойство микроорганизмов переносить электроны на нитраты, сульфаты и карбонаты обеспечивает в достаточной степени полное окисление органического или неорганического вещества без использования молекулярного кислорода и обусловливает возможность получения большего количества энергии, чем при брожении. При анаэробном дыхании выход энергии только на 10% ниже, чем

при аэробном. Микроорганизмы, для которых характерно анаэробное дыхание, имеют набор ферментов электронтранспортной цепи, но цитохромоксидаза в них заменяется нитратредуктазой (при использовании в качестве акцептора электронов нитрата) или аденилсульфатредуктазой (при использовании сульфата) или другими ферментами.

Микроорганизмы, способные осуществлять анаэробное дыхание за счет нитратов, — факультативные анаэробы, они относятся главным образом к родам *Pseudomonas* и *Bacillus*. Микроорганизмы, использующие сульфаты в анаэробном дыхании, относятся к анаэробам и принадлежат к родам *Desulfovibrio, Desulfomonas* и *Desulfotomaculum*.

7.4. Фотосинтез

Некоторым группам микроорганизмов (цианобактериям, пурпурным и зеленым бактериям) свойствен *фотосинтез* — способ образования АТФ, при котором источником энергии служит свет.

У растений, водорослей и цианобактерий донором электронов при фотосинтезе бывает молекула воды, кислород которой выделяется в окружающую среду. Такой фотосинтез называют *кислородным,* или *оксигенным*.

В отличие от них пурпурные и зеленые фотосинтезирующие бактерии не способны использовать воду как донор электронов, их фотосинтез никогда не идет с образованием кислорода. Донорами электронов у таких бактерий служит H_2S, H_2 или органические соединения, а данный вид фотосинтеза называют *бескислородным,* или *аноксигенным*.

Главный акцептор электронов большинства фотосинтезирующих организмов — CO_2, однако они часто могут восстанавливать нитрат, азот, ионы водорода. Процесс фотосинтеза идет в две стадии. Во время первой под действием света происходит восстановление НАДФ и фосфорилирование АДФ, на второй энергия НАДФ • Н и АТФ используется для восстановления CO_2 до гексозы. Ассимиляция CO_2 высшими и низшими фотосинтезирующими организмами осуществляется через так называемый *пентозофосфатный восстановительный цикл,* или *цикл Кальвина*.

У фотосинтезирующих организмов АТФ образуется при переносе электрона, отданного молекулой хлорофилла (или бактериохлорофилла), при поглощении энергии света фотосинтетической пигментной системой. Процесс называют **фотофосфорилированием,** он аналогичен окислительному фосфорилированию аэробных микроорганизмов, т. е. АТФ образуется при транспорте электронов через цепь переноса.

Поскольку молекулярный кислород не участвует в реакциях образования АТФ ни в одном из типов фотосинтеза, любой его тип может протекать в строго анаэробных условиях. Однако жизнедеятельность растений, водорослей и цианобактерий, осуществляющих кислородный фотосинтез, происходит обычно в присутствии кислорода. Большинство организмов с бескислородным фотосинтезом — строгие анаэробы, у факультативных аэробов фотосинтетическое образование АТФ подавляется кислородом.

7.5. Биосинтез отдельных веществ микробной клетки

Катаболизм может идти разными путями, но всегда с образованием АТФ для обеспечения биосинтеза клетки. Основную часть органических веществ микроорганизмов составляют макромолекулы, относящиеся к четырем классам: нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и сложные липиды. Это полимеры низкомолекулярных органических соединений, называемых предшественниками.

Макромолекулы делят на классы в зависимости от того, какие низкомолекулярные органические соединения-предшественники полимеризуются при их синтезе: для нуклеиновых кислот — нуклеотиды, для белков — аминокислоты, для полисахаридов — моносахариды. Сложные липиды более разнообразны по своему составу — среди их предшественников есть жирные кислоты, многоатомные спирты, простые сахара, амины и аминокислоты. Согласно имеющимся данным, для образования макромолекул четырех главных классов требуется около 70 низкомолекулярных органических соединений-предшественников.

Кроме предшественников макромолекул, микробной клетке необходимо синтезировать около 20 коферментов и переносчиков электронов, играющих важную каталитическую роль. Считают, что для образования новой микробной клетки нужно примерно 150 небольших молекул различных органических соединений. Эти небольшие молекулы, в свою очередь, синтезируются из еще меньшего числа основных промежуточных веществ, образующихся в ходе катаболизма у хемоорганогетеротрофов или при использовании CO_2 хемолитоавтотрофами.

Наиболее важные промежуточные продукты — фосфорные эфиры Сахаров, пируват, ацетат, оксалоацетат, сукцинат, 2-оксоглутарат, рибоза и некоторые другие. Поставка промежуточных продуктов для биосинтеза аминокислот, углеводов и т. д. происходит главным образом при преобразованиях в цикле трикарбоновых кислот.

Биосинтез аминокислот и белков. Почти все микроорганизмы, за небольшим исключением, обладают способностью к синтезу всех аминокислот. Биосинтез аминокислот — первый этап биосинтеза белка — представляет собой яркий пример тесной связи катаболизма и биосинтеза. Предшественниками для биосинтеза аминокислот служат промежуточные продукты ЦТК и пентозофосфатного цикла. Так, при включении в цикл трикарбоновых кислот пируват, трансформируясь в оксалоацетат и 2-оксоглутарат, дает начало аспартату и глутамату, из которых впоследствии образуются аспарагин, глутамин, затем треонин, изолейцин, метионин, лизин, аргинин и пролин.

В результате конденсации промежуточных продуктов пентозофосфатного цикла (эритрозо-4-фосфата) и гликолиза (фосфоенолпирувата), а также последующей серии реакций образуются ароматические аминокислоты — тирозин, фенилаланин и триптофан.

Микроорганизмы могут построить из промежуточных продуктов катаболизма углеводов только углеродные скелеты аминокислот. На последних этапах их биосинтеза в молекулу промежуточного продукта вводится при реакции аминирования и переаминирования аминогруппа. Превращение неорганического азота в органический осуществляется через предварительное образование ионов аммония, которые затем включаются в состав органических веществ.

Ряд аминокислот (L-аланин, аспартат, глутамат и амид-L-глутамин) образуется при прямом аминировании; их называют первичными аминокислотами. Остальные аминокислоты, называемые вторичными, синтезируются путем переаминирования, т. е. в результате переноса аминогруппы от первичных аминокислот, служащих донорами, на соответствующие кетокислоты, образующиеся в ходе реакций катаболизма.

Аминокислоты, в свою очередь, идут на биосинтез белков клетки, специфичных для каждого вида микроорганизмов. Синтез белка заключается в образовании пептидной связи между свободными аминокислотами. Для этого необходима предварительная химическая активация аминокислот, требующая расхода энергии АТФ. Активация заключается в присоединении аминокислоты к ферменту-переносчику. Существует 20 таких ферментов, каждый из которых специализируется на активации определенной аминокислоты. Последующая полимеризация происходит вследствие переноса аминокислоты с фермента-переносчика на растущую белковую цепь. В клетке микроорганизма может синтезироваться несколько тысяч различных белков, каждый из которых содержит в среднем около 200 аминокислотных остатков, связанных между собой в определенной последовательности.

Биосинтез нуклеиновых кислот. Один из самых жизненно важных процессов клетки — биосинтез мононуклеотидов, поскольку рибо- и дезоксирибонуклеотиды служат прямыми предшественниками **РНК,** ДНК и нуклеотидных ферментов. Центральное звено биосинтеза мононуклеотидов — синтез пуриновых и пиримидиновых оснований. Все микроорганизмы, за исключением некоторых видов бактерий, способны образовывать указанные основания из очень простых предшественников: аминокислот — глицина и аспартата, а также

инозиновой, адениловой, гуаниловой и уридиловой кислот. В синтезе мононуклеотидов, кроме того, участвуют фосфорная кислота и *D-ри*бозо-5-фосфат — продукт пентозофосфатного пути превращения углеводов. Синтезированные микроорганизмами мононуклеотиды полимеризуются при участии специальных ферментов в ДНК и РНК.

Биосинтез углеводов. Глюкоза и другие углеводы синтезируются из более простых соединений. Фотоавтотрофные организмы образуют гексозы в результате восстановления CO_2. Гексозы, в свою очередь, трансформируются в крахмал, целлюлозу и другие полисахариды. В клетках хемоорганогетеротрофных организмов центральный процесс метаболизма — трансформация пирувата, аминокислот и других простых соединений в глюкозу и гликоген.

Подобно тому как основным путем катаболизма углеводов в клетках анаэробных и аэробных микроорганизмов служит превращение глюкозы в пируват, обратным процессом, т. е. превращением пирувата в глюкозу, является центральный путь биосинтеза моносахаридов и полисахаридов. В данный центральный биосинтетический путь вливаются два главных поддерживающих пути, которые начинаются с двух различных наборов простых, неуглеводных соединений. Один поддерживающий путь заключается в ряде реакций, обеспечивающих превращение промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот в пируват. Указанный процесс характерен для всех организмов и носит название глюконеогенеза. Второй путь состоит из реакций, обусловливающих восстановление CO_2 до глюкозы. Он отсутствует у хемоорганогетеротрофов и наблюдается главным образом у хемолитоавтотрофов и фотолитоавтотрофов.

Глюкозо-6-фосфат, образующийся в процессе превращения по центральному пути двух молекул пирувата при затратах энергии АТФ, обусловливает синтез целого ряда соединений — свободной глюкозы, крахмала, гликогена, дисахаридов, моносахаридов, компонентов клеточной стенки (гликопептидов, тейхоевых кислот, липополисахаридов), запасных веществ клетки (гликогена, гранулезы) и др.

Следует остановиться на особенностях синтеза углеводов и других органических веществ в клетке хемолитоавтотрофных микроорганизмов. Процессы окисления неорганических веществ здесь идут с выделением энергии и позволяют аккумулировать ее в клетке в форме АТФ, часть которой тратится на восстановление CO_2. Усвоение CO_2 у большинства исследованных хемолитоавтотрофов, как и у большинства (но не у всех) фотоавтотрофов, осуществляется через **восстановительный пентозофосфатный** цикл, или **цикл Кальвина**[1].

[1] Иными путями — не через цикл Кальвина — фиксируют CO_2 фотоавтотрофные зеленые серные и некоторые зеленые нитчатые бактерии, а также некоторые хемоавтотрофные анаэробы — метаногены, ряд сульфатредукторов, окисляющих H_2, и др.

Цикл Кальвина имеет, таким образом, универсальное значение как для эукариотных, так и для прокариотных микроорганизмов, использующих CO_2 как основной источник углерода.

Ключевым ферментом цикла Кальвина является рибулозобисфосфаткарбоксилаза, которая катализует реакцию присоединения CO_2 к молекуле рибулозо-1,5-бисфосфата ($PO_3H_2—CH_2O.CO.CHOH—CHOH.CH_2O—PO_3H_2$) с образованием двух молекул фосфоглицерата. Последние восстанавливаются в глицеральдегид-3-фосфат, который в результате ряда реакций трансформируется во фруктозобисфосфат, затем — в глюкозо-6-фосфат и, наконец, — в глюкозу.

Биосинтез липидов. Липиды микроорганизмов представляют собой химически гетерогенную группу; среди них есть жиры, фосфолипиды, стероиды, изопреноиды и поли-*В*-оксимасляная кислота. Выделяют две группы липидов. К первой относят липиды, содержащие жирные кислоты, связанные эфирной связью, ко второй — липиды, состоящие из повторяющихся пятиуглеродных радикалов, подобных изопрену. Жирные кислоты обычно синтезируются отдельно и в дальнейшем с образованием эфирной связи включаются в сложные эфиры. Предшественником жирных кислот с длинной цепью, а также запасного вещества — поли-*В*-гидроксимасляной кислоты — служит промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот ацетил-коэнзим А (ацетил-КоА). Важную роль в биосинтезе жирных кислот играет так называемый ацетилпереносящий белок (АПБ).

Синтез жирных кислот с длинной цепью начинается с переноса ацетильной группы с ацетил-КоА на АПБ. Образовавшийся комплекс становится основанием, на которое переносятся двууглеродные соединения (C_2-фрагменты). Последовательное наращивание двууглеродных остатков через ряд промежуточных продуктов ведет к образованию $C_{14}—C_{18}$-жирных кислот. Фосфолипиды возникают при взаимодействии жирных кислот и промежуточного продукта гликолиза — диоксиацетонфосфата.

Полиизопреновые соединения, состоящие из повторяющихся C_5-фрагментов, синтезируются исключительно из ацетильных групп. В указанных реакциях также большую роль играет промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот — ацетил-КоА.

Совокупность всех метаболических превращений, идущих в клетке микроорганизмов, можно представить в виде краткой схемы (рис. 33). На схеме показаны пункты синтеза и использования АТФ, а также отдельные реакции, в которых образуются и используются восстановленные формы переносчиков водорода (НАД • H_2, НАДФ.H_2 и ФАД.H_2).

Регуляция метаболизма. Как указывалось выше, процессы метаболизма обеспечивают запасание микробной клеткой энергии в биологически доступной форме, синтез низкомолекулярных струк-

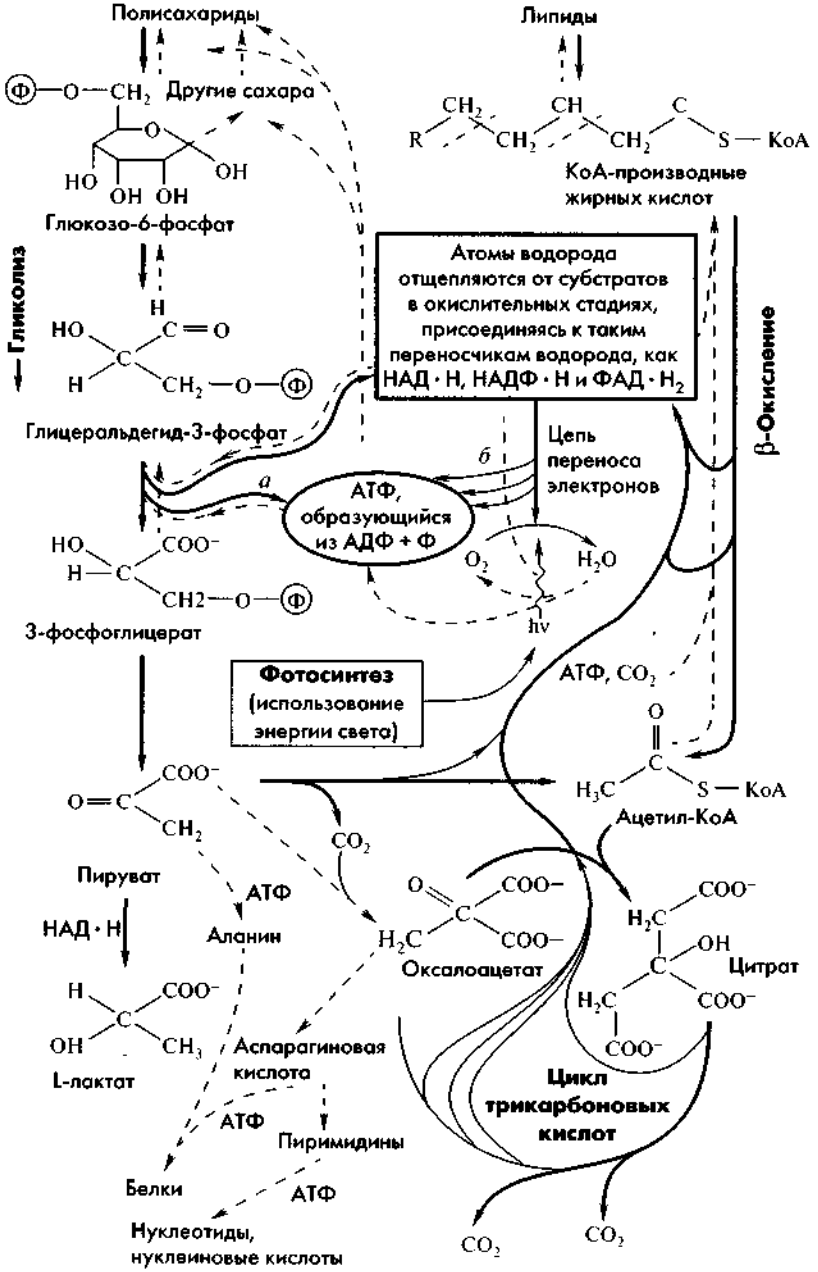


Рис. 33. Краткая схема некоторых путей метаболизма в микробной клетке: *жирными линиями* показаны наиболее важные направления катаболизма, *штриховыми* — направления биосинтеза (по: Д. Мешлер)

турных компонентов и сложных макромолекул, а также деление клетки. В природных условиях микроорганизмы вынуждены конкурировать с другими живыми существами, что обусловило развитие в их клетках механизмов приспособления к изменяющимся внешним условиям и способствовало оптимальному согласованию между собой различных процессов метаболизма. Оптимизация касается прежде всего ферментных белков, их синтеза и функционирования.

Считают, что регуляция клеточного метаболизма у микроорганизмов осуществляется на двух уровнях — **синтеза ферментов** и **изменения их активности.** Первый тип регуляции характерен для большинства метаболических путей и заключается в одновременном регулировании синтеза многих ферментов, функционирующих в одном и том же метаболическом пути. Задача подобной регуляции — обеспечить необходимое соотношение между скоростью синтеза тех или иных ферментов и скоростью синтеза белка. Сама скорость обусловлена частотой транскрипции структурного гена. В клетках микроорганизмов многие ферменты синтезируются непрерывно, вне зависимости от факторов внешней среды. Это так называемые *конститутивные ферменты.* В основном они участвуют в обменных процессах, связанных с синтезом различных веществ и ростом клеток.

Что касается ферментов, участвующих в реакциях катаболизма, то образование многих из них регулируется посредством так называемой **индукции.** Например, в той или иной питательной среде имеется только одно вещество, тогда в клетках микроорганизма синтезируются ферменты для расщепления именно данного вещества. В указанном случае говорят об индукции ферментов, *индуцирующем субстрате* и *индуцируемых ферментах.*

Образование ферментов, участвующих в биосинтезе, часто регулируется посредством **репрессии. В** этом случае ферменты определенного биосинтетического пути не синтезируются, если его конечный продукт присутствует в среде. При наличии или накоплении такого конечного продукта скорость синтеза всех ферментов, управляющих реакциями данного пути, существенно снижается. Например, путем репрессии регулируется синтез ферментов, которые участвуют в образовании пиримидинов, пуринов и аминокислот. Сигнал к остановке биосинтеза белков в таких условиях исходит из конечных продуктов процесса **(репрессия конечным продуктом).**

Если в питательной среде присутствуют два вещества, микроорганизм в большинстве случаев использует то, которое обеспечивает более быстрый рост. Образование же ферментов, расщепляющих второе вещество, репрессируется. Указанное явление называют **катаболитной репрессией.** Катаболитная репрессия лежит в основе так называемой *диауксии.* Если в среде есть два субстрата (глюкоза и сорбит или глюкоза и ацетат), то, как показано на примере кишечной палочки, они используются бактериями не одновременно, а по-

следовательно. Вначале потребляется глюкоза, и одновременно она ингибирует синтез ферментов, участвующих в расщеплении второго субстрата.

Регуляция клеточного метаболизма на уровне активности ферментов характерна, как правило, для ключевых ферментов, участвующих в биосинтетических процессах. Каталитическая активность таких ферментов может увеличиваться под влиянием положительного эффектора — *активатора* или уменьшается под действием отрицательного эффектора — *ингибитора*. Ферменты, занимающие ключевые позиции в биосинтетических путях, в большинстве случаев сами являются регуляторными. У регуляторных ферментов кроме каталитических центров есть и особые стереоспецифичные участки — так называемые *аллостерические центры*. Это места связывания активаторов и ингибиторов. Подобные регуляторные ферменты называют также *аллостерическими*.

Примером аллостерического фермента может служить фосфофруктокиназа, катализующая в процессе гликолиза фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата. В реакции участвует АТФ. Если концентрация АТФ высока, ее молекулы аллостерически ингибируют фосфофруктокиназу. При усилении биосинтетических процессов увеличивается расход АТФ, ее концентрация падает и фосфорилирование фруктозо-6-фосфата возобновляется.

В тех случаях, когда конечный продукт того или иного метаболического пути начинает накапливаться в клетке в количествах, превышающих ее потребности, он может действовать как аллостерический ингибитор, что приводит к ингибированию активного фермента, контролирующего первый этап указанного пути. В результате уменьшается или даже приостанавливается дальнейшее образование самого конечного продукта. Подобное явление называют **ингибированием конечным продуктом,** оно является примером механизма, который регулирует один из важных аспектов метаболической активности по принципу отрицательной обратной связи.

Следовательно, два типа регуляции клеточного метаболизма — индукция и репрессия ферментов, с одной стороны, и изменение активности ферментов — с другой, приводят к одному и тому же результату, а именно определяют интенсивность превращения различных субстратов по тому или иному метаболическому пути.

В микробной клетке существуют линейные и разветвленные пути метаболизма. При *линейном метаболизме* ферменты действуют организованно, будучи объединенными друг с другом в мультиферментные комплексы. Последние часто связаны с цитоплазматической мембраной. Благодаря линейному расположению ферментов создается возможность для саморегуляции ингибированием по принципу отрицательной обратной связи, поэтому скорость определенного метаболического пути регулируется концентрацией его конечного продукта. Здесь каждый фермент связан с соседними — продукт, образующийся при участии одного фермента, становится субстратом для другого фермента в цепи, и так продолжается до тех пор, пока весь процесс не закончится образованием конечного продукта.

Результатами реакций *разветвленного метаболического пути* могут быть различные продукты. Направление синтеза на определенный конечный продукт обусловливается условиями, которые складываются в клетке в данное время. Регуляция образования конечного продукта осуществляется ингибированием по принципу обратной связи. В разветвленном метаболическом пути действуют и мультиферментные системы, однако ферменты их локализованы в растворе и тесно друг с другом не связаны.

Контрольные вопросы и задания

1.Дайте определение понятиям «метаболизм», «катаболизм», «биосинтез». 2. На чем основана современная классификация микроорганизмов? 3. В процессе каких реакций и в виде каких соединений накапливается энергия в клетке?

Глава 8 Рост и размножение микроорганизмов

8.1. Основные понятия

Для микроорганизмов, как и для других живых существ, характерны рост и размножение. Под *ростом* клетки подразумевают согласованное увеличение количества всех химических компонентов (например, белка, РНК, ДНК), ведущее в конечном счете к возрастанию размеров и массы клетки. Рост клетки не безграничен, достигнув определенной величины, она прекращает рост и начинает размножаться. ***Размножение*** — это увеличение числа клеток микроорганизмов в популяции. Микроорганизмы размножаются поперечным делением, происходящим в процессе роста, почкованием или образованием спор.

Размножение. Прокариоты обычно размножаются бесполым путем — **бинарным делением. В** начале деления клетка удлиняется, затем делится нуклеоид. Воспроизведение нуклеоида, содержащего всю генетическую информацию, необходимую для жизнедеятельности микроорганизма, — наиболее важный из всех процессов, которые происходят при росте клетки.

Нуклеоид представлен суперспирализованной и весьма плотно уложенной молекулой самореплицирующейся ДНК, известной под названием *репликона*. К репликонам относят также *плазмиды* — генетические структуры, способные к самостоятельной репликации. Репликация ДНК осуществляется при участии ферментов ДНК-полимераз. Процесс начинается в определенной точке ДНК и происходит одновременно в двух противоположных направлениях. Заканчивается репликация также в определенном месте ДНК.

В результате репликации количество ДНК в клетке удваивается. Вновь синтезированные молекулы ДНК постепенно расходятся в образующиеся дочерние клетки. Все это позволяет дочерней клетке иметь совершенно тождественную материнской по последовательности нуклеотидов молекулу ДНК. Считают, что репликация ДНК занимает почти 80% всего времени, затрачиваемого бактериальной клеткой на деление.

После завершения репликации ДНК наблюдается целый комплекс процессов, ведущих к образованию межклеточной перегородки. Начинаются они с врастания двух слоев цитоплазматической мембраны с обеих сторон клетки, затем между слоями мембраны синтезируется пептидогликан и, наконец, формируется перегородка из двух слоев цитоплазматической мембраны и пептидогликана.

Во время репликации ДНК и образования делящей перегородки клетка микроорганизма непрерывно растет. В этот период происходят синтез пептидогликана клеточной стенки и составляющих цитоплазматической мембраны, образование новых рибосом и других органелл и соединений цитоплазмы. На последней стадии деления дочерние клетки отделяются друг от друга. У некоторых видов бактерий процесс идет не до конца, в результате образуются цепочки клеток.

При делении палочковидных бактерий клетки вначале растут в длину (диаметр клетки не меняется). Когда бактерии становятся вдвое длиннее, палочка несколько сужается посередине, а затем распадается на две клетки. Таким образом, рост клетки идет вдоль длинной оси, а деление осуществляется в плоскости, перпендикулярной этой оси. Чаще всего клетка делится на две равные части *(изоморфное деление),* однако встречается и неравномерное *(гетероморфное)* деление, когда дочерняя клетка больше материнской.

На рисунке 34 показано окончание деления бактерии со жгутиками. Жгутики остаются у материнской клетки, у дочерней они вырастают позднее. При многочисленных исследованиях жгутики обычно находили только у одной клетки из недавно разделившейся пары. Можно полагать, что материнская клетка сохраняет главную часть первоначальной клеточной стенки, фимбрии и жгутики.

Спирохеты, риккетсии, а также некоторые дрожжи и мицелиальные грибы, простейшие и другие организмы размножаются поперечным делением клеток. Миксобактерии делятся перетяжкой. Сначала клетка в месте деления слегка сужается, далее

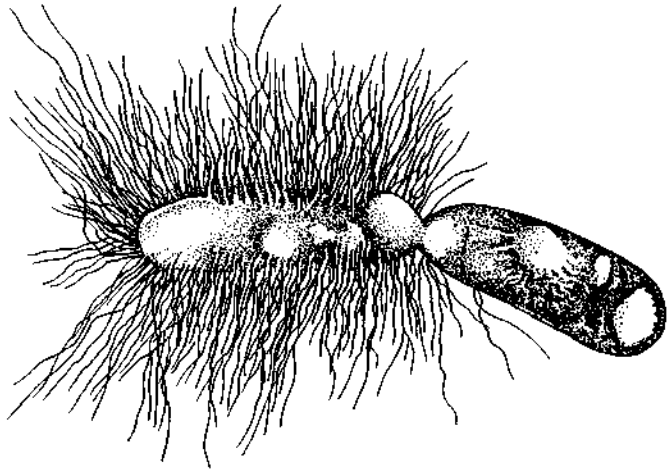


Рис. 34. Недавно разделившаяся клетка бактерии рода *Klebsiella.* Электронная фотография, х2500 (по: К. Дугюд)

клеточная стенка, постепенно впячиваясь с обеих сторон внутрь клетки, все больше и больше сужает ее и, наконец, делит на две. Дочерняя клетка, одетая уже собственной цитоплазматической мембраной, еще некоторое время сохраняет общую клеточную стенку.

Почкование у бактерий представляет собой разновидность бинарного деления и у ряда форм почти не отличается от деления. Например, у нитрифицирующих *(Nitrobacter)* и некоторых фотосинтезирующих *(Rhodopseudomonas)* бактерий клетки делятся, но растут лишь с одного полюса материнской клетки, поэтому образующиеся новые клетки неравноценны — в большинстве случаев между ними можно обнаружить морфологические отличия. Иногда у бактерий наблюдается половой процесс, или конъюгация (см. главу 4).

Клеточные циклы бактерий. Бактериальная клетка проходит от деления к делению **клеточный цикл,** равнозначный онтогенезу (периоду от возникновения бактериальной клетки до прекращения ее существования). При отсутствии дифференциации клеточный цикл бактерий представляется вегетативным клеточным циклом, который включает процессы, связанные с ростом и делением. У бактерий выделяют три типа вегетативного клеточного цикла:

- мономорфный, когда при делении образуется только один морфологический тип клеток;
- диморфный, когда при делении образуются две клетки, отличающиеся формой, размерами и другими признаками;
- полиморфный, свойственный бактериям, которые в зависимости от состава среды могут образовывать клетки двух и более морфологически разных типов.

Для большинства бактерий характерен мономорфный клеточный цикл. До наступления деления клетка проходит ряд периодов. Началу репликации хромосомы (инициации) предшествует период A, во время которого у новой клетки синтеза ДНК не происходит. Затем наступает период C, во время которого осуществляются инициация репликации, репликация ДНК и ее терминация. Третий период — D занимает время от репликации хромосомы до разделения клеток. В ряде случаев выделяют также и T-период, который занимает время от начала до конца образования перегородки или перетяжки между вновь образованными дочерними клетками.

Диморфный клеточный цикл наблюдается у грамотрицательных бактерий, он характерен, например, для представителей рода *Caulobacter* и некоторых почкующихся форм. В процессе размножения *Caulobacter* образуются два типа клеток — подвижные со жгутиками и неподвижные со стебельком. Подвижные клетки обычно рассматриваются как дочерние, неподвижные со стебельками — как материнские.

Полиморфный клеточный цикл свойствен бактериям таких родов, как *Arthrobacter, Hyphomicrobium, Rhodomicrobium* и др. Наиболее характерный представитель бактерий с полиморфным циклом — *Arthrobacter.* Сначала у него формируются палочковидные неправильной формы клетки, затем переходящие в кокки; последние удлиняются, превращаясь в палочки. Интересной особенностью палочковидных бактерий данного рода является их способность при делении образовывать фигуры, подобные римской цифре V.

Для некоторых бактерий характерно образование специализированных клеток и особый порядок прохождения жизненных циклов *{клеточная дифференцировка* бактерий). Так, у представителей семейства *Bacillaceae* наблюдается образование эндоспор, семейства *Azotobacteriaceae* — цист, пурпурной несерной бактерии *Rhodomicrobium* — экзоспор. Для многих облигатно паразитических и симбиотических бактерий характерно образование специализированных клеток, называемых элементарными тельцами (ЭТ).

Миксобактерии отличаются сложными жизненными циклами. Их палочковидные клетки с закругленными или заостренными концами способны ползать по плотному субстрату. Размножаются вегетативные клетки бинарным делением. В определенных условиях, чаще при истощении пищи и на поверхности твердого субстрата, клетки миксобактерий собираются и образуют плодовые тела, которые состоят из слизи и дифференцированных покоящихся клеток, называемых *миксоспорами,* или *микроцистами*.

Время генерации. В результате роста и размножения из одной клетки микроорганизма образуется *колония* его потомков. Микроорганизмы отличаются высоким темпом размножения, оцениваемым по **времени генерации,** т. е. времени, в течение которого происходит деление клетки. Время генерации неодинаково у разных видов микроорганизмов, у клеток одного вида, но разного возраста; оно зависит также от условий роста (состава питательной среды, температуры, pH и других факторов).

При благоприятных условиях время генерации многих микроорганизмов колеблется от 20 до 30 мин. При такой скорости роста можно получить шесть генераций за 2 ч (у человека столько же поколений проходит за 120 лет). Вследствие способности к быстрому размножению в природе бактерии численно превышают все другие живые организмы. Однако бактерии не могут очень долго продолжать расти с периодом генерации 20 мин. Если бы такой рост был возможен, то из одной-единственной клетки кишечной палочки через 24 ч образовалось бы 2^{72}, или около 10^{22} потомков, общая масса которых составила бы несколько десятков тысяч тонн, а еще через 24 ч роста бактерии масса ее потомков превысила бы в несколько раз массу земного шара. Недостаток пищи и накопление продуктов распада ограничивают столь бурное размножение бактерий. Однако в проточной среде они способны делиться каждые 15—18 мин.

Фазы цикла развития культуры бактерий. Наблюдения за ростом микроорганизмов, культивируемых на жидкой среде в замкнутых резервуарах, показывают, что скорость их роста изменяется во времени. Внесенные в питательную среду микроорганизмы сначала не развиваются — «привыкают» к условиям среды. Затем начинается размножение со все возрастающей скоростью, достигающей максимальной, на которую данный вид способен в данной среде. По мере исчерпания запаса питательных веществ и накопления продуктов обмена рост замедляется, а затем прекращается полностью. Цикл развития культуры бактерий состоит из ряда фаз (рис. 35).

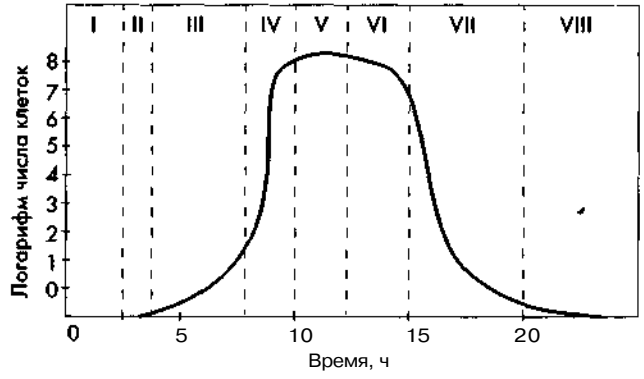


Рис. 35. Фазы роста бактерий: I — исходная (стационарная фаза); II — фаза задержки размножения; III — логарифмическая фаза; IV — фаза отрицательного ускорения; V — стационарная фаза максимума; VI — фаза ускорения гибели клеток; VII — фаза логарифмической гибели; VIII — фаза уменьшения скорости отмирания

Первая фаза — исходная, или стационарная. Начинается после внесения микроорганизмов в питательную среду и продолжается 1–2 ч. Количество бактерий во время этой фазы не увеличивается, и клетки не растут.

Вторая, или лаг-фаза, — период задержки размножения. В указанное время бактерии, внесенные в свежую питательную среду, начинают интенсивно расти, но скорость их деления пока невысока. Две первые фазы развития бактериальной популяции называют периодом приспособления к новой среде. К концу лаг-фазы клетки часто увеличиваются по объему. Длительность лаг-фазы зависит как от внешних условий, так и от возраста бактерий и их видовой специфичности.

Третья фаза — интенсивного логарифмического, или экспоненциального, размножения. В этот период размножение бактерий идет с наибольшей скоростью и число клеток увеличивается в геометрической прогрессии.

Четвертая фаза — отрицательного ускорения. Клетки бактерий становятся менее активными, и период генерации удлиняется. Одна из причин, замедляющих размножение бактерий, — истощение питательной среды и накопление в ней токсичных продуктов обмена. Это замедляет ритм размножения. Некоторые клетки перестают размножаться и погибают.

Пятая фаза — стационарная. Период, когда число вновь возникающих клеток примерно равно числу отмирающих. Поэтому количество живых клеток некоторое время остается практически неизменным. Однако общая численность живых и мертвых бактерий несколько увеличивается, хотя и не очень быстро. Данную фазу иногда называют максимально стационарной, так как численность клеток в среде во время нее достигает максимума.

Шестая — восьмая фазы — отмирания — характеризуются тем, что отмирание клеток преобладает над размножением. Во время прохождения шестой фазы увеличивается число отмерших клеток. Седьмая фаза — логарифмической гибели клеток, когда они отмирают с постоянной скоростью. Во время восьмой фазы скорость отмирания клеток бактерий постепенно уменьшается. Отмирание в последние три фазы связано с изменением физико-химических свойств питательной среды в неблагоприятную для бактерий сторону и другими причинами. Ритм гибели клеток в эти фазы становится быстрым, и число живых клеток все более снижается, до тех пор пока они почти полностью не отмирают.

В описанных выше фазах развития микроорганизмов при культивировании в замкнутом резервуаре последние все время находятся в меняющихся условиях. Это так называемая *непроточная культура* микроорганизмов. Первое время они имеют в избытке все питательные вещества, затем постепенно начинают проявляться не-

юстаток в питании и отравление продуктами обмена. Все указанное и приводит к снижению скорости роста, в результате чего культура переходит в стационарную фазу.

Однако если добавлять в среду питательные вещества и одновременно удалять продукты обмена, то микроорганизмы могли бы пребывать в течение неопределенного времени в экспоненциальной фазе роста. Такой способ положен в основу *проточного культивирования* микроорганизмов, осуществляемого в хемостатах и турбидостатах при помощи специальных устройств, обеспечивающих непрерывную подачу среды с регулируемой скоростью и хорошее ее перемешивание. В результате для микроорганизмов создаются неизменные условия, что позволяет поддерживать непрерывный и постоянный прирост клеток при любой скорости роста культуры. Проточное культивирование микроорганизмов поддается автоматическому регулированию, оно весьма перспективно и широко внедряется в практику.

В исследованиях физиологии микроорганизмов важно получение *синхронных культур*. Так называют бактериальную культуру, или популяцию, в которой все клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла. Синхронные культуры обычно используют для изучения процессов роста у отдельных видов бактерий.

Контрольные вопросы и задания

1. В чем выражается рост микроорганизмов? 2. Как происходит размножение микроорганизмов? 3. Какие существуют типы вегетативного клеточного цикла? 4. Кратко охарактеризуйте основные фазы цикла развития культуры бактерий.

Глава 9 Превращение микроорганизмами соединений углерода

Микроорганизмы играют главную роль в круговороте всех биологически важных элементов в природе, в том числе углерода и кислорода. В круговороте углерода различают два процесса, связанных с выделением и поглощением кислорода: фиксация CO_2 во время кислородного фотосинтеза и минерализация органических веществ с выделением CO_2.

Первый процесс осуществляют высшие растения, водоросли и цианобактерии. Он обеспечивает перевод окисленной формы углерода (CO_2) в восстановленную (в этой форме углерод находится в органических веществах), при этом восстановленный кислород

(H_2O) окисляется до молекулярного (0_2). Второй процесс совершают микроорганизмы, он идет с поглощением кислорода и прямо или косвенно связан с восстановлением молекулярного кислорода и образованием субстратов для кислородного фотосинтеза — CO_2 и H_2O.

В воздухе содержится около 0,03% CO_2 (по объему). Такая концентрация диоксида углерода в атмосфере относительно постоянна благодаря достаточно устойчивому равновесию между фотосинтезом и минерализацией. О значимости круговорота углерода в природе свидетельствует расчет, показывающий, что весь CO_2 атмосферы Земли при отсутствии его пополнения был бы почти полностью использован в результате фотосинтеза меньше чем за 20 лет. Круговорот углерода и кислорода схематично показан на рисунке 36.

Примерные подсчеты показывают, что годовая продукция органического вещества на Земле достигает $33 \cdot 10^{11}$ т. Основную массу составляют соединения растительного происхождения. Химический состав растительных остатков весьма сложен, это разнообразные органические вещества — белки, аминокислоты, целлюлоза, лигнин, гемицеллюлоза, а также жиры, воска и многие другие. Преобладают по массе целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин. Количество и качество трех последних, образуемых в растительных ассоциациях, может быть различно, что связано с определенными растительными сообществами и геоклиматическими зонами.

После отмирания растений в результате деструктивных биологических процессов происходит распад органических веществ, созданных растительными организмами. В нем участвуют представители разнообразных групп животного и растительного мира, начиная от микроорганизмов и кончая высшими позвоночными животными. Известны два основных типа распада, получивших в свое время названия *фитогенный* и *зоогенный*.

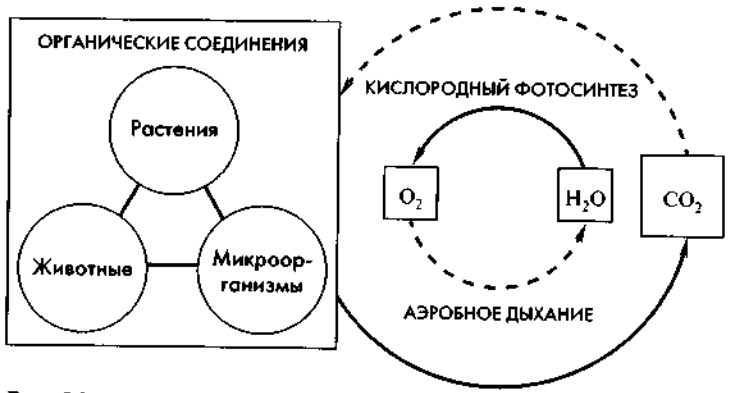


Рис. 36. Круговорот углерода и кислорода

Так называемый *фитогенный*[1] распад органического вещества осуществляется при участии грибов (высших и низших), бактерий, и том числе актиномицетов, и других микроорганизмов; *зоогенный* — при участии беспозвоночных животных (простейших, червей, моллюсков), различных насекомых и, наконец, млекопитающих. Основной тип распада органических веществ — фитогенный. Животные также принимают активное участие в разложении органического вещества: они поедают растительные остатки или переносят споры микроорганизмов. Правильнее считать, что в почве одновременно протекают оба отмеченных процесса.

Разнообразный состав растительных остатков и неодинаковая стойкость входящих в них соединений к воздействию микроорганизмов обусловливают поэтапность распада. Быстрее всего разлагаются простые и низкополимерные углеводы (моно- и дисахариды). Полисахариды (крахмал, гемицеллюлозы, пектины и др.), жиры и воска расщепляются значительно медленнее. Довольно стойки к воздействию микроорганизмов целлюлоза и близкие к ней высокополимерные соединения, а наиболее устойчивым органическим соединением является лигнин, поэтому он часто накапливается в почве.

В зависимости от условий среды органические вещества подвергаются разложению анаэробными и аэробными микроорганизмами. Конечными продуктами разложения органических веществ анаэробными микроорганизмами, осуществляющими брожение, являются органические кислоты и спирты, а аэробными — CO_2 и H_2O.

Рассмотрим процессы анаэробного и аэробного превращений микроорганизмами безазотистых органических веществ.

9.1. Спиртовое брожение

Основным возбудителем спиртового брожения служат дрожжи. Традиционно их применяют в хлебопечении, для получения спирта и целого ряда других продуктов. В бродильных производствах используют представителей родов *Saccharomyces (S. cerevisiae, S. globosus, S. vini* и др.) и *Schizosaccharomyces (S. pompe* и *S. ostosporus)*. В небольших количествах спирт может накапливаться в среде, содержащей углеводы, при развитии в ней отдельных видов грибов родов *Aspergillus (A. oryzae), Mucor* и *Fusarium* и бактерий *(Zymomonas tnobilis, Z. anaerobica, Sarcina ventriculi, Erwinia amylovora* и др.). Дрожжи широко распространены в природе: в почвах, на поверхности растений и т. д.

[1] Строго говоря, термин «фитогенный» является не совсем правомочным, поскольку ни одна из перечисленных групп организмов к растениям не относится, следовательно, для употребления корня *фито-* нет оснований. Оба термина несколько устарели, однако они еще встречаются в биологической литературе, и студентам полезно знать их. *(Прим. ред.)*

При доступе кислорода воздуха дрожжи, вызывающие брожение, начинают окислять углеводы, т. е. от брожения переходят к аэробному дыханию с образованием CO_2 и H_2O. Таким образом, в анаэробных условиях дрожжи получают энергию от сбраживания углеводов, в присутствии кислорода воздуха — за счет аэробного дыхания. Явление подавления спиртового брожения в аэробных условиях (в присутствии O_2) носит название **эффекта Пастера**.

Как указывалось выше, аэробное дыхание дает значительно больше энергии, чем брожение, поэтому для получения такого же количества молекул АТФ при таком дыхании необходимо меньше углеводов. Следовательно, коэффициент использования углеводов увеличивается. Для получения большей массы дрожжей, например при производстве пекарских дрожжей, питательную среду, в которой происходит их размножение, аэрируют. Наоборот, при производстве спирта процесс ведется в анаэробных условиях, чтобы полностью исключить выделение O_2, тормозящего образование этилового спирта.

Сбраживание углеводов дрожжами с образованием этанола и CO_2 идет гликолитическим путем (Эмбдена—Мейергофа—Парнаса). Образовавшийся в результате пируват под влиянием пируватдекарбоксилазы превращается в ацетальдегид, который затем восстанавливается НАД • H_2-алкогольдегидрогеназой до этанола; при этом используется водород, мобилизуемый при окислении глицеральдегид-3-фосфата:

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Гликолиз}} 2CH_3COCOOH$$

$$2CH_3COCOOH \xrightarrow{\text{Пируватдекарбоксилаза}} 2CH_3COH + 2CO_2$$

$$2CH_3COH \xrightarrow[2НАДН_2 \quad 2НАД]{\text{Алкогольдегидрогеназа}} 2CH_3CH_2OH$$

Суммарное уравнение спиртового брожения:

$$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

В начале спиртового брожения дигидроксиацетонфосфат также выполняет роль акцептора водорода, пока не накопится ацетальдегид, необходимый для окисления НАД • H_2. Этим объясняется особый период индукции в начале брожения, во время которого появляется глицерин. Одновременно глицеральдегид-3-фосфат превращается согласно реакциям гликолитического пути в пируват, а после декарбоксилирования — в ацетальдегид.

Однако ацетальдегид не может восстанавливаться в этанол, так как НАД • H_2 уже использован для образования глицерина из дигидроксиацетонфосфата. Поэтому при образовании в процессе брожения одной молекулы глицерина накапливается одна молекула пирувата или ацетальдегида, которая в этанол не превращается. Следовательно, в начале спиртового брожения преобладает глицеринпируватное брожение, приводящее к образованию глицерина и пирувата. Последний обнаруживается в небольших количествах, так как основная его часть идет на образование вторичных продуктов — уксусной, молочной, янтарной, пропионовой и других кислот, а также диацетила, ацетоина, различных альдегидов и сложных эфиров.

Кроме вторичных продуктов, при спиртовом брожении образуются побочные продукты — высшие спирты, или так называемые *сивушные масла*. К этим соединениям относятся амиловый, изоамиловый, бутиловый, пропиловый и ароматические спирты(*В*-фенилэтиловый, *п*-оксифенилэтиловый). Перечисленные вещества образуются из соответствующих кетокислот, синтезированных в процессе метаболизма углеводов, или из аминокислот.

Обычно спиртовое брожение протекает при кислой реакции среды (pH 4—5). Если реакцию питательного субстрата поддерживать на щелочном уровне (около pH 8), то одним из основных прочуктов брожения будет глицерин:

$$2C_6H_{12}O_6 + H_2O = CH_3COOH + CH_3CH_2OH + 2CH_2OHCHOHCH_2OH + 2CO_2$$

Резко повышается выход глицерина, если брожение протекает еще и в присутствии бисульфита натрия. В таком случае ацетальдегид связывается бисульфитом натрия и не может бить восстановлен водородом в этиловый спирт:

$$CH_3COH + NaHSO_3 \longrightarrow CH_3CHOH - SO_3Na$$

Акцептором водорода служит промежуточное соединение — дигидроксиацетонфосфат, превращающееся сначала в глицерин-3-фосфат, а после отщепления фосфатной группы — в глицерин. В некоторых случаях бывает целесообразно получать глицерин и амиловый спирт при спиртовом брожении. Подобные производства существуют.

Наибольшее практическое значение имеет вид дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. К нему относят расы, используемые в хлебопечении, производстве спирта, пивоварении, виноделии, производстве кваса.

Дрожжи сбраживают не все сахара. Обычно они хорошо усваивают гексозы. Пентозы могут ассимилировать лишь весьма ограниченное число видов. Неплохо используют дрожжи дисахариды, но каждый вид микроорганизма способен усваивать лишь строго определенный их набор. Перед сбраживанием более сложные сахара под влиянием ферментов дрожжевой клетки распадаются на моносахариды.

Отдельные виды могут усваивать простые декстрины. Крахмал становится пригодным для спиртового брожения лишь после предварительного осахаривания при помощи солода (или другими способами). На многих заводах для спиртового брожения используют целлюлозу, предварительно подвергая ее кислотному гидролизу. В аэробных условиях дрожжи способны окислять органические кислоты и другие соединения.

Источником азотного питания для дрожжей служат небольшие пептиды, аминокислоты, а также аммонийные соли, реже нитраты и нитриты. Дрожжевая клетка вырабатывает многие витамины, а присутствие отдельных ростовых веществ в среде усиливает рост дрожжей. Большинство дрожжей растет в границах pH 3—8 при оптимуме pH 3,5—6,5. Обычно они развиваются в относительно широком температурном диапазоне от 0 (или —7 °С) до 50 °С. Оптимальная температура для роста большинства видов 28—30 °С.

Штаммы *Saccharomyces cerevisiae* подразделяют на расы верхового и низового брожения. Первые используют для брожения, протекающего при температуре 14—25 °С. В таких условиях обильно выделяется диоксид углерода, наблюдается пенообразование. Клетки микроорганизмов поднимаются на поверхность бродящей жидкости. Верховые расы используют в спиртовой промышленности, хлебопечении и т. д., но при некоторых условиях употребляют и другие дрожжи.

Дрожжи низового брожения применяют в производстве при температуре 6—10 °С и ниже (до 0 °С). При этом брожение совершается спокойно и масса дрожжевых клеток остается на дне сосуда. Низовые расы обычно используют в пивоварении и виноделии, где применяют расы *Saccharomyces cerevisiae,* адаптированные, однако, к жизнедеятельности при пониженной температуре. В виноделии важную роль играют также дрожжи *Saccharomyces vini, S. cerevisiae* var.*ellipsoides.*

Как указывалось выше, дрожжи могут расти при нейтральной реакции среды, но активнее процессы идут при некотором подкислении. На практике для предупреждения развития посторонней бактериальной микрофлоры при размножении дрожжей создают кислую среду.

Значение спиртового брожения очень велико. Известно, что этот процесс лежит в основе не только виноделия, пивоварения, производства спирта, хлебопечения, но и получения кваса и некоторых кисломолочных продуктов (кефира, кумыса и др.). В промышленности широко используют чистые культуры дрожжей, обеспечивающие наиболее правильное течение процесса, а также получение качественной продукции. На деятельности дрожжей и близких к ним организмов основано и приготовление кормового белка. При культивировании их на средах с дешевым источником углеродного питания (меласса, отходы целлюлозной или текстильной промышленности, метанол, этанол и др.) удается получать значительную массу, содержащую полноценный белок. Дрожжи сепарируют и используют для кормовых целей. Разработан и способ выращивания кормовых дрожжей на отходах нефтяной промышленности.

Некоторые виды дрожжей накапливают в своих клетках большое количество жира. Подобные организмы, получившие техническое название «жировые», предложено применять для микробиологического получения ценных технических жиров. Существуют формы дрожжей, накапливающие значительные количества витаминов, на основе данного свойства построены производства витаминов для медицины и сельского хозяйства.

Не все дрожжи приносят пользу человеку, многие способны вызывать только окисление углеводов. Среди небродящих дрожжей есть вредители пищевых продуктов и вина.

9.2. Молочнокислое брожение

При молочнокислом брожении, вызываемом специфичной группой бактерий, происходит распад глюкозы до молочной кислоты. Среди побочных продуктов молочнокислого брожения отмечены ацетат, диоксид углерода, иногда и этанол.

Известны три типа брожения, вызываемого молочнокислыми бактериями:

- гомоферментативное молочнокислое брожение, при котором из глюкозы образуется только молочная кислота:

$$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCOOH$$

- гетероферментативное молочнокислое брожение, когда из глюкозы кроме молочной кислоты получаются этанол и диоксид углерода:

$$C_6H_{12}O_6 = CH_3CHOHCOOH + CH_3CH_2OH + CO_2$$

- брожение, вызываемое бифидобактериями, — бифидоброжение, при котором из глюкозы образуются ацетат и лактат:

$$2C_6H_{12}O_6 = 3CH_3COOH + 2CH_3CHOHCOOH$$

В основе гомоферментного молочнокислого брожения лежат реакции гликолиза (пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса). Образующийся в результате пируват, однако, не подвергается декарбоксилированию до ацетальдегида, как при спиртовом брожении, а восстанавливается до лактата водородом, отщепляющимся при дегидрировании глицеральдегид-3-фосфата:

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Гликолиз}} 2CH_3COCOOH \xrightarrow[2НАДН_2 \quad 2НАД]{\text{Лактатдегидрогеназа}} 2CH_3CHOHCOOH$$

Образование D(—)-, L(+)- или DL-форм молочной кислоты определяется наличием у молочнокислых бактерий стереоспецифичных D-, L- или DL-лактатдегидрогеназ. Незначительная часть пирувата подвергается декарбоксилированию, что приводит к образованию ацетата, этанола и CO_2, а также ацетоина.

У гетероферментативных молочнокислых бактерий отсутствуют главные ферменты гликолиза — фруктозобисфосфатальдолаза и три-

озофосфатизомераза. Поэтому начальное превращение глюкозы идет у данных бактерий исключительно по пентозофосфатному пути до образования рибулозо-5-фосфата. Последний под действием фермента эпимеразы превращается в ксилулозо-5-фосфат, а затем в результате реакции, катализуемой пентозофосфаткетолазой, расщепляется на глицеральдегид-3-фосфат и ацетилфосфат. В дальнейшем глицеральдегид-3-фосфат превращается в пируват, а затем в лактат, как и при гомоферментативном молочнокислом брожении, а из ацетилфосфата образуются ацетат и этанол.

Бифидоброжение осуществляется по пентозофосфатному пути или по пути Энтнера—Дудорова с конечными продуктами в виде ацетата и лактата.

Нередко в сбраживаемых молочнокислыми бактериями *{Streptococcus cremoris* и *Leuconostoc cremoris)* средах накапливаются небольшие количества ацетоина и диацетила — веществ, обладающих своеобразным приятным ароматом. Последний передается продуктам, в которых развиваются указанные бактерии.

Кроме глюкозы, молочнокислые бактерии сбраживают большое количество Сахаров: фруктозу, галактозу, маннозу, сахарозу, лактозу, мальтозу и пентозы. При сбраживании перечисленных соединений наблюдаются некоторые отклонения от обычных схем брожения. Например, при брожении фруктозы образуются лактат, ацетат, CO_2 и маннитол.

По форме клетки молочнокислые бактерии представляют собой палочки (длинные и короткие) и кокки; они могут образовывать парные или цепочковидные скопления. Это неподвижные, не образующие спор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus)* грамположительные организмы. Молочнокислые бактерии — анаэробы, но они аэротолерантны, т. е. могут расти при доступе кислорода.

Молочнокислые бактерии обладают высокой бродильной способностью и отличаются отсутствием большинства биосинтетических путей. Это обусловливает высокую требовательность рассматриваемых бактерий к источникам питания, которая удовлетворяется лишь на таких средах, как ткани растений, молоко, содержимое желудочно-кишечного тракта животных. Источником энергии для этих бактерий служат главным образом моно- и дисахариды (полисахариды сбраживают только отдельные виды). Некоторые молочнокислые бактерии способны ассимилировать органические кислоты, например лимонную.

Молочнокислые бактерии требовательны к источникам азотного питания — они используют органические формы азота. Многие молочнокислые бактерии могут ассимилировать белки, хотя лучше развиваются на аминокислотах, пептидах и полипептидах. Продукты распада белковой молекулы прекрасно усваиваются этими бактериями. Прежде считали, что молочнокислые бактерии не

усваивают солей аммония. Сейчас описаны отдельные возбудители молочнокислого брожения, способные расти на минеральном азоте, но в природе они встречаются редко.

Кроме веществ, содержащих углерод и азот, молочнокислым бактериям необходимы фосфор, калий, кальций и другие элементы, которые обычно поступают в среду с различными минеральными соединениями. Большинство молочнокислых бактерий нуждается и в ростовых веществах. Отдельным бактериям для развития требуется рибофлавин. При этом результатом их собственного обмена веществ может быть другое ростовое вещество, например витамин B_1.

Молочнокислые бактерии развиваются в довольно широком диапазоне температур. Для большинства видов предпочтительны температуры от 7 до 42 °С при оптимуме 30—40 °С. Однако в природе встречаются формы, способные размножаться в зоне более низких (минимум 3 °С) или более высоких (максимум 57 °С) температур. Молочнокислые бактерии не образуют спор, поэтому при повышении температуры выше указанного предела быстро погибают.

Многие молочнокислые бактерии растут в диапазоне pH 5,5—8,8, однако лучше размножаются при нейтральной реакции среды. В результате жизнедеятельности они значительно подкисляют питательную среду, поэтому приспособились к существованию в зоне довольно высокой кислотности среды. Палочковидные формы выносят более низкие значения реакции среды, чем кокковидные. Это кислотолюбивые организмы, оптимум для них обычно составляет pH 5,5— 5,8 и менее, как правило, они растут при pH 5, некоторые при pH 2,9-3,2.

Кратко остановимся на характерных особенностях, свойственных отдельным представителям молочнокислых бактерий (по данным Е. И. Квасникова, О. А. Нестеренко).

Кокковые формы молочнокислых бактерий, осуществляющих **гомоферментативное** брожение, представлены семейством *Streptococcaceae,* родами *Streptococcus* и *Pediococcus.*

Бактерии рода *Streptococcus* имеют круглые или слегка овальные клетки диаметром 0,5—1 мкм, расположенные одиночно, парами или в цепочках. Глюкозу эти микроорганизмы сбраживают с образованием в основном правовращающей молочной кислоты. Они широко распространены в природе — на растениях, в почве, навозе, молоке и других субстратах, используются в ряде пищевых производств. К данному роду относят виды *S. lactis, S. lactis* var. *diacetilactis, S. cremoris, S. thermophilus.*

S. lactis — молочнокислый стрептококк, имеет клетки овальной формы, расположенные в коротких цепочках или соединенные попарно. Кроме моносахаридов, сбраживает лактозу и мальтозу. Оптимальная температура для развития 30—35 °С.

S. cremoris — сливочный стрептококк, отличается от молочнокислого тем, что его клетки располагаются в длинных цепочках. Температурный оптимум для вида составляет 25—30 °С. В процессе брожения образует повышенное количество летучих кислот. *S. cremoris,* как и *S. lactis,* использу-

ют при производстве кисломолочных продуктов, кислосливочного масла и сыров.

S. lactis var. *diacetilactis* образует при брожении молока и молочных продуктов повышенное количество летучих кислот и ароматические вещества, основное из последних — диацетил. Микроорганизм обладает способностью сбраживать лимонную кислоту. Температурный оптимум для него 25—30 °С. Данный стрептококк улучшает вкус и аромат молочных продуктов, поэтому его используют вместе со *S. lactis* и *S. cremoris* в заквасках для кисломолочных продуктов, кислосливочного масла и сыров.

S. thermophilus может развиваться при повышенной температуре (около 50 °С). Сходен со *S. cremoris.* Сбраживает сахарозу. Применяется вместе с болгарской палочкой *{Lactobacillus bulgaricus)* для приготовления южных простокваш. Играет важную роль в производстве некоторых сыров (швейцарский).

Представители рода *Pediococcus* — грамположительные неспорообразующие неподвижные кокки, располагающиеся кучками, тетрадами, парами или единично. Осуществляют гомоферментное молочнокислое брожение с образованием DL-молочной кислоты. Оптимальное для видов рода значение pH 5. Бактерии предпочитают анаэробные условия. Обитают в бродящих растительных материалах — квашеных овощах, силосе, а также в сыре, молоке, в пищеварительном тракте животных и т. д. Среди видов рода наиболее интересны *P. damnosus, P. acidi-lactici, P. dextrinicus, P. halophilus.*

Палочковидные бактерии, осуществляющие молочнокислое брожение, относятся к сем. *Lactobacillaceae,* роду *Lactobacillus.* Характеризуются значительным разнообразием формы от короткой коккообразной до длинной нитевидной. Располагаются единично, парами или цепочками.

Бактерии этого рода обнаруживают в молочных, зерновых и мясных продуктах, пиве, вине, соленьях и маринадах, в воде и сточных водах, а также в ротовой полости и кишечном тракте человека и животных. Сбраживают сахара с образованием главным образом молочной кислоты. Для *Lactobacillus* оптимум pH 5,5—5,8, но они могут развиваться при pH 5 и ниже.

Среди гомоферментативных молочнокислых палочек можно выделить две группы — *Thermobacterium* и *Streptobacterium.* Первая группа представлена организмами, которые, как правило, растут при 45 °С и выше, обычно не развиваются при 20 °С и никогда не растут при 15 °С. При брожении с их участием образуются D-, L- или DL-молочная кислоты. В образовании D(—)-молочной кислоты принимают участие *L. delbrueckii, L. leichmannii, L. lactis* и *L. bulgaricus;* DL-молочной кислоты — *L. helveticus* и *L. acidophilus* (рис. 37).

По биохимическим особенностям перечисленные виды очень близки между собой. *L. bulgaricus* обычно выделяют из южных кисломолочных продуктов, *L. helveticus* — из сыров (швейцарского, советского), *L. acidophilus* — из кишечника человека. Молоко, сквашенное при участии ацидофильной палочки, служит хорошим лечебным средством при желудочно-кишечных заболеваниях.

Представители второй группы гомоферментативных молочнокислых бактерий при развитии в молоке образуют короткие цепочки. Это группа менее активных молочнокислых палочек. Они хорошо развиваются при 15—38 °С, оптимум для них составляет 30 °С. В молоке, молочных продуктах и на растениях обычно обнаруживают несколько видов бактерий второй группы: *L. casei, L. xylosus,* как правило, участвуют в образовании Ц+)-молочной кислоты, *L. plantarum, L. curvatus* образуют DL-молочную кислоту.

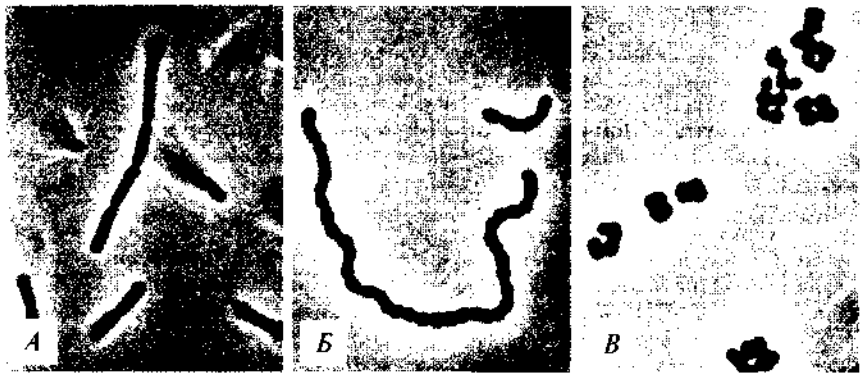


Рис. 37. Форма и расположение клеток у трех родов молочнокислых бактерий:
А — Lactobacillus; Б — Streptococcus; В — Pediococcus, х2180 (по: Р. Стейниер)

L. casei играет важную роль в созревании сыров. *L. plantarum* принимает участие в молочнокислом брожении при квашении овощей и силосовании.

Гетероферментативное молочнокислое брожение осуществляют представители родов *Leuconostoc, Lactobacillus* (подрод *Betabacterium), Bifidobacterium.*

Бактерии рода *Leuconostoc* имеют вид сферических или чаще чечевицеобразных клеток. Клетки располагаются единично, парами или в коротких цепочках, кучкообразных скоплений не обнаружено. Грамположительные. Спор не образуют. Глюкозу сбраживают с образованием D(-) молочной кислоты, этилового спирта и CO_2. Факультативные анаэробы, оптимум температуры для них составляет 20—30 °С. На средах с сахарозой у этих организмов появляется толстая наружная оболочка из слизи или декстранов.

Виды рода обнаруживаются главным образом на растительных материалах (иногда в молоке). Сбраживают моно- и дисахариды, не могут питаться более сложными углеводами. Существует ряд видов рода *Leuconostoc,* различающихся по морфологическим и физиологическим признакам.

L. mesenteroides и *L. dextranicum* принимают активное участие в сбраживании углеводов при квашении капусты и силосовании. *L. dextranicum* и *L. cremoris* сбраживают лимонную кислоту с образованием диацетила, поэтому они могут быть компонентами заквасок, применяемых в масло- и сыроделии.

Гетероферментативные лактобациллы (бета-бактерии) — *Lactobacillusfermentum, L. brevis, L. cellobiosus* — и другие сбраживают глюкозу с образованием DL-молочной кислоты, CO_2, уксусной кислоты и этилового спирта. Обычно они встречаются на растениях, обнаружены в хлебных заквасках. Это небольшие палочки, имеющие температурный максимум около 45 °С.

К роду *Bifidobacterium* относятся бактерии, имеющие неподвижные, прямые или разветвленные палочки, клетки раздвоенной V-формы, булавовидной или лопатовидной формы. Не образуют спор, грамположительные. Глюкозу сбраживают главным образом до уксусной и L+)-молочной кислот. Строгие анаэробы, не переносят присутствия CO_2; оптимум температуры для них составляет 36—38 °С. Известно более 20 видов бифидобактерий; типичный представитель рода — *B. bifidum.*

Бифидобактерии — обитатели кишечника человека, животных, насекомых и т. п. Установлено, что представители рода *Bifidobacterium* со-

ставляют от 50 до 90% микробного содержимого фекалий человека. Способность молочнокислых бактерий синтезировать органические антибиотики (низин, диплококцин, лактолин, бревин и др.) и продуцировать органические кислоты позволяет предположить, что эти организмы — антагонисты гнилостной и болезнетворной кишечной микрофлоры человека и животных.

Молочнокислые бактерии имеют огромное практическое значение. Их широко используют при изготовлении кисломолочных, квашеных продуктов, сыров, кислосливочного масла и т. п. Молочнокислые бактерии, встречающиеся обычно в молоке, вызывают его сквашивание. В различных климатических зонах земного шара в молоке обитают неодинаковые виды молочнокислых бактерий. Молоко в северной зоне обычно содержит *Streptococcus lactis,* в южной — палочковидные бактерии *L. bulgaricus* и др. В связи с этим кислое молоко разных зон неодинаково по вкусовым качествам. В каждой стране существуют свои национальные кисломолочные продукты.

В производственных условиях кисломолочные продукты готовят, заражая пастеризованное молоко соответствующими чистыми культурами бактерий. В этих целях используют молочнокислый стрептококк *(S. lactis),* болгарскую палочку *(L. bulgaricus),* ацидофильную палочку *(L. acidophilus)* и др.

Ряд молочнокислых продуктов готовят, используя закваску, содержащую *симбиотические комплексы микроорганизмов.* Например, для приготовления кефира в молоко вносят так называемые *кефирные зерна,* внешне напоминающие миниатюрные головки цветной капусты. Они содержат *Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus lactis,* дрожжи *Saccharomyces kefiri,* сбраживающие лактозу. Продуктами брожения служат молочная кислота и спирт.

Смешанное брожение лежит также в основе приготовления кумыса из кобыльего молока. В данном случае молочнокислое брожение осуществляют термофильные молочнокислые палочки, близкие к *Lactobacillus bulgaricus,* и дрожжи рода *Torula,* сбраживающие лактозу. Сбраживаемое молоко периодически взбалтывают, в результате чего казеиновый сгусток мелко дробится. Йогурт готовят внесением в пастеризованное гомогенизированное молоко чистых культур *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus,* а биойогурт получают сквашиванием молока культурами *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus.*

Деятельность молочнокислых бактерий лежит в основе изготовления сыров. Процесс сыроделия представляет собой коагуляцию казеина молока под влиянием сычужного фермента, выделяемого из желудка жвачных животных. Получившиеся сгустки отделяют от сыворотки, прессуют, выдерживают в растворе соли, а затем оставляют лежать до созревания. Во время созревания в сырной массе идут сложные процессы, при которых значительная часть казеина под действием ферментов молочнокислых бактерий переходит

в аминокислоты. Для изготовления некоторых сыров используют также пропионовокислые бактерии, плесневые грибы и т. д. Для улучшения качества сыров нередко применяют закваски молочнокислых бактерий.

Лактобациллы — *Lactobacillus plantarum* и *L. coryneformis* — используют в хлебопечении, лактобациллы и стрептококки — при изготовлении сырокопченых колбас. Молочнокислые бактерии вызывают брожение, продуктом которого служит лактат, они снижают pH среды, тем самым предохраняя от порчи колбасы, которые по технологии не подвергаются варке (салями, сервелат и др.). Квашение овощей и силосование кормов сводятся главным образом к молочнокислому брожению субстратов.

9.3. Пропионовокислое брожение

Пропионовокислое брожение осуществляют бактерии семейства *Propionibacteriaceae* рода *Propionibacterium.* Различают несколько видов пропионовокислых бактерий, из которых широко известны *Propionibacterium freudenreichii* и *Propionibacterium acidi-propionici.*

Бактерии рода *Propionibacterium* представляют собой грамположительные неподвижные палочки, обычно полиморфные, есть булавовидной формы с одним закругленным концом, другим — конусообразным. Возможны удлиненные, кокковидные, раздвоенные, разветвленные. Располагаются клетки поодиночке, парами, цепочками, группами и т. д. Спор не образуют. Пропионовокислые бактерии относятся к анаэробам, но они могут развиваться в условиях низкого парциального давления кислорода. Источниками энергии для них служат углеводы, органические кислоты, спирты и др.

Продуктами брожения углеводов при участии пропионовокислых бактерий могут быть различные комбинации пропионата и ацетата, меньшие количества изовалериата, формиата, сукцината или лактата и CO_2:

$$3C_6H_{12}O_6 = 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$$

Пропионовокислые бактерии способны сбраживать лактат, образовавшийся в результате брожения под действием других бактерий, превращая его в пропионат и ацетат:

$$3CH_3CHOHCOOH = 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + H_2O + CO_2$$

Сбраживание углеводов пропионовокислыми бактериями происходит по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса до стадии образования пирувата. Затем в зависимости от условий пируват может окисляться до ацетата и CO_2, восстанавливаться в лактат, карбоксилироваться в оксалоацетат, который через малат и фумарат восстанавливается до сукцината. Пропионат может образовываться восстановлением пирувата или лактата либо декарбоксилированием

сукцината. Все перечисленные процессы достаточно сложны, состоят из большого числа реакций, катализуемых многими ферментами.

Для роста пропионовокислых бактерий необходима среда с белками и аминокислотами, но они могут развиваться и на простых источниках азота (например, аммонийных солях) в присутствии витаминов (пантотеновая кислота, тиамин и биотин). Оптимальная температура роста для бактерий 30—37 °С, pH 7.

Большие количества пропионовокислых бактерий обнаруживают в рубце и пищеварительном тракте жвачных животных. В рубце присутствуют бактерии, гидролизующие целлюлозу с образованием глюкозы. Последняя затем превращается в лактат и другие вещества. Пропионовокислые бактерии сбраживают глюкозу и лактат в пропионат и ацетат, которые всасываются в кровеносную систему животного.

Пропионовокислые бактерии используют в производстве твердых сычужных сыров. По окончании молочнокислого брожения лактозы в созревающем сыре наступает стадия пропионовокислого брожения, сопровождающаяся сбраживанием лактата в ацетат и пропионат, придающие сырам острый вкус. Выделяющийся при этом диоксид углерода обусловливает появление «рисунка» сыра, т. е. глазков.

Кроме того, бактерий данного рода используют для получения витамина B_{12}, образующегося в результате их жизнедеятельности в значительно больших количествах, чем у других микроорганизмов. На основе бактерий рубца, среди которых есть *Propionibacterium acnes,* получен препарат «Пропиовит». Он стимулирует развитие полезной микрофлоры кишечника животных, сокращает их потери от заболеваемости и гибели, увеличивает привесы животных и птиц.

9.4. Процессы брожения, вызываемые бактериями рода *Clostridium* и энтеробактериями

Анаэробные бактерии рода *Clostridium* были открыты Л. Пастером в 1861 г. Ученый обнаружил, что некоторые представители данного рода сбраживают углеводы с образованием масляной кислоты. Сейчас среди представителей *Clostridium* насчитывается более 80 видов бактерий. Они имеют палочковидные клетки, обычно подвижны, передвигаются при помощи перитрихальных жгутиков. У видов рода образуются споры, имеющие овальную или сферическую форму; они терморезистентны. Как правило, споры раздувают клетку (рис. 38). Грамположительные. Облигатные анаэробы.

Род включает психрофильные, мезофильные и термофильные виды. Температурный оптимум для роста большинства мезофильных видов лежит в диапазоне 30—40 °С. Для термофильных видов температурный оптимум составляет 60—75 °С. Оптимальная реакция среды для клостридий — нейтральная или слабощелочная. Хе-

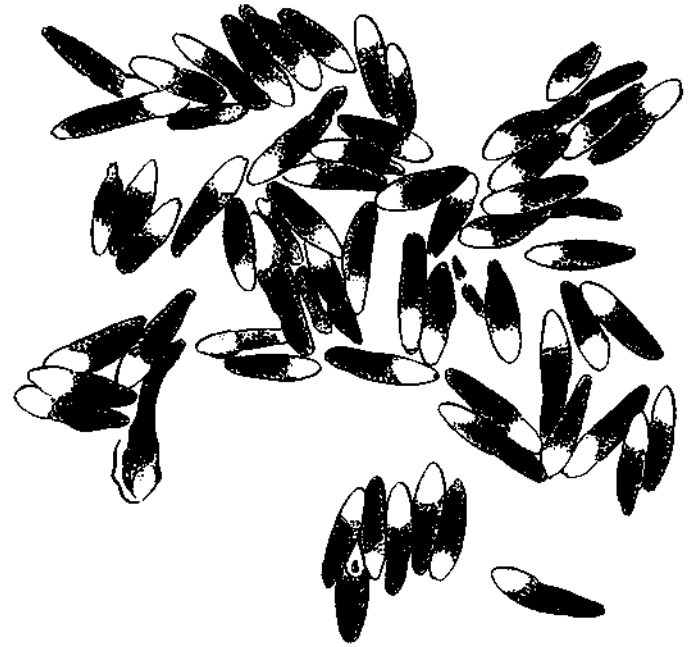


Рис. 38. Спорообразующие клетки рода *Clostridium* (по: В. Т. Емиев, В. И. Дуда, Ш. И. Шелли)

моорганогетеротрофы. Клостридии сбраживают сахара, многоатомные спирты, аминокислоты, органические кислоты, пурины и пиримидины, другие органические соединения. Ряд видов способен к фиксации молекулярного азота атмосферы. Места обитания клостридий — почва, водоемы, а также пищеварительный тракт человека и животных.

Все виды рода объединены в группы в зависимости от способности сбраживать те или иные органические соединения.

Первая группа — *сахаролитические* виды *Clostridium,* сбраживающие растворимые углеводы, крахмал или пектин с образованием бутирата, ацетата, CO_2 и H_2. Брожение при участии некоторых микроорганизмов группы приводит к образованию из Сахаров дополнительных нейтральных соединений (бутанола, пропанола, ацетона, небольших количеств этанола). В группу входят бактерии, вызывающие маслянокислое и ацетонобутиловое брожения: *C. butyricum, C. pasteurianum, C. tyrobutyricum, C. butylicum, C. acetobutylicum* и др. Возможно, к ней можно отнести и ряд видов *Clostridium* — высокоспециализированных агентов анаэробного разрушения целлюлозы, причем главные конечные продукты брожения — этанол, ацетат и сукцинат, CO_2 и H_2.

Вторая группа — *протеолитические* виды *Clostridium,* сбраживающие аминокислоты. Обладают сильными протеолитическими свойствами и способны к интенсивному гидролизу белков с последующим сбраживанием аминокислот. Рост микроорганизмов в средах с белком сопровождается образованием аммиака, CO_2, H_2, жирных кислот и большого количества летучих соединений с неприятным запахом. К группе относятся виды: *C. sporogenes, C. perfringens, C. histolyticum, C. botulinum* и др. Многие представители рода *Clostridium,* сбраживающие аминокислоты, способны также к сбраживанию углеводов.

Третья группа — виды *Clostridium, сбраживающие азотсодержащие циклические соединения* — пурины и пиримидины. Пурины (гуанин, гипоксантин, ксантин и др.) под влиянием *C. acidi-urici* и *C. cylindrosporum* превращаются в аммиак, ацетат и CO_2. *C. uracilicum* и *C. oroticum* сбраживают пиримидины, при этом урацил распадается до *B*-аланина, CO_2 и NH_3, а оротовая кислота — до уксусной кислоты, CO_2 и NH_3.

Четвертая группа включает всего один вид — *C. kluyveri, сбраживающий смесь этанола с ацетатом* до бутирата и капроновой кислоты, а также небольшого количества водорода.

Остановимся более подробно на двух типах брожения, осуществляемого сахаролитическими видами *Clostridium,* — маслянокислом и ацетонобутиловом.

Маслянокислое брожение. Типичный представитель маслянокислых бактерий — *Clostridium butyricum.* Это крупная палочка (1—2 х 10 мкм). Молодые клетки подвижны, на более поздних стадиях развития они теряют жгутики, приобретают веретенообразную форму и накапливают запасное питательное вещество — полисахарид гранулезу. При образовании спор клетки приобретают веретеновидную форму, иногда форму барабанной палочки.

Источником углерода для маслянокислых бактерий могут служить моно- и дисахариды, некоторые полисахариды (декстрин, крахмал), лактат и пируват, маннит, глицерин и др. В сложных белковых средах при отсутствии сбраживаемого углевода маслянокислые бактерии растут плохо или не растут вовсе. Источником азота для них служат разнообразные вещества: аминокислоты, аммиачные соединения и даже молекулярный азот.

Маслянокислое брожение начинается с трансформации Сахаров в пируват по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса. Конечные продукты из пирувата образуются в цепи последовательных реакций, катализуемых несколькими ферментными системами. Остановимся на кратком описании данного процесса.

Пируват превращается в ацетил-СоА, CO_2 и H_2 при участии ферментной системы: пируват + ферредоксиноксидоредуктаза. Из ацетил-КоА через ацетилфосфат синтезируется ацетат. Синтез бутирата начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА, возникших в результате декарбоксилирования пирувата, что приводит к образованию ацетоацетил-КоА. Последний восстанавливается в *B*-оксибутирил-КоА. С отщеплением от молекулы *B*-оксибутирил-КоА молекулы воды возникает кротонил-КоА, ферментативно восстанавливающийся в бутирил-КоА. Наконец, после гидролиза бутирил-КоА и переноса КоА на ацетат образуется бутират.

Превращение ацетил-КоА в ацетилфосфат, а затем в ацетат сопровождается синтезом АТФ. Таким образом, в процессе субстратного фосфорилирования при маслянокислом брожении синтезируется третья молекула АТФ (две другие образовались в процессе гликолитического расщепления глюкозы). Суммарное уравнение маслянокислого брожения:

$$4C_6H_{12}O_6 = 3CH_3CH_2CH_2COOH + 2CH3COOH + 8CO_2 + 8H_2$$

Среди маслянокислых бактерий есть мезофильные и термофильные формы. Кроме того, род *Clostridium* включает и патогенные, и сапротрофные виды. К сапротрофным бактериям относят *C. pasteurianum, C. butyricum, C. felsineum;* к патогенным — *C. botulinum, C. perfringens* и др. Все они широко распространены в почвах и других естественных субстратах.

Маслянокислое брожение — не всегда желательный процесс. Например, при его развитии в заквашиваемых кормах белковая часть корма разлагается, а накопившаяся масляная кислота придает продукту неприятный запах. Вместе с тем для некоторых промышленных целей требуется чистая масляная кислота. Ее получают на заводах, специально сбраживая подготовленные среды чистой культурой маслянокислых бактерий. Образовавшуюся кислоту отделяют и очищают химическим методом.

Ацетонобутиловое брожение. Возбудитель ацетонобутилового брожения — *C. acetobutylicum,* он широко распространен в почках, имеет палочковидные клетки (0,6—0,9 х 2,4—4,7 мкм) с перитрихальным жгутикованием. Характерно образование овальных спор, которые располагаются в клетке субтерминально. Бактерии сбраживают моно-, ди- и полисахариды, а также глицерин, маннит, глюконат, пируват и ряд других соединений, фиксируют молекулярный азот. Оптимальная температура для их роста 37—38 °С, оптимальное значение pH среды — 5,1—6,9. Ацетонобутиловые бактерии способны разлагать белки.

Сбраживание углеводов при помощи данных бактерий происходит по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса. Образовавшийся в результате декарбоксилирования пирувата ацетил-КоА восстанавливается в этанол, идет на синтез ацетата или конденсируется в ацетоацетил-КоА. Последний декарбоксилируется, что приводит к образованию ацетона, или восстанавливается в бутирил-КоА, который

может трансформироваться в бутират или восстанавливаться через бутиральдегид до бутанола. Суммарная схема ацетонобутилового брожения:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2OH + CH_3COCH_3 + CH_3CH_2OH + CH_3CHOHCH_3 + H_2 + CO_2$$

Основные конечные продукты брожения, как видно, — бутанол, этанол, ацетон, 2-пропанол, а также ацетат и бутират. Однако характер конечных продуктов определяется как видовой принадлежностью используемого для брожения микроорганизма, так и условиями, в которых идет процесс. Установлено, что ацетонобутиловое брожение имеет двухфазный характер. В течение первой фазы наблюдается активный рост бактерий, в среде идет накопление преимущественно органических кислот. Во второй фазе брожения снижается значение pH среды, рост бактерий замедляется, преобладает синтез нейтральных продуктов — ацетона, бутанола и этанола.

Двухфазность ацетонобутилового брожения связана с pH среды. Если кислотность среды в результате накопления органических кислот возрастает до pH 4,5 и более, происходит интенсивное образование нейтральных продуктов, что предупреждает дальнейшее подкисление среды, неблагоприятное для бактерий.

Ацетонобутиловые бактерии значительно более требовательны к среде, чем маслянокислые. Эти микроорганизмы нуждаются в готовых аминокислотах и витаминах (биотин и *n*-аминобензойная кислота).

Описанный вид брожения широко используют в промышленном производстве ацетона и бутанола из кукурузной муки и другого крахмалистого сырья. Ацетон применяют для производства искусственного шелка и кожи, фотографических пленок, искусственного цемента и других продуктов, бутанол — при производстве лаков. Газы, образующиеся при ацетонобутиловом брожении, идут на синтез метанола.

Смешанное брожение. Некоторые бактерии, главным образом представители кишечной микрофлоры, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae,* называемые *энтеробактериями,* могут осуществлять смешанное кислое и бутандиоловое брожение, при котором образуются ряд органических кислот, спирты, CO_2 и H_2. Энтеробактерии — факультативные анаэробы, они представляют собой грамотрицательные подвижные, неспорообразующие палочки.

К энтеробактериям относятся:

- *Escherichia coli* (кишечная палочка) — обитает в кишечнике человека и животных; бактерия может существовать в почве и воде, обнаружение ее в питьевой воде, молоке или другом субстрате служит показателем их загрязнения фекалиями;

- *Salmonella* — представители кишечной микрофлоры, патогенные микроорганизмы, возбудители кишечных инфекций и пищевых отравлений, обитают в почве и воде;
- *Shigella* — возбудители кишечных инфекций;
- *Yersinia* — возбудители чумы человека и животных;
- *Enterobacter, Serratia* и *Proteus,* представители которых в основном обитают в почве и воде, а также
- фитопатогенный род *Erwinia.*

Превращение углеводов у энтеробактерий идет по пути Эмбдена—Мейергофа—Парнаса. Основные продукты брожения — ацетат, сукцинат, лактат, этанол, глицерол, ацетон, 2,3-бутандиол, CO_2 и H_2. Продукты брожения, вызываемого представителями энтеробактерий, различаются в качественном и количественном отношении. Виды родов *Escherichia, Salmonella* и *Shigella* сбраживают сахара до лактата, ацетата, сукцината и муравьиной кислоты. Кроме того, образуются CO_2, H_2 и этанол. Представители родов *Enterobacter, Serratia* и *Erwinia* продуцируют меньше кислот, но больше CO_2, этанола и особенно большое количество 2,3-бутандиола (2,3-бутиленгликоля).

9.5. Окисление отдельных органических веществ

Окисление углеводородов. Углеводороды относят к группе химически стойких органических веществ, которые, однако, могут разлагать многие микроорганизмы. Возможность усвоения микроорганизмами парафинов доказана русским ученым *В. О. Таусоном.* Установлено, что разрушать углеводороды в природе могут представители родов *Arthrobacter, Methylomonas, Methylococcus, Pseudomonas, Flavobacterium, Streptococcus, Nocardia, Mycobacterium,* а также дрожжи рода *Candida* и ряд мицелиальных грибов. Окисляясь, углеводороды не только обеспечивают микроорганизмы энергией, но и служат материалом для синтеза структурных компонентов клетки.

Среди алифатических углеводородов, подвергающихся микробиологическому воздействию, наибольший интерес представляют газообразные углеводороды. Большинство микроорганизмов, развивающихся на углеводородах данной группы, принадлежат к родам *Methylomonas, Hyphomicrobium, Pseudomonas, Mycobacterium, Nocardia* и др. К облигатным окислителям метана относят представителей семейства *Methylomonadaceae,* родов *Methylomonas, Methylobacterium, Methylococcus, Methylosinus* и *Methylocystis.* Перечисленные виды принадлежат к группе метилотрофных микроорганизмов. Они окисляют метан до метилового спирта.

Известны бактерии, использующие такие газообразные углеводороды, как этан, пропан, бутан. Эти микроорганизмы предложено применять для разведки месторождений нефти и газа, а также для борьбы со скоплением метана в шахтах.

Известно большое число микроорганизмов, способных развиваться на алканах, имеющих от одного до 34 атомов углерода. Описаны виды, обитающие на циклических (нафтеновых) углеводородах. Хорошо изучены бактерии, усваивающие моноциклические (бензол, толуол, ксилол) и полициклические (нафталин, фенантрен, антрацен) ароматические углеводороды. Это представители родов *Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia,* дрожжи и др.

Окисление углеводородов с участием микроорганизмов обычно происходит при помощи адаптивных ферментов. Конечные продукты окисления углеводородов — диоксид углерода **и** вода, однако обнаруживаются и промежуточные продукты — спирты, органические кислоты, эфиры и другие соединения. Следовательно, микроорганизмы способны использовать углеводороды разных классов простого и сложного строения. Считают, что практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут разлагаться в результате жизнедеятельности микроорганизмов.

Ряд бактерий, усваивающих углеводороды, обладает способностью связывать молекулярный азот атмосферы. Микроорганизмы, усваивающие углеводороды, широко распространены в почвах. В последнее время этой группе микроорганизмов уделяется большое внимание в связи с возможностью использования их для очищения почв и водоемов от загрязнений нефтью и продуктами ее переработки.

Окисление жиров и **жирных кислот.** Жиры и жирные кислоты также подвергаются трансформации под влиянием микроорганизмов. Первая стадия расщепления жира — гидролиз, осуществляемый при действии фермента липазы. Сущность процесса может быть показана на примере тристеарина:

$$\underset{\text{Тристеарин}}{C_3H_5(C_{18}H_{35}O_2)_3} + 3H_2O \longrightarrow \underset{\text{Глицерин}}{C_3H_5(OH)_3} + 3\underset{\text{Стеариновая кислота}}{C_{18}H_{36}O_2}$$

Так же происходит разрушение жиров и другого химического состава. Образующиеся в результате гидролиза глицерин и жирные кислоты претерпевают дальнейшие превращения вплоть до полного окисления. Высокомолекулярные жирные кислоты труднорастворимы и окисляются очень медленно.

Жиры, как и другие составные части растительных тканей, расщепляются с участием микроорганизмов почвы. Разрушителями жиров служат многие аэробные и анаэробные бактерии и грибы.

Наиболее энергично воздействует на жиры *Pseudomonas fluorescens* — бесспоровая подвижная палочка, образующая на питательной среде зеленоватый пигмент. В разложении жира также участвуют *Pseudomonas pyacyanea, Serratia marcescens,* представители родов *Bacillus {B. mycoides, B. mesentericus), Clostridium (C. perfringens, C. sporogenes* и др.) и многие другие микроорганизмы. Перечисленные виды не только разлагают жир на глицерин и жирные кислоты, но и

окисляют последние до CO_2 и H_2O. В разложении жира и жирных кислот принимают участие мицелиальные грибы родов *Aspergillus, Penicillium* и др.

Окисление этилового спирта до уксусной кислоты. Этиловый спирт окисляется до уксусной кислоты под влиянием уксуснокислых бактерий родов *Gluconobacter* и *Acetobacter.* Это грамотрицательные хемоорганогетеротрофные, не образующие спор, палочковидные организмы, подвижные или неподвижные.

Уксуснокислые бактерии указанных родов различаются между собой по характеру жгутикования. У представителей рода *Gluconobacter* клетки двигаются при помощи трех—восьми полярных жгутиков, редко одного, есть и неподвижные формы. Для бактерий рода *Acetobacter* характерно перитрихальное жгутикование, но также есть и неподвижные виды.

Уксуснокислые бактерии — строгие аэробы, поэтому они развиваются только на поверхности среды. Им присуще и образование пленок — одни виды организмов образуют тонкие пленки, состоящие из одного слоя клеток, у других пленки более толстые, иногда напоминающие папиросную бумагу. Отдельные виды имеют слизистые, толстые пленки. Уксуснокислые бактерии отличаются высокой устойчивостью к кислотам (могут расти в среде с начальным pH 4, при оптимуме pH 5—6). Виды данной группы микроорганизмов обнаруживают на поверхности растений (цветков, плодов), на разлагающихся растительных остатках и т. д.

Характерная особенность уксуснокислых бактерий — способность превращать этиловый спирт в уксусную кислоту:

$$CH_3CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

Эти организмы используют для производства пищевого уксуса из вина и спирта. Два рода уксуснокислых бактерий различают по степени окисления органических субстратов. Так, бактерии рода *Acetobacter {A. peroxydans)* способствуют накоплению уксусной кислоты как промежуточного продукта и дальнейшему ее окислению до CO_2 и H_2O (бактерии еще называют переокислителями). Виды рода *Gluconobacter* (*G. oxydans)* вызывают образование уксусной кислоты как конечного продукта реакции, обычно не подвергающегося последующему окислению (бактерии называют недоокислителями). Способность видов рода *Acetobacter* окислять уксусную кислоту до CO_2 объясняется наличием в их обмене веществ цикла трикарбоновых кислот. Уксуснокислые бактерии способны окислять не только этиловый, но и другие спирты, в том числе алифатические многоатомные.

Кроме указанных окислительных процессов, уксуснокислые бактерии могут вызывать окисление сорбита до сорбозы, маннита до фруктозы, глюкозы до глюконовой кислоты, глюконовой кисло-

ты до кетоглюконовых кислот. Перечисленные превращения осуществляются по пентозофосфатному пути представителями рода *Gluconobacter.* Особый интерес представляет окисление уксуснокислыми бактериями D-сорбита до L-сорбозы. Последняя требуется в больших количествах для синтеза витамина С.

Интересно отметить, что представитель рода *Acetobacter* — *A. xylinum* при росте на среде с глюкозой или другими источниками углерода способен формировать внеклеточную слизистую пленку, состоящую из чистой целлюлозы. Целлюлозные фибриллы представляют собой рыхлую массу, окружающую клетки. В культуре этот организм образует пленку толщиной 1 см и более, состоящую из целлюлозы и бактериальных клеток.

Окисление углеводов до лимонной и других органических кислот. Углеводы могут окисляться до лимонной кислоты и других органических кислот. При рассмотрении процессов дыхания и брожения было отмечено, что некоторые микроорганизмы не полностью окисляют те или иные органические соединения. В этом случае происходит накопление продуктов неполного окисления — оксалата, цитрата, сукцината, фумарата, малата, аконитата, глюконата и других кислот. Подобные процессы часто вызывают грибы. Так, виды родов *Rhizopus* и *Mucor* вызывают окисление углеводов главным образом до малата, в небольших количествах до сукцината, фумарата, малата, ацетата и муравьиной кислоты, а также этанола; родов *Aspergillus* и *Penicillium* — до глюконата, оксалата и цитрата.

Микробиологический синтез цитрата, глюконата, *а*-кетоглутарата, сукцината, фумарата, малата и ряда других органических кислот обычно осуществляется при интенсивной аэрации. Перечисленные кислоты служат промежуточными продуктами метаболизма соединений углерода, в том числе цикла трикарбоновых кислот.

Большое практическое значение имеет микробиологическое получение цитрата из углеводов с использованием гриба *Aspergillus niger,* превращающего почти 60% глюкозы в лимонную кислоту. Возможность такого процесса была установлена С. П. Костычевым и В. С. Буткевичем. Сейчас разработан и промышленный способ микробиологического получения лимонной кислоты, необходимой в медицине, фармацевтической, пищевой и химической промышленности, а также при дублении кож, в печатном деле и т. д.

В процессе окисления глюкозы наряду с цитратом всегда образуется глюконат, причем выход последнего зависит от штамма гриба и от pH среды. Попутно выделяются оксалат и сукцинат.

В России, США и Японии налажено производство итаконовой кислоты на основе деятельности *Aspergillus terreus.* Итаконовая кислота — продукт превращения углеводов при участии и другого гриба рода *Aspergillus — A. itaconicus.* Итаконовую кислоту применяют в производстве синтетических смол, синтетических волокон, инсектицидов, красителей и других веществ.

В последнее время разработан способ получения цитрата из углеводородов (н-парафинов) с помощью дрожжей рода *Candida.* Указанные дрожжи используют также для получения изоцитрата, а-кетоглутарата, фумарата, малата и сукцината.

9.6. Разложение целлюлозы и других органических веществ микроорганизмами

В состав целлюлозы входит более 50% всего органического углерода биосферы, это наиболее распространенный полисахарид растительного мира, высшие растения на 40—70% состоят из целлюлозы. В связи с большим количеством синтезируемой в природе целлюлозы микроорганизмы, ее разлагающие, играют очень важную роль в процессе минерализации органического вещества и круговороте углерода.

Разнообразие микрофлоры, способной разлагать целлюлозу в почве, позволяет трансформировать это вещество в различных условиях аэрации, в кислой или щелочной среде при низких или высоких влажности и температуре. Для большинства микроорганизмов, разлагающих целлюлозу, характерна высокая специфичность по отношению к этому веществу. Разложение целлюлозы осуществляют аэробные микроорганизмы (бактерии и грибы) и анаэробные мезофильные и термофильные бактерии.

Аэробное разложение целлюлозы. Группа аэробных целлюлозоразлагающих микроорганизмов наиболее богато представлена в почве. В 1918 г. *Х. Б. Хутчинсон* и *Дж. Клейтон* выделили из почвы целлюлозоразлагающую бактерию, имеющую вид длинной веретенообразной палочки с острыми концами. Микроорганизму было дано название *Spirochaeta cytophaga.* Сейчас эту бактерию относят к семейству *Cytophagaceae,* роду *Cytophaga.* Впоследствии были описаны другие виды цитофаг. В настоящее время среди видов этого рода известны формы, разлагающие хитин (рис. 39).

Бактерии рода *Cytophaga* очень требовательны к условиям среды, обычно они в большом количестве встречаются в навозе и почвах, удобренных навозом. То же свойственно и представителям рода *Sporocytophaga,* разлагающим целлюлозу. Последние отличаются от видов рода *Cytophaga* способностью образовывать микроцисты.

В расщеплении целлюлозы принимают участие миксобактерии порядка *Myxobacteriales,* семейств *Myxococcaceae* (род *Myxococcus), Archangiaceae* (род *Archangium), Sorangiaceae* (роды *Sorangium* и *Polyangium),* широко распространенные в почвах разных климатических зон.

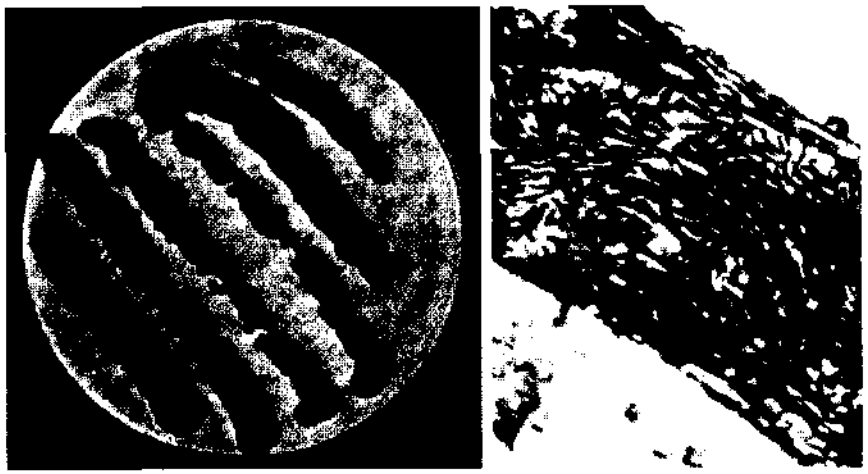


Рис. 39. Разложение фильтровальной бумаги в местах роста бактерий рода *Cytophaga* — *слева;* целлюлозное волокно, покрытое бактериями, — *справа* (по: С. Н. Виноградский)

В почвах встречаются представители рода *Cellulomonas.* Это аэробные грамположительные подвижные палочковидные бактерии неправильной формы; с возрастом они иногда превращаются в кокки. Бактерии данного рода участвуют в разложении целлюлозы в аэробных условиях, однако способны и к анаэробному развитию. Встречаются эти бактерии в почвах, богатых минеральными формами азота.

Могут усваивать целлюлозу единичные виды *Pseudomonas (P. fluorescens* var. *cellulosae)* и некоторых других бактерий. Актиномицеты и грибы, обитающие в относительно бедных, кислых почвах, в аэробных условиях медленно разрушают целлюлозу. К актиномицетам, разлагающим целлюлозу, относятся представители родов *Streptomyces {Streptomyces cellulosae), Streptosporangium, Micromonospora (Micromonospora chalcea);* к грибам — представители родов *Fusarium, Chaetomium,* а также отдельные виды — *Trichoderma viride, Aspergillus fumigatus, Botrytis cinerea, Rhizoctonia solani, Myrothecium verrucaria.* В разрушении целлюлозы участвуют и хитридиомицеты, среди которых много паразитов.

Анаэробное разложение целлюлозы. Большинство представителей анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий, найденных в природе, относят к семейству *Bacillaceae,* роду *Clostridium.* Эти виды обитают в почвах, компосте, навозе, речном иле и сточных водах. Клостридии устойчивы к кислотности и распространены не только в нейтральных, но и кислых почвах. Типичный представитель рода, участвующий в разложении целлюлозы при температуре

30—40 °С, — *Clostridium omelianskii.* Впервые вид выделен известным микробиологом В. Л. Омелянским в 1902 г. Этот микроорганизм имеет палочковидную форму (4—8 х 0,3—0,5 мкм), подвижен. Для него характерны толстые споры, поэтому спорообразующая клетка сильно раздувается и становится похожей на барабанную палочку. Разлагать целлюлозу может и другой мезофильный вид — *C. cellobioparum.*

Среди анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий, встречающихся в почве, навозе и компостах, есть и термофилы. Они активно сбраживают целлюлозу. Так, оптимальная температура для развития С. *thermocellum* около 60 °С, биологический максимум приближается к 70 °С; при 40, 45 °С эта бактерия развивается слабо. К термофильным целлюлозоразлагающим анаэробам относится и вид *Thermoanaerobacter ethanolicus,* выделенный из горячих источников. Мезофильные и термофильные анаэробные бактерии хорошо используют целлюлозу, но на обычных средах, содержащих простые сахара, они развиваются слабо, плохо переносят даже незначительно повышенные концентрации Сахаров.

В рубце жвачных животных обитают специфичные облигатные анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии. Они вызывают разложение целлюлозы кормов до глюкозы, которая затем сбраживается с образованием органических кислот (уксусной, пропионовой, масляной, молочной, муравьиной, янтарной и др.), спиртов и газов (CO_2 и H_2). Разложение целлюлозы в рубце животных осуществляется при участии кокковидных и палочковидных бактерий: *Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Bacteroides succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Ruminobacter parvum.* Бактерии рубца очень важны для нормального питания жвачных животных.

Кратко остановимся на биохимической стороне процесса распада целлюлозы. Это линейный гомополисахарид, состоящий из соединенных β-1,4-гликозидными связями глюкозных остатков. Молекулярная масса полисахарида — до 500 000. В молекуле целлюлозы может содержаться до 14 000 молекул β-D-глюкозы. Целлюлозные волокна представляют собой пучки микрофибрилл и мицеллы (кристаллиты) — весьма плотно упакованные цепочки макромолекул, чередующиеся с некристаллическими или паракристаллическими участками. Последние в первую очередь подвергаются воздействию ферментов микроорганизмов.

Разложение целлюлозы с помощью микроорганизмов проходит в несколько этапов. Сначала идет ферментный гидролиз полимера. Ферментная система, осуществляющая разложение целлюлозы до глюкозы, носит название целлюлазного комплекса. В его состав входят: эндо- β-1,4-глюканаза (1,4- β-D-глюкан-4-глюкогидролаза), экзо-1,4- β-глюканаза (целлобиогидролаза), экзо-1,4- β-глюкозидаза (1,4-D-глюкан-глюкогидролаза), целлобиаза (β-глюкозидаза).

Процесс расщепления целлюлозы протекает следующим образом: при действии на целлюлозу фермента эндоглюконазы образуются олигосахара различной степени полимеризации, а также целлобиоза. Затем под влиянием эндоглюканазы и целлобиогидролазы олигосахара гидролизуются до целлобиозы. Целлобиаза катализирует расщепление целлобиозы на две молекулы глюкозы. Все ферменты целлюлазного комплекса бактерий, за исключением целлобиазы, внеклеточные. При аэробном разложении целлюлозы из образовавшейся глюкозы в основном получается два продукта — CO_2 и H_2O. Могут накапливаться и небольшие количества органических кислот.

В последние годы у ряда анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий были обнаружены на поверхности клеток высокомолекулярные мультисубъединичные протуберантные структуры, ответственные за разложение целлюлозы, получившие название целлюлосом. Это связанный с поверхностью клетки комплекс, содержащий набор целлюлолитических ферментов, а также белки, не имеющие ферментной активности. Входящие в комплекс ферменты представлены эндоглюканазами, а также ферментами, играющими основную роль в разложении целлюлозы. Комплекс обеспечивает прикрепление клеток к целлюлозе и ее высокоэффективный гидролиз.

При анаэробном распаде целлюлозы первоначальный продукт ее гидролиза — глюкоза в дальнейшем подвергается сбраживанию, в результате чего возникает много органических веществ, состав которых различается у отдельных культур микроорганизмов:

Мезофилы:	
Clostridium omelianskii	Этанол, уксусная, молочная и муравьиная кислоты, CO_2, H_2
C. dissolvens	Этанол, уксусная, молочная и масляная кислоты, CO_2, H_2
C. cellobioparum	Этанол, уксусная, муравьиная и молочная кислоты, CO_2, H_2
Термофилы:	
C. thermocellum	Этанол, уксусная, молочная, муравьиная кислоты, CO_2, H_2
Thermoanaerobacter ethanolicus	Этанол

Раньше считали, что при брожении целлюлозы образуется метан CH_4. Однако позднее было показано, что метан выделяется не в результате деятельности бактерий, использующих полисахариды, а вследствие жизнедеятельности вторичного бактериального населения — микробного сообщества, утилизирующего продукты разложения целлюлозы. В конце этой пищевой цепи находятся метаногены (архебактерии), продуктом жизнедеятельности которых является метан.

Имеющиеся в растениях моно- и дисахариды, а также низкомолекулярные полисахариды (крахмал, инулин, камеди и т. п.) легко разрушаются различными микроорганизмами.

Разложение гемицеллюлозы. Гемицеллюлозы наряду с лигнином и пектинами входят в состав межклеточного вещества растительных тканей, в значительных количествах содержатся в древесине, соломе, кукурузных початках и т. д. Как и целлюлоза, они присутствуют в клеточной стенке. Кроме растений, гемицеллюлозы обнаружены у грибов и дрожжей, входят в состав внеклеточных полисахаридов.

Гемицеллюлозы — гетерополисахариды, состоящие из пентоз (ксилозы, арабинозы) или гексоз (глюкозы, маннозы, галактозы), что отражено в их названиях: пентозаны (ксилан или арабан), маннаны, галактаны и т. д. Ксилан — полимер ксилозы — по содержанию в растениях занимает второе место после целлюлозы. Солома и луб содержат до 30% ксилана, древесина хвойных — 7—12, лиственных пород — 20—25%. Молекулы ксилана состоят из остатков β-D-ксилозы, соединенных 1,4-гликозидными связями. Многие гемицеллюлозы содержат также уроновые кислоты.

Перечисленные вещества активно разлагаются грибами, аэробными и анаэробными бактериями. В этих процессах участвует значительно больше видов микроорганизмов, чем в разложении целлюлозы. Многие из них не очень специфичны и кроме полисахаридов способны усваивать органические кислоты и многие простые сахара.

Микробное население, участвующее в разложении гемицеллюлоз растений, очень разнообразно. Это связано с неодинаковым химическим составом указанных полисахаридов у разных растений, что оказывает влияние и на характер конечных продуктов распада. К микроорганизмам, обладающим гемицеллюлозоразлагающими свойствами, относят бактерии родов *Clostridium, Bacillus, Cytophaga, Sporocytophaga* (например, *Sporocytophaga myxococcoides), Vibrio, Streptomyces;* грибы родов *Aspergillus, Rhizopus, Forties, Polyporus* и др. Гемицеллюлозы в кислых почвах обычно разлагают грибы, в нейтральных и щелочных — бациллы, *Sporocytophaga* и ряд других бактерий.

Большая молекулярная масса гемицеллюлоз не позволяет их молекулам проникать через цитоплазматическую мембрану бактериальной клетки. Молекулы должны быть превращены в простые соединения сахара, и только тогда микроорганизмы смогут их использовать.

Ферменты, катализующие расщепление гемицеллюлоз, носят название гемицеллюлаз (ксиланаз). Многие микроорганизмы, обладающие способностью к синтезу целлюлазного комплекса, имеют и ксиланазу.

Первое время, после того как растительные остатки попадают в почву, гемицеллюлозная фракция полисахаридов разлагается со значительной скоростью, затем процесс замедляется. Это, вероятно,

результат химической гетерогенности гемицеллюлозных фракций: одни разлагаются медленнее, другие — быстрее. Скорость превращения гемицеллюлоз микроорганизмами почвы зависит и от условий среды — температуры, влажности, pH среды и т. д.

Разложение лигнина. Растения, особенно древесные, содержат большое количество лигнина во вторичных слоях клеточной оболочки и как основной компонент в составе межклеточного вещества и вторичных слоях клеточной стенки. В молодых растениях количество лигнина относительно невелико, но с возрастом его содержание в тканях увеличивается. Молодые травы содержат от 3 до 6% лигнина (на сухое вещество), древесина разных деревьев — от 18 до 30%. Вероятно, это соединение никогда не встречается в свободном виде, обычно оно связано с полисахаридами.

Лигнин, содержащийся в растениях разных видов, родов и семейств растительного царства, химически неоднороден. Даже в одном растении в зависимости от фазы развития химический состав лигнина может меняться.

Молекулярная масса лигнина 1000—10 000, он нерастворим в воде и в большинстве органических растворителей. Молекула лигнина содержит только три элемента — углерод, водород и кислород, однако это весьма сложное соединение, состоящее из большого числа полимеризованных мономерных блоков, которые представляют собой производные фенилпропана. Главный мономер лигнина — конифериловый спирт, он составляет скелет лигнина хвойных пород. Лигнин лиственных пород состоит из конифери лового и синапового спиртов, лигнин злаковых растений имеет еще и кумаровый спирт.

Лигнин устойчив к воздействию микроорганизмов, разлагается значительно медленнее, чем целлюлоза и гемицеллюлоза. В аэробном разложении лигнина могут принимать участие многие представители класса *Basidiomycetes*. Так, при умеренной температуре лигнин усваивают многие высшие грибы родов *Clavaria, Armillariella, Fomes, Polystictus, Polyporus* и *Ustilina*. Активны по отношению к лигнину *Fusarium lactis, F. nivala, Trichoderma lignorum, Alternaria tenuis, Stremphylium botryosum*.

В почве есть аэробные бактерии рода *Pseudomonas,* участвующие в термофильном разложении лигнина. Бактерии рода *Clostridium* разлагают это соединение в анаэробных условиях. Считают, что лигнин может трансформироваться и актиномицетами.

Лигнин деполимеризуется до простых ароматических веществ, таких, как ванилин и другие метоксилированные ароматические структуры. Ферментная система микроорганизмов, воздействующих на лигнин, внеклеточная и представлена лигниназами — специфичными пероксидазами. В связи с тем что лигнин разрушается

относительно медленно, он накапливается в почве, и продукты разложения служат основой при образовании гумусовых веществ.

Разложение пектиновых веществ. Межклеточные вещества растительных тканей — пектины — найдены в так называемых срединных пластинках, расположенных между отдельными клетками тканей растений. Первичные и вторичные клеточные стенки также содержат полисахариды пектинового типа. Пектиновые вещества — сложные полисахариды, полигалактуроniды, это неразветвленные полимеры, состоящие из остатков D-галактуроновых кислот, соединенных 1,4-гликозидными связями.

Существуют три типа пектиновых веществ: *протопектин* — водонерастворимая составная часть клеточной стенки; *пектин* — водорастворимый полимер галактуроновой кислоты, содержащей метилэфирные связи; *пектиновая кислота* — водорастворимый полимер галактуроновой кислоты, свободный от метилэфирных связей. Пектиновая кислота образована длинными цепочками галактуроновых кислот, способных после обработки кальциевыми солями к формированию твердого пектинового геля.

Бактерии и грибы воздействуют на пектин, протопектин и пектиновую кислоту в аэробных и анаэробных условиях. В почве обнаружено большое число микроорганизмов, разлагающих пектиновые вещества (до 1 млн клеток на 1 г почвы). Высокой пектинолитической активностью обладают представители семейства *Bacillaceae* — аэробные бактерии рода *Bacillus (B. macerans, B. polymyxa)* и анаэробные рода *Clostridium (C. pectinovorum, C. felsineum, C. aurantibutyricum, C. pectinolyticum, C. corallinum, C. flavum* и др.), а также многие грибы. Пектины разлагаются и под влиянием фитопатогенных грибов *(Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum* f. *lycopersici)* и бактерий *Erwinia carotovora),* использующих эту свою способность для проникновения в ткани растений.

Микроорганизмы синтезируют следующие экзоферменты (эстеразы и деполимеразы), катализующие распад пектиновых веществ:

- *протопектиназу,* участвующую в разложении протопектина с образованием растворимого пектина;
- *пектинэстеразу,* гидролизующую метилэфирную связь пектина с образованием пектиновой кислоты и метилового спирта;
- *пектиназу* (полигалактуроназу), разрушающую связи между отдельными составляющими галактуроновой кислоты, пектина или пектиновой кислоты с образованием небольших цепочек и в конечном счете свободной D-галактуроновой кислоты.

При гидролизе пектиновой кислоты пектиназой на первых этапах аккумулируются только небольшие количества свободной D-галактуроновой кислоты. Обычно при участии ферментов разла-

гаются ди-, три-, тетра- и пентагалактуроновые кислоты. В последующих этапах гидролиза длинные молекулы распадаются под влиянием каталитической деятельности пектиназы и накапливаются свободная D-галактуроновая кислота и другие соединения.

Распад пектиновой кислоты может быть выражен следующей схемой:

$$\underset{\text{Пектиновая кислота}}{C_{46}H_{68}O_{40}} + nH_2O \longrightarrow \underset{\text{Галактуроновая кислота}}{CHO(CHOH)_4COOH} + \underset{\text{Галактоза}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Ксилоза}}{C_5H_{10}O_5} +$$

$$+ \underset{\text{Арабиноза}}{C_5H_{10}O_5} + \underset{\text{Метанол}}{CH_3OH} + \underset{\text{Уксусная кислота}}{CH_3COOH}$$

Продукты распада пектиновой кислоты (галактоза, арабиноза и др.) подвергаются окислению или сбраживанию при воздействии разнообразных микроорганизмов. При анаэробиозе это маслянокислые бактерии, относящиеся к роду *Clostridium (C. pectinovorum, C. felsineum* и др., рис. 40). Продуктами распада *C. pectinovorum* служат масляная и уксусная кислоты, а также газы H_2 и CO_2, а в культуре *C. felsineum* кроме указанных веществ образуется и небольшое количество ацетона и бутанола.

Разложение пектиновых веществ наблюдается при мочке лубоволокнистых растений — льна, конопли, кенафа, джута, канатника и др. Целлюлозные волокна указанных растений склеены с окружающими их тканями пектином. Для отделения волокон необходимо разложение пектина, для чего используют пектинолитическое действие ферментов анаэробных бактерий.

При водной мочке после погружения в воду стебли льна набухают. При этом экстрагируются водорастворимые вещества (сахара, глюкозиды, таннины, растворимые соединения азота и пигменты) и начинают развиваться бактерии. Сначала размножаются аэробные формы, так как вода содержит кислород и питательные вещества, способствующие их развитию. Дрожжи и плесневые грибы развиваются на поверхности среды. Поглощение аэробными микроорганизмами из жидкости кислорода обусловливает создание в среде анаэробных условий. Начинают развиваться факультативно анаэробные бесспоровые бактерии, близкие к *Escherichia coli.* Постепенно в среде накапливаются органические кислоты (в том числе молочная) и выделяются газы CO_2 и H_2.

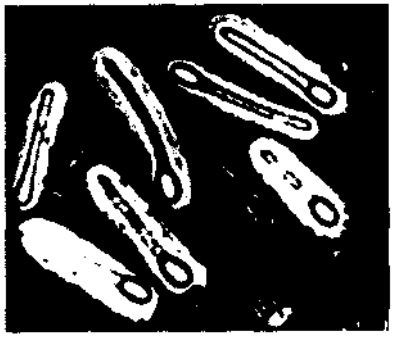


Рис. 40. Клетки *Clostridium pectinovorum*, × 4000 (по: С. Робинову)

Отделение волокон происходит во время основной стадии брожения, когда анаэробные бактерии

типа *C. pectinovorum* начинают расщеплять пектин. Накопление органических кислот приводит к прекращению деятельности *C. pectinovorum*. Последнего сменяет более кислотоустойчивый микроорганизм *C. felsineum*. В результате воздействия ферментов микроорганизмов двух указанных видов на пектиновые вещества паренхимной ткани от коры и древесины отделяются пучки волокон.

На льнозаводах тепловую мочку льноволокна выполняют в особых чанах — мочилах при 32—38 °С в течение трех—пяти суток. Для ускорения мочки и увеличения выхода длинного волокна предложен препарат пектолитин, содержащий споры активного пектинразлагающего микроорганизма — *C. felsineum.* Внесение пектолитина в мочильную жидкость приводит к ускорению процесса в среднем на 27%, повышается и выход длинного волокна, его качество. В производство льняного волокна внедряют также препараты пектолитических ферментов.

Применяют и аэробную мочку льна и других лубоволокнистых культур. В этом случае пектиновые вещества разрушаются аэробными микроорганизмами. Предварительно пектиновые вещества гидролизуются до галактуроновых кислот, галактозы, арабиночы, ксилозы, уксусной кислоты и метанола, а затем начинается окисление (бактериями, дрожжами, грибами) возникших соединений до CO_2 и H_2O.

Существует несколько способов аэробной мочки льна. *Расстил,* или *росяная мочка,* — самый старый и наиболее примитивный биологический способ получения волокна. При этом лен в осеннее время года расстилают на траве. Широкий доступ воздуха, систематичное и порой длительное отсутствие влаги, воздействие света и атмосферных осадков, суточные колебания температуры обусловливают длительность процесса (три—восемь недель) и преобладание в нем не бактерий, а плесневых грибов. Насчитывают до 80 видов грибов, участвующих в росяной мочке. Первое время после расстила стеблей на траве наблюдается развитие бактерий, а затем преобладают грибы — *Rhizopus, Aureobasidium, Alternaria* и *Gonatobotrys.* Развитие перечисленных представителей грибов указывает на оптимальную степень мочки льносоломы. Видовой состав микрофлоры при мочке определяется географическими и почвенно-климатическими условиями. При мочке расстилом существует опасность, что многие грибы (например, *Cladosporium herbarum, Trichoderma lignorum),* появляющиеся на льносоломе после *Rhizopus, Alternaria* и других, разрушат целлюлозу, т. е. волокно. Особенно часто это происходит при перележивании разостланной соломы.

В благоприятных атмосферных условиях (теплая и влажная погода), сочетающихся с тщательным уходом за соломой (защита от спутывания, переворачивание рядков, своевременная уборка со стлища), расстил дает вполне удовлетворительное по качеству и выходу волокно.

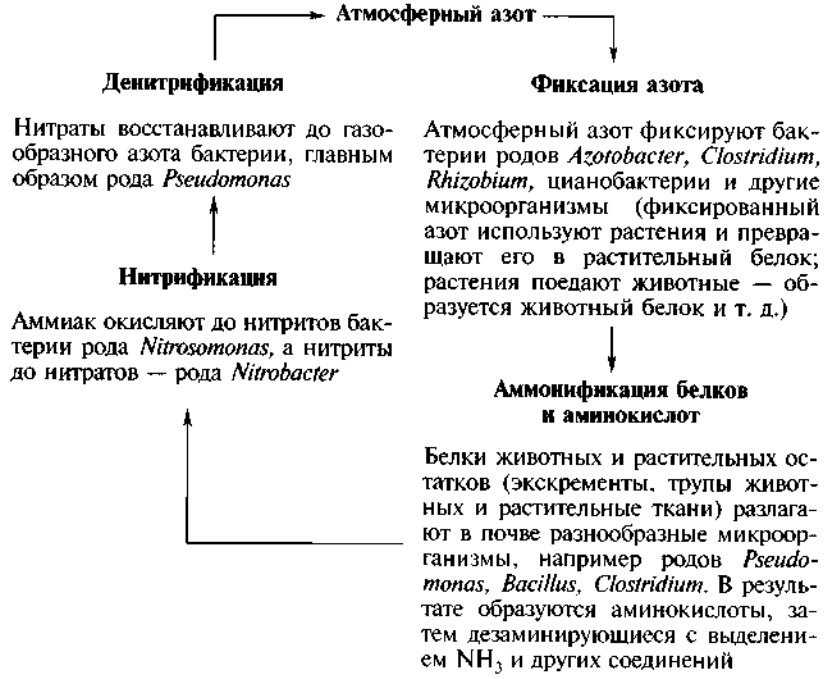
Контрольные вопросы и задания

1. Какие микроорганизмы служат возбудителями молочнокислого брожения? 2. В чем сущность пропионовокислого брожения? 3. Чем отличается окисление углеводов при участии микроорганизмов от различного типа брожений?

Глава 10 Превращение микроорганизмами соединений азота

От азотного питания растений во многом зависит величина урожая сельскохозяйственных культур. Большинству растений недоступен газообразный азот, в огромном количестве находящийся в воздухе, а из разнообразных азотных соединений, встречающихся в почве, они могут усваивать только минеральные. Поэтому столь важен вопрос о превращениях соединений азота в почве под воздействием микроорганизмов.

Превращения азота и содержащих этот элемент соединений в почве довольно сложны, но в них можно выделить основные направления, определяющие круговорот азота в природе:



Некоторую часть атмосферного азота связывают свободноживущие или находящиеся в симбиозе с растениями микроорганизмы. Данный процесс обогащает азотом и почву, и растения. Органические азотсодержащие соединения в тканях растений и животных, попадая в почву, подвергаются минерализации до аммонийных соединений. Часть растительных остатков трансформируется в темноокрашенное, содержащее азот вещество, — гумус.

Аммонийная форма азота подвергается в почве окислению нитрифицирующими бактериями с образованием солей азотной кислоты. При определенных условиях нитраты могут восстанавливаться до молекулярного азота и улетучиваются из почвы. Значительное количество азотсодержащих соединений микроорганизмы ассимилируют, а азот в органических формах практически недоступен растениям.

Приведенные примеры показывают, что микроорганизмы способны вызывать как мобилизационные процессы и накапливать доступные для растений минеральные азотсодержащие вещества, так и диаметрально противоположные им — иммобилизационные, обедняющие почву ценными для растений соединениями.

10.1. Минерализация азота

Среди органических соединений, составляющих клетку, первое место по количеству занимают белки — на их долю приходится не менее 50% сухой массы клетки. Значительная часть белков попадает в почву с остатками отмерших растений, животных и микроорганизмов. При разложении белков и других азотсодержащих соединений в почве при участии микроорганизмов азот освобождается в виде аммиака. Указанный процесс называют **аммонификацией,** или **минерализацией азота.**

Белки подвергаются разложению как аэробными, так и анаэробными бактериями, а также актиномицетами и грибами. Особенно активны представители семейства *Pseudomonadaceae,* рода *Pseudomonas (P. fluorescens, P. aeruginosa),* семейства *BacШaceae,* рода *Bacillus (B. mycoides, B. cereus, B. subtilis)* и рода *Clostridium* (С. *sporogenes, C. putrificus)* (рис. 41), семейства *Enterobacteriaceae,* рода *Proteus (P. vulgaris)* и др.

В состав белков обычно входит 20 ос-аминокислот. Аминокислоты в полимерной цепи белка располагаются так, что конец одной аминокислоты связан с началом другой пептидной связью. Такие полимерные молекулы, называемые полипептидными цепями, содержат до сотен аминокислотных звеньев. Белковая молекула включает одну или несколько полипептидных цепей. По составу белки подразделяют на простые и сложные. При гидролизе простых бел-

Рис. 41. Аммонифицирующие бактерии:
А — Bacillus sp.; Б — Bacillus cereus; В — Clostridium sp. (по: С. Робиноу)

ков образуются только аминокислоты, сложных — как аминокислоты, так и другие органические и неорганические продукты. Небелковая (не содержащая аминокислот) часть молекулы сложного белка — это его простетическая группа. В зависимости от ее состава сложные белки называют нуклеопротеидами, липопротеидами, металлопротеидами и гликопротеидами.

Молекулы белков и большинства пептидов велики и не могут проходить через цитоплазматическую мембрану микроорганизмов. Поэтому они расщепляются экзоферментами. Протеолитические ферменты, или *протеазы,* выделяемые клетками микроорганизмов в окружающую среду, осуществляют гидролиз ряда пептидных связей в молекулах белков. Образующиеся при этом частицы белковой молекулы (полипептиды и олигопептиды) поступают внутрь клеток микроорганизмов, где разрушаются внутриклеточными протеолитическими ферментами — *пептидазами* до свободных аминокислот. Последние используются для синтеза белков клетки или подвергаются дальнейшему расщеплению.

Внутриклеточное или внеклеточное расщепление аминокислот может идти следующими четырьмя путями:

1) *дезаминирование*

$$RCH_2CHNH_2COOH \longrightarrow RCH = CHCOOH + NH_3$$

2) *окислительное дезаминирование*

$$RCHNH_2COOH + {}^1/_2O_2 \longrightarrow RCOCOOH + NH_3$$

3) *восстановительное дезаминирование*

$$RCHNH_2COOH + 2H \longrightarrow RCH_2COOH + NH_3$$

4) *декарбоксилирование*

$$RCHNH_2COOH \longrightarrow RCH_2NH_2 + CO_2$$

Аминокислоты минерализуются с различной скоростью. Некоторые из них (треонин, метионин) более устойчивы, другие (аргинин, триптофан), наоборот, разлагаются легко. После дезаминирования углеродный остаток подвергается воздействию микробов к аэробных или анаэробных условиях до образования CO_2 и различных органических соединений. Если в среде есть амиды, то первоначально они разлагаются до аминокислот и только затем уже могут быть трансформированы тем или иным путем. Например, аспарагин под действием фермента аспарагиназы превращается в аспарагиновую кислоту:

$$\underset{\text{Аспарагин}}{(H_2N)COCH_2CHNH_2COOH} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{Аммиак}}{NH_3} + \underset{\text{Аспарагиновая кислота}}{HOOCCH_2CHNH_2COOH}$$

При аэробном распаде белка основными конечными продуктами процесса бывают CO_2, аммиак, сульфаты и вода. В анаэробных условиях при распаде белка образуются аммиак, амины, CO_2, органические кислоты (жирные и ароматические — бензойная, феруловая и др.), меркаптаны, а также вещества с неприятным запахом — индол, скатол и сероводород.

При анаэробном разрушении белков могут образовываться токсичные соединения, в частности первичные амины (диамины) или птомаины. К числу последних относят кадаверин, который получается из лизина:

$$\underset{\text{Лизин}}{NH_2CH_2(CH_2)_3CHNH_2COOH} \longrightarrow \underset{\text{Кадаверин}}{NH_2CH_2(CH_2)_3CH_2NH_2} + CO_2$$

Накапливающиеся в анаэробных условиях в почве продукты разложения белков фитотоксичны, поэтому они нередко угнетающе действуют на растения и снижают урожайность.

При разрушении сложных белков сначала освобождаются основные составляющие — белок и связанная с ним простатическая

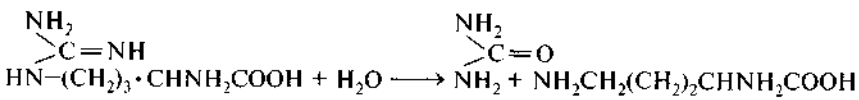
группа. В дальнейшем эти соединения (каждое самостоятельно) подвергаются более глубокой трансформации.

Разложение нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты входят в состав нуклеопротеидов. Последних особенно много в клеточных ядрах. Нуклеиновые кислоты — РНК и ДНК — органические вещества большой молекулярной массы, представляющие собой полимеры. При их гидролизе освобождаются пуриновые и пиримидиновые соединения, сахар и фосфорная кислота. Сахар в **РНК** представлен рибозой, в ДНК — дезоксирибозой. Пурины — аденин и гуанин найдены как в молекулах **РНК,** так и в молекулах ДНК. Из пиримидинов — цитозин обнаружен в РНК и ДНК, урацил только в РНК, а тимин — только в ДНК.

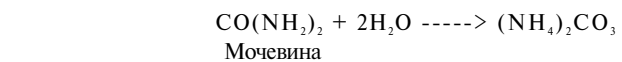
Длинные молекулы нуклеиновых кислот при разложении деполимеризуются. Сначала отщепляются небольшие фрагменты, которые затем распадаются на отдельные мононуклеотиды. Процесс расщепления идет при участии ферментов рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, синтезируемых некоторыми видами грибов, актиномицетами и рядом бактерий. На следующем этапе от мононуклеотидов под воздействием нуклеотидаз отщепляется фосфорная кислота, затем — сахар, пуриновые и пиримидиновые основания.

В зависимости от типа обмена веществ микроорганизмов сахар в дальнейшем может окисляться кислородом до CO_2 и H_2O или подвергаться брожению с образованием органических кислот и спиртов. Азотсодержащие основания разлагаются до мочевины и аминокислот и в конце концов до аммиака и органических кислот.

Разложение мочевины. К азотсодержащим органическим соединениям, часто встречающимся в природе, относятся мочевина, мочевая и гиппуровая кислоты. Мочевина присутствует в моче человека и животных, ее могут синтезировать почвенные грибы. Так, до 13% сухой массы плодовых тел шампиньонов составляет мочевина. Это же соединение образуется при гидролитическом распаде аргинина под действием фермента аргиназы:



На земном шаре за год организмы синтезируют до 30 млн т мочевины, что составляет существенные ресурсы азота: мочевина содержит 46% этого элемента и используется как удобрение. Под действием микроорганизмов, содержащих фермент уреазу, мочевина в несколько этапов превращается в аммиак и диоксид углерода:



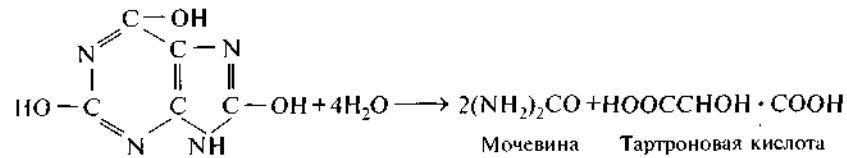
Образующаяся на первом этапе углеаммиачная соль малоустойчива и быстро разлагается:

$$(NH_4)_2CO_3 = 2NH_3 + CO_2 + H_2O$$

Многие бактерии и грибы, синтезирующие уреазу, могут использовать мочевину как источник азота для синтеза белков. Обычно бактерии, разлагающие мочевину, называют уробактериями. Эти организмы могут развиваться при высокой щелочности среды (pH 9—10), что позволяет им вызывать распад значительного количества мочевины до аммиака. Из специфических уробактерий наиболее важны: *Micrococcus urea* из семейства *Micrococcaceae, Bacillus pasteurii* из семейства *Bacillaceae,* а также *Sporosarcina urea.*

Физиологический смысл распада мочевины, по-видимому, сводится к переводу аминной формы азота в более легкоусвояемую аммиачную.

Разложение мочевой и гиппуровой кислот. Мочевая и гиппуровая кислоты также играют важную роль в белковом обмене млекопитающих, пресмыкающихся, насекомых и птиц. В экскрементах змей содержится до 90% мочевой кислоты, а в помете птиц — 25%. В моче млекопитающих содержание мочевой кислоты незначительно. Мочевая и гиппуровая кислоты быстро распадаются под влиянием гидролитических ферментов ряда микроорганизмов:



Разложение мочевой кислоты в местах скопления помета птиц (гуано) в условиях засушливого климата приводит к накоплению нитратов. Образующийся в таких местах в массе аммиак подвергается окислению нитрифицирующими бактериями. В связи с низкой влажностью нитраты из гуано не вымываются, а накапливаются. Все это обусловило возникновение богатых залежей нитратов в Чили, Перу, Южной Африке и на островах Карибского моря. Гуано содержит 9% азота, 13% фосфорной кислоты, калий, кальций, различные микроэлементы, поэтому используется как удобрение в сельском хозяйстве.

Разложение цианамида кальция. Цианамид кальция ($CaCN_2$) используют как азотное удобрение, которое растения самостоятельно не ассимилируют, но в почве оно быстро превращается в аммиак. Разложение цианамида кальция проходит в три этапа. Первый протекает самопроизвольно под влиянием почвенной влаги до образования цианамида. Ряд почвенных катионов (Ca, Mn, Fe и т. д.)

вызывает превращение цианамида в мочевину. Далее гидролиз мочевины происходит под влиянием уробактерий:

$$CaCN_2 + 2H_2O \longrightarrow H_2CN_2 + Ca(OH)_2$$
$$H_2CN_2 + H_2O \longrightarrow CO(NH_2)_2$$
$$CO(NH_2)_2 + H_2O \longrightarrow 2NH_3 + CO_2$$

Разложение хитина. Разложение хитина осуществляют многие почвенные микроорганизмы, он постоянно присутствует в почве. Это азотсодержащий полисахарид, полимер ацетилглюкозамина. Хитин содержится в наружном скелете беспозвоночных животных, в панцирных покровах насекомых, в клеточной стенке многих грибов, в частности базидиомицетов и аскомицетов.

Способностью разлагать хитин обладают около 50 видов бактерий родов *Pseudomonas, Flavobacterium, Bacillus, Cytophaga, Streptomyces, Nocardia* и *Micromonospora*. Из грибов активно воздействуют на это вещество мукоровые грибы и аспергиллы *(Aspergillus fumigatus),* а также *Mortierella*. Особенно легко разлагается хитин актиномицетами. Известны и миксобактерии, усваивающие хитин, например скользящая бактерия *Chitinophaga pinensis.*

Под действием синтезируемого микроорганизмами фермента хитиназы хитин вначале разлагается на хитобиозу и хитотриозу, попутно образуется небольшое количество N-ацетилглюкозамина. Затем хитобиоза и хитотриоза расщепляются в присутствии хитобиазы до уксусной кислоты, глюкозы и аммиака.

10.2. Нитрификация

Аммиак, образующийся в почве, навозе и воде при разложении органических веществ, довольно быстро окисляется до азотистой, а затем азотной кислоты. Такой процесс называют **нитрификацией.**

До середины XIX в., точнее, до работ Л. Пастера явление образования нитратов объясняли как химическую реакцию окисления аммиака атмосферным кислородом, причем предполагалось, что почва в этом процессе играет роль катализатора. Л. Пастер предположил, что образование нитратов — микробиологический процесс. Первые экспериментальные доказательства его гипотезы были получены Т. Шлезингом и А. Мюнцем в 1879 г. Исследователи пропускали сточные воды через длинную колонку с песком и $CaCO_3$. При фильтрации аммиак постепенно исчезал и появлялись нитраты. Нагревание колонки или внесение антисептиков прекращало окисление аммиака.

Однако выделить культуры возбудителей нитрификации не удалось ни упомянутым исследователям, ни микробиологам, продолжавшим изучение нитрификации. Лишь в 1890—1892 гг. С. Н. Виноградский, применив особую методику, изолировал чистые культуры нитрификаторов. Ученый предположил, что нитрифицирующие бактерии не растут на обычных питательных средах, содержащих органические вещества, это объяснило неудачи его предшественников.

Действительно, нитрификаторы оказались хемолитоавтотрофами, т. е. бактериями, использующими энергию окисления аммиака или азотистой кислоты для синтеза органических веществ из CO_2 (хемосинтез). Поэтому их клетки очень чувствительны к присутствию в среде органических соединений. Нитрифицирующие бактерии удалось выделить на минеральных питательных средах.

С. Н. Виноградский установил, что существуют две группы нитрификаторов: одна осуществляет окисление аммиака до азотистой кислоты ($NH^+_4 \longrightarrow NO^-_2$) — первая фаза нитрификации, другая — окисление азотистой кислоты до азотной ($NO^-_2 \longrightarrow NO^-_3$) — вторая фаза нитрификации.

Представителей обеих групп относят к семейству *Nitrobacteriaceae.* Это одноклеточные грамотрицательные бактерии. Среди нитрифицирующих бактерий есть палочковидные клетки, эллиптические, сферические, извитые и дольчатые, плеоморфные. Размеры клеток колеблются от 0,3 до 1 мкм в ширину и от 1 до 3 мкм в длину. Существуют подвижные и неподвижные формы с полярным, субполярным и перитрихальным жгутикованием.

Размножаются бактерии-нитрификаторы в основном делением, за исключением *Nitrobacter,* для которого характерно почкование. Почти у всех нитрификаторов хорошо развита система внутрицитоплазматических мембран, значительно различающихся по форме и расположению в клетках отдельных видов. Мембраны цитоплазмы подобны мембранам фотосинтезирующих пурпурных бактерий.

Бактерии первой фазы нитрификации представлены родами: *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus* и *Nitrosovibrio.* Наиболее детально к настоящему времени изучен *Nitrosomonas europaea* (рис. 42, *А).* Он представляет собой короткие овальные палочки размером 0,8—1 х 1—2 мкм. В жидкой культуре клетки *Nitrosomonas* проходят ряд стадий развития. Две основные из них представлены подвижной формой и неподвижными зооглеями. Подвижная форма обладает субполярным жгутиком или пучком жгутиков.

Описаны представители и других родов бактерий, вызывающих первую фазу нитрификации.

Вторую фазу нитрификации осуществляют представители родов *Nitrobacter, Nitrospira* и *Nitrococcus.* Наибольшее число исследований проведено с *Nitrobacter winogradskyi* (рис. 42, *Б),* однако описаны и другие виды (например, *Nitrobacter agilis).* Клетки нитробактера имеют удлиненную, клиновидную или грушевидную форму, более узкий конец часто загнут в клювик, размеры клеток — 0,6—0,8 х 1—2 мкм. При почковании дочерняя клетка обычно подвижна, так как имеет один полярный жгутик. Известно чередование в цикле развития подвижной и неподвижной стадий.

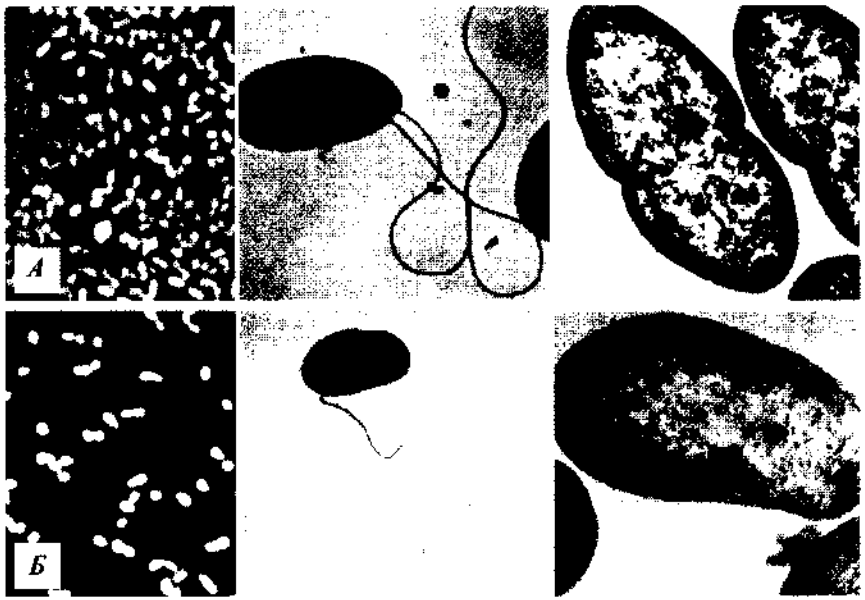


Рис. 42. Нитрифицирующие бактерии:
А — Nitrosomonas europaea; Б — Nitrobacter winogradskyi

Описаны и другие виды бактерий, вызывающие вторую фазу нитрификации.

Нитрифицирующие бактерии культивируют на простых минеральных средах, содержащих аммиак или нитриты (окисляемые субстраты) и диоксид углерода (основной источник углерода). Источником азота для этих организмов служат аммиак, гидроксиламин и нитриты.

Нитрифицирующие бактерии развиваются при pH 6,0—8,6, оптимум реакции среды составляет pH 7,5—8,0. При значениях ниже pH 6 и выше pH 9,2 бактерии не развиваются. Оптимальная температура для развития нитрификаторов 25—30 °С. Изучение отношения различных штаммов *Nitrosomonas europaea* к температуре показало, что некоторые из них имеют оптимум развития при 26 °С или около 40 °С, другие способны довольно быстро расти при 4 °С.

Нитрификаторы — облигатные аэробы[1]. Используя кислород воздуха, они окисляют аммиак до азотистой кислоты (первая фаза нитрификации):

$$NH^+_4 + 3/_2O_2 \longrightarrow NO^-_2 + H_2O + 2H^+$$

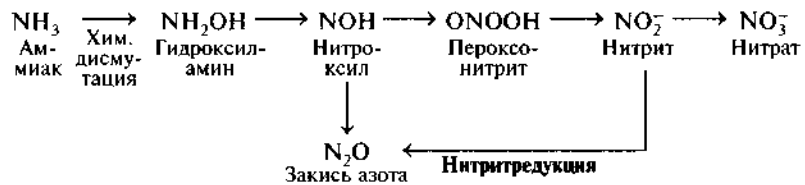
[1] В последние годы обнаружена способность бактерий к анаэробному окислению аммиака. Этот процесс, получивший название «анаммокс» *(Anammox),* играет важную роль при очистке сточных иод. Осуществляющие его бактерии относятся к группе планктомицетов. *(Прим. ред.)*

а затем азотистую кислоту до азотной (вторая фаза нитрификации):

$$NO^-_2 + 1/_2O_2 \longrightarrow NO^-_3$$

Следовательно, аммиак — продукт жизнедеятельности аммонифицирующих бактерий — использует для получения энергии *Nitrosomonas,* а нитриты, образующиеся в процессе жизнедеятельности последних, служат источником энергии для *Nitrobacter.*

Согласно современным представлениям, процесс нитрификации осуществляется на цитоплазматической и внутрицитоплазматических мембранах и проходит в несколько этапов. Первым продуктом окисления аммиака становится гидроксиламин, затем превращающийся в нитроксил (NOH) или пероксонитрит (ONOOH), последний, в свою очередь, преобразуется в дальнейшем в нитрит, а нитрит в нитрат. Весь процесс нитрификации иллюстрирует следующая схема:



Нитроксил, как и гидроксиламин, по-видимому, может димеризоваться в гипонитрит или превращаться в закись азота N_2O — побочный продукт нитрификации. Кроме первой реакции (образования гидроксиламина из аммония), все последующие превращения сопровождаются синтезом макроэргических связей в виде АТФ.

Нитрификаторы осуществляют фиксацию CO_2 через восстановительный пентозофосфатный цикл (цикл Кальвина). В результате последующих реакций образуются не только углеводы, но и другие важные для бактерий соединения — белки, нуклеиновые кислоты, жиры и т. д.

Долгое время нитрифицирующих бактерий относили к облигатным хемолитоавтотрофам. Позднее были получены данные о способности этих бактерий использовать некоторые органические вещества. Так, отмечено стимулирующее действие на рост *Nitrobacter* нитрита, дрожжевого автолизата, пиридоксина, глутаминовой кислоты и серина. Предполагают, что некоторые нитрифицирующие бактерии обладают способностью переключаться с автотрофного на гетеротрофное питание. Однако нитрификаторы не растут на обычных питательных средах, так как большое количество легкоусвояемых органических веществ, содержащихся в таких средах, задерживает их развитие. Однако в природе такие бактерии хорошо развиваются в черноземах, навозе, компостах, т. е. в местах, где содержится много органического вещества.

Указанное противоречие оказывается несущественным, если сравнивать количество легкоокисляемого углерода в почве с теми концентрациями органического вещества, которые нитрификаторы должны выдерживать в культурах. Так, органическое вещество почв представлено главным образом гуминовыми веществами, на которые приходится в черноземе 71—91% общего углерода, а легко усвояемые водорастворимые органические вещества составляют не более 0,1% общего углерода. Следовательно, нитрификаторы не встречают в почве больших количеств легкоусвояемого органического вещества.

Накопление нитратов происходит с неодинаковой интенсивностью на разных почвах. Чем богаче почва, тем больше соединений азотной кислоты она может накапливать. Существует метод определения доступного растениям азота в почве по показаниям ее нитрификационной способности. Следовательно, интенсивность нитрификации можно использовать для характеристики агрономических свойств почвы.

Вместе с тем при нитрификации происходит лишь перевод одного питательного для растений вещества — аммиака в другую форму — азотную кислоту. Нитраты, однако, обладают некоторыми нежелательными свойствами. В то время как ион аммония поглощается почвой, соли азотной кислоты легко вымываются из нее. Кроме того, нитраты восстанавливаются в результате денитрификации до N_2, что также обедняет азотный запас почвы. Все перечисленное существенно снижает коэффициент использования нитратов растениями.

В растительном организме соли азотной кислоты перед включением в синтез должны быть восстановлены, на что тратится энергия. Аммоний же используется непосредственно. В связи с этим ученые поставили вопрос о возможности искусственного снижения интенсивности нитрификации при помощи специфических ингибиторов, подавляющих активность бактерий-нитрификаторов и безвредных для других организмов. Уже предложены многочисленные промышленные препараты ингибиторов нитрификации (2-хлор-6-(трихлорметил)-пиридин, нитропирин и др.), синтезированные на пиридиновой основе. Ингибиторы нитрификации подавляют только первую фазу нитрификации и не действуют на вторую, а также на гетеротрофную нитрификацию. При применении ингибиторов нитрификации (нитропирин) эффективность азотных удобрений повышается с 50 до 80%.

Гетеротрофная нитрификация. Способны осуществлять нитрификацию и некоторые гетеротрофные микроорганизмы. К ним относятся бактерии из родов *Pseudomonas, Arthrobacter, Corynebacterium, Nocardia* и отдельные виды грибов из родов *Fusarium, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium*. Установлено, что *Arthrobacter sp.* в присутствии органических субстратов вызывает окисление аммиака с образованием гидроксиламина, а затем нитрита и нитрата. Некоторые бактерии вызывают нитрификацию таких азотсодержащих органических веществ, как амиды, амины, гидроксамовые кислоты, нитросоединения (алифатические и ароматические), оксимы и др. Однако считают, что гетеротрофная нитрификация не служит источником энергии для перечисленных организмов.

Гетеротрофная нитрификация встречается в естественных условиях (почвах, водоемах и других субстратах). Она может приобретать главенствующее значение, особенно в атипичных условиях (например, при высоком содержании органических C- и N-соединений в щелочной почве и т. п.). Гетеротрофные микроорганизмы не только способствуют окислению азота в таких условиях, но и вызывают образование и накопление токсичных веществ, соединений канцерогенного и мутагенного, а также химиотерапевтического действия. В связи с тем что некоторые из перечисленных соединений вредны для человека и животных даже в относительно низких концентрациях, тщательно изучают возможность их образования в природе.

10.3. Иммобилизация азота

При определенных условиях имеющиеся в почве минеральные формы азота переходят в недоступные для растений соединения. Один из таких процессов возникает вследствие бурного развития микроорганизмов, которые потребляют азот и переводят его в белок цитоплазмы. Подобный процесс называют **иммобилизацией азота.**

Биологически закрепленный азот не теряется из почвы. После отмирания микроорганизмов белковые вещества минерализуются и превращаются в аммиак.

Иммобилизация азота наблюдается, например, при внесении в почву значительной массы соломы или соломистых удобрений. В результате иммобилизации использование азота растениями заметно снижается, что приводит к уменьшению урожая. Таким образом, иммобилизация представляет собой процесс, обратный минерализации.

Установлено, что превращение азотсодержащих соединений по пути минерализации или, наоборот, иммобилизации полностью определяется соотношением азота и углерода в органическом веществе, вносимом в почву. Если субстрат имеет узкое соотношение C : N, то при его разложении накапливается аммиак, поскольку микроорганизмам не хватает углеродсодержащих соединений для ассимиляции азота. Так, соотношение C : N сушеной крови животных равно 4,2 : 1, поэтому при ее распаде в почве образуется много аммиака. При внесении в почву массы, богатой углеводами и бедной азотом, происходит потребление минерального азота. Например, в соломе зерновых культур соотношение C : N приближается к 100 : 1. По-

этому вследствие внесения соломы в почву наблюдается «биологическое закрепление» минерального азота.

Скорость и размеры ассимилируемого микробами азота связаны и с типом угдеродсодержащего соединения. Так, глюкоза, легко используемая микроорганизмами, может вызвать значительно более быстрое закрепление азота, чем целлюлоза или тем более лигнин. В общем можно считать, что органические соединения с соотношением C : N, близким к 20—25 : 1 и менее, способствуют накоплению минеральных форм азота в почве, а вещества с более широким соотношением этих элементов вызывают иммобилизацию азотных запасов.

Экспериментальные данные показывают, что в среднем на каждые 100 г разложенного органического вещества (50 г C) микроорганизмы потребляют 2 г азота (C : N = 25). Следовательно, если содержание азота в органическом веществе разлагающихся растительных остатков составляет менее 2%, он будет полностью иммобилизован клетками микробов, а при большем его количестве (C : N < 25) станет накапливаться аммоний.

Зная условия иммобилизации неорганического азота, можно сделать важные агротехнические выводы. Так, удобрять почву, предназначенную под зерновые культуры, растительными остатками, бедными азотом, опытный агроном не станет, так как это ухудшает азотное питание растений. Соломистые удобрения он будет вносить в почву лишь с добавлением соответствующих доз азотных удобрений.

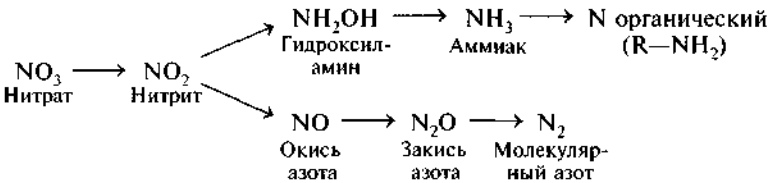
В осеннее время года иммобилизация полезна, так как нитраты и аммиак связываются и не теряются в результате выщелачивания зимой. Весной азот, входящий в состав микробной клетки, частично минерализуется и превращается в аммиак и нитраты, которые затем используют растения. Интересно, что бобовые растения, которые существуют в симбиозе с бактериями, фиксирующими атмосферный азот, не испытывают депрессии от внесения соломистых удобрений. Наоборот, последние увеличивают их урожай и способствуют лучшему азотонакоплению.

10.4. Денитрификация

В почве совершается ряд процессов, в результате которых окисленные формы азота (нитраты, нитриты) восстанавливаются до оксидов азота или молекулярного азота. Это приводит к существенным потерям из почвы ценных для растений соединений. Восстановление нитратов и нитритов до газообразных азотных соединений происходит в результате прямой и косвенной денитрификации. Под **прямой денитрификацией** подразумевают биологическое восстановление нитратов, а под **косвенной** — химическое их восстановление.

Микроорганизмы обладают способностью восстанавливать нитраты в процессах как биосинтеза, так и катаболизма. Восстановление нитратов, осуществляемое при биосинтезе и приводящее к образованию азотсодержащих клеточных компонентов, носит название *ассимиляционной нитратредукции.* Такой процесс способны выполнять растения и многие микроорганизмы. В процессе **диссимиляционной нитратредукции,** или **денитрификации,** нитраты используются как окислители органических веществ вместо молекулярного кислорода, что обеспечивает микроорганизмы необходимой энергией. При этом происходит восстановление нитратов до таких конечных газообразных продуктов, как NO, N_2O или N_2 (в зависимости от вида микроорганизма и условий среды).

Ассимиляционная нитратредукция



Диссимиляционная нитратредукция (денитрификация)

Денитрификация осуществляется микроорганизмами в анаэробных условиях и ингибируется кислородом воздуха. Нитраты в анаэробных условиях выполняют роль акцепторов электронов, которые поступают от окисляемых соединений — органических или неорганических. В тех случаях, когда донорами электронов служат органические соединения, денитрификацию осуществляют хемоорганогетеротрофы, а если неорганические — хемолитоавтотрофы. В процессе денитрификации участвуют ферменты, содержащие молибден (FeS-белки — нитратредуктаза А и нитритредуктаза), локализованные на клеточных мембранах. Начальный этап восстановления нитратов при денитрификации катализуется ферментом нитратредуктазой А. Синтез данного фермента в клетках бактерий в присутствии нитрата идет только в анаэробных условиях. В аэробных условиях нитратредуктаза А не образуется.

Денитрификацию в системе энергетического метаболизма называют также **анаэробным,** или **нитратным, дыханием.** При нитратном дыхании хемоорганогетеротрофов органические вещества полиостью окисляются до CO_2 и H_2O, азот нитратов теряется в газообразной форме:

$$C_6H_{12}O_6 + 4NO_3 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 2N_2$$

Энергетические возможности процесса окисления органических субстратов с участием нитратов вполне сопоставимы с энер-

гетическими возможностями процесса аэробного дыхания, т. е. с участием свободного кислорода (см. с. 146). Большинство органических субстратов, использующихся в аэробном окислении, может быть потреблено при отсутствии O_2, если в среде имеются нитраты. Существование денитрификаторов в анаэробных условиях обеспечивают не только нитраты, но и нитриты.

Способностью к нитратному дыханию обладает большое число родов бактерий. Первый этап процесса — восстановление нитратов в нитриты — идет при участии разнообразных микроорганизмов, как прокариот, так и эукариот (водоросли, грибы и дрожжи). Полное восстановление нитратов до газообразных продуктов (NO, N_2O, N_2) могут осуществлять только прокариоты.

В наибольшей степени способность к полному восстановлению нитратов распространена у представителей родов *Pseudomonas (P. fluorescens, P. stutzeri, P. aeruginosa)* и *Bacillus (B. licheniformis* и др.).

К хемолитоавтотрофным бактериям-денитрификаторам относят *Thiobacillus denitrificans, Thiomicrospira denitrificans, Paracoccus denitrificans.* Сероокисляющие *Thiobacillus denitrificans* и *Thiomicrospira denitrificans* способны размножаться в анаэробных условиях, используя в качестве источника энергии и восстановителя элементарную серу или тиосульфат. Нитрат восстанавливается до газообразного азота:

$$5S + 6KNO_3 + 2H_2O = 3N_2\uparrow + K_2SO_4 + 4KHSO_4$$

$$5K_2S_2O_3 + 8KNO_3 + H_2O \longrightarrow 4N_2\uparrow + 9K_2SO_4 + H_2SO_4$$

В обмене веществ *Paracoccus denitrificans* нитраты выступают окислителями водорода (H_2), восстанавливаясь при этом полностью до N_2.

Денитрифицирующие бактерии — факультативно анаэробные организмы, способные восстанавливать нитраты только в анаэробных условиях. В присутствии свободного кислорода эти бактерии переходят на аэробное дыхание (обладают полной дыхательной системой), а нитраты потребляют лишь как источник азота (ассимиляционная нитратредукция). Некоторые денитрификаторы способны и к процессу азотфиксации (см. ниже).

В результате микробиологической денитрификации в атмосферу ежегодно поступает из почв и водоемов 270—330 млн т азота. Особенно существенен этот процесс в переувлажненных почвах, а также в тех случаях, когда минеральные азотные удобрения вносят в форме нитратов совместно с навозом или другими органическими удобрениями.

Азот почвы может теряться и в результате различных химических реакций (косвенная денитрификация). Так, в кислых почвах при реакции среды ниже pH 5,5 не исключается следующая химическая реакция с потерей NO:

$$3HNO_2 \rightleftarrows 2NO\uparrow + HNO_3 + H_2O$$

Молекулярный азот образуется химическим путем при реакции между азотистой кислотой и аминокислотами или солями аммония, протекающей при такой же кислотности:

$$R{-}NH_2 + HNO_2 \longrightarrow N_2\uparrow + R{-}OH + H_2O$$

Контрольные вопросы и задания

1. Каково значение свободноживущих и симбиотических азотфиксирующих микроорганизмов? 2. На какие этапы можно подразделить процесс минерализации азота микроорганизмами? 3. Какие микроорганизмы участвуют в разложении хитина? 4. В чем сущность процесса нитрификации? 5. Приведите примеры процессов, при которых азот переходит в соединения, недоступные для растений.

Глава 11 Фиксация молекулярного азота атмосферы микроорганизмами

Основная масса азота на Земле находится в газообразном состоянии и составляет свыше $^3/_4$ атмосферы (78,09% по объему, или 75,6% по массе). Практически запас азота нашей планеты неисчерпаем — $3{,}8.10^{15}$т N_2. Азот — довольно инертный элемент, поэтому редко встречается в связанном состоянии. Это один из основных биофильных элементов, необходимый компонент главных полимеров живых клеток — структурных белков, белков-ферментов, АТФ, нуклеиновых кислот. Никакой другой элемент так не лимитирует ресурсы питательных веществ в агросистемах, как азот. Он может стать доступным для живых организмов только в связанной форме, т. е. в результате азотфиксации.

Азотфиксация — биологический процесс, и единственными организмами, способными его осуществлять, являются прокариоты (эубактерии и архебактерии). Эти микроорганизмы частью самостоятельно, а частью в симбиозе с высшими растениями превращают молекулярный азот (N_2) в органические соединения и интегрируют его (непосредственно или через растение) в белок, который в конце концов попадает в почву.

Небиологические процессы фиксации азота (грозовые разряды, воздействие УФ-лучей, работа электрического оборудования и двигателей внутреннего сгорания) в количественном отношении весьма несущественны, так как все вместе дают не более 0,5% связанного азота. Даже вклад заводов азотных удобрений, производящих синтетический аммиак по методу Габера—Боша, составляет

лишь 5%. Следовательно, свыше 90% всей фиксации молекулярного азота атмосферы осуществляется в результате метаболической активности микроорганизмов.

Согласно последним оценкам, микроорганизмы на земном шаре ежегодно фиксируют 175—190 млн т молекулярного азота в наземных экосистемах, из которых 99—110 млн т — на почвах сельскохозяйственных угодий. Ежегодное производство минеральных удобрений в мире достигло 60—70 млн т; кроме того, в составе органических удобрений на поля вносится около 15 млн т азота.

Если учесть, что коэффициент использования азота минеральных удобрений не превышает 50%, а органических — 15—30%, то сельскохозяйственные растения из этих источников получают только 35—40 млн т азота в год. В то же время ежегодный вынос азота из почвы с сельскохозяйственной продукцией определяется почти в 110 млн т. Таким образом, основная часть азота в урожае сельскохозяйственных культур (от 60 до 90%) имеет микробиологическое происхождение, т. е. представлена азотом, фиксированным бактериями, и азотом минерализуемого органического вещества почвы, который в основной своей массе также микробного происхождения.

Азот, который поступает в растение и включается в состав белков, нуклеиновых кислот и других компонентов клеток в результате связывания микроорганизмами, носит название «биологический», а сами микроорганизмы, фиксирующие молекулярный азот атмосферы, — азотфиксаторами, или диазотрофами, т. е. использующими как N_2, так и связанные формы азота.

По способности вступать во взаимодействие с растениями микроорганизмы, осуществляющие фиксацию молекулярного азота, подразделяют на две группы — несимбиотические и симбиотические. В первой группе выделяют подгруппу свободноживущих азотфиксаторов, непосредственно не связанных с корнями высших растений, и подгруппу ассоциативных фиксаторов азота, обитающих в фитоплане — ризосфере (ризоплане) и филлосфере (филлоплане), т. е. на поверхности подземных и надземных органов растений, и находящихся с ними в синтрофных взаимоотношениях. К группе симбиотических азотфиксаторов относят микроорганизмы, развивающиеся в образованных на корнях или листьях клубеньках (или узелках) и находящиеся в симбиотических взаимоотношениях с растениями.

11.1. Азотфиксация свободноживущими микроорганизмами

Род *Clostridium*. Первым из свободноживущих азотфиксаторов был открытый С. Н. Виноградским в 1893 г. *Clostridium pasteurianum*. Это анаэробная бактерия, вызывающая маслянокислое брожение, имеет палочковидные клетки длиной 1,5—8 мкм и шириной 0,8—1,3 мкм. Молодые клетки несут перитрихально расположенные жгутики, в старых образуются споры. При спорообразовании клетки утолщаются посередине или на конце. В присутствии кислорода воздуха *C. pasteurianum* может развиваться только при наличии в среде аэробных бактерий, поглощающих кислород; организм малочувствителен к реакции среды и встречается как в кислых (pH 4,5—5,5), так и в щелочных (pH 8—9) почвах.

Источником азотного питания для бактерий рода *Clostridium* могут служить соли аммония, азотной кислоты и многие содержащие азот органические соединения. При отсутствии указанных соединений бактерии усваивают молекулярный азот. Источником углерода для С. *pasteurianum* может быть широкий набор углеродсодержащих соединений — моносахариды, дисахариды, некоторые полисахариды (декстрин, крахмал) и органические кислоты. Развиваясь на питательных средах, содержащих углеводы, С. *pasteurianum* разлагает их с образованием масляной и уксусной кислот, диоксида углерода и водорода. Освобождающаяся при сбраживании углеводов энергия частично идет на усвоение молекулярного азота атмосферы.

C. pasteurianum обычно считался слабоактивным фиксатором азота. Пределом его активности было связывание 1—3 мг азота на 1 г сброженного сахара. Однако, используя питательные среды, наиболее отвечающие физиологическим потребностям *C. pasteurianum,* его активность удалось повысить до 10—12 мг азота на 1 г сброженного сахара, в некоторых случаях и более.

Способность фиксировать азот атмосферы свойственна и другим видам рода *Clostridium* (С. *butyricum, C. acetobutylicum, C. pectinovorum, C. felsineum* и т. д.).

Род *Azotobacter*. Голландский микробиолог *М. Бейеринк* в 1901 г. открыл аэробную бактерию, также усваивающую молекулярный азот — *Azotobacter chroococcum* (сем. *Azotobacteriaceae)*. Молодые клетки азотобактера представляют собой палочки размером 2—3 х 4—6 мкм. Позже они превращаются в крупные кокки диаметром до 4 мкм. Кокковидные клетки обычно покрыты капсулой и содержат разные включения (жир, крахмал, поли-*B*-гидроксимасляную кислоту и др.).

У кокковидных клеток некоторых видов азотобактера появляется толстая оболочка, и они превращаются в цисты. На одних питательных средах палочки быстро приобретают кокковидную форму, на других — лишь по истечении длительного времени. Палочковидные клетки азотобактера имеют жгутики и обладают подвижностью (рис. 43). При переходе палочек в кокки жгутики обычно теряются.

Из описанных видов азотобактера наиболее изучены: *A. chroococcum, A. beijerinckii, A. vinelandii* и *A. paspali*. Перечисленные виды различают по размерам и форме клетки, а также по некоторым дру-

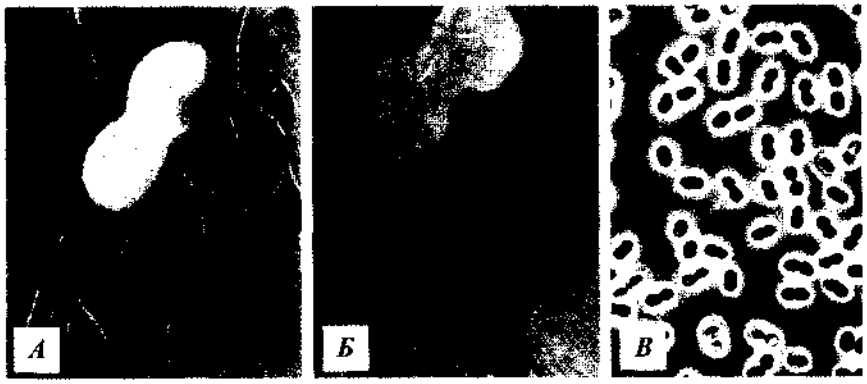


Рис. 43. Клетки бактерий рода *Azotobacter:* делящиеся клетки со жгутиками *A. agilis (A)* и *A. macrocytogenes*(Б); *В*— кокковидные, окруженные слизистой капсулой, клетки *A. vinelandii* (по: Енсен)

гим признакам, в частности пигментации колоний. Так, колонии *A. chroococcum* имеют бурый, почти черный цвет, *A. vinelandii* выделяют желтый пигмент с зеленой флуоресценцией, *A. paspali* также продуцируют желтый пигмент. В почвах чаще всего встречается *Azotobacterchroococcum*.

Все виды азотобактера являются аэробами. Источником азота для них могут служить соли аммония, нитриты, нитраты и аминокислоты. В отсутствие связанных форм азота азотобактер фиксирует молекулярный азот. Небольшие дозы азотсодержащих соединений не приводят к депрессии фиксации азота, а иногда даже стимулируют ее. Увеличение количества связанного азота в среде полностью подавляет усвоение молекулярного азота. Энергия усвоения азота у отдельных культур азотобактера колеблется в широком диапазоне. Активные культуры связывают 15—20 мг азота на 1 г потребленного органического вещества.

Азотобактер способен использовать большой набор органических соединений — моно- и дисахариды, некоторые полисахариды (декстрин, крахмал), многие спирты, органические кислоты, в том числе ароматические. Вообще азотобактер проявляет высокую потребность в органических веществах, поэтому в больших количествах встречается в хорошо удобренных почвах.

Для роста бактерии нуждаются в элементах минерального питания, особенно в фосфоре и кальции. Потребность азотобактера в данных элементах столь значительна, что его используют как биологический индикатор на наличие фосфора и кальция в почве. Для энергичной азотфиксации микроорганизмам требуются микроэлементы, из них наиболее важен молибден, который входит в состав ферментов, катализующих процесс усвоения азота.

Отмеченные физиологические особенности характеризуют экологию данного организма. Азотобактер обитает в высокоплодородных, достаточно влажных почвах с нейтральной или близкой к ней реакцией среды. При недостаточной влажности большинство клеток отмирает. В черноземных, каштановых и сероземных почвах, благоприятных для рассматриваемого микроорганизма, его обнаруживают в значительных количествах только весной. При летнем иссушении почвы остаются единичные клетки. В зоне подзолистых и дерново-подзолистых почв азотобактер можно найти в огородных и пойменных почвах, богатых органическими соединениями, с оптимальным pH 6,8—7,2.

Другие свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы. К семейству *Azotobacteriaceae* относят и азотфиксирующих бактерий **рода** *Azomonas*—*A. agilis, A. insignis* и *A. macrocytogenes*. Первые два вида обитают в водоемах, третий — в почвах. Виды *Azomonas* близки к азотобактеру, отличаются от него рядом морфологических и физиологических особенностей. Для *A. agilis* характерны относительно крупные, овальные клетки с перитрихальным жгутикованием, для *A. insignis* также крупные, но более округлые клетки, с полярными или лофотрихальными жгутиками, для *A. macrocytogenes* — клетки размером 8—10 мкм с одним полярным жгутиком. Образуют колонии с розоватым пигментом, который флуоресцирует в ультрафиолетовых лучах.

Представители рода *Azomonas* — аэробы. В отличие от азотобактера они могут расти и фиксировать азот при pH 4,6—6,9 и даже 4,3. Источник углерода для этих бактерий — углеводы, спирты, органические кислоты. Достаточно эффективно виды *Azomonas* связывают азот атмосферы (до 15—18 мг N_2 на 1 г использованного сахара). Распространены в тропических почвах.

К этому же семейству относятся и бактерии **рода *Beijerinckia,*** близкие по свойствам к азотобактеру. От азотобактера они отличаются значительной кислотоустойчивостью, кальцифобностью и некоторыми другими свойствами. Они могут расти и фиксировать азот даже в среде с pH 3,9. Аэробы.

Впервые бактерии рода *Beijerinckia* выделены из кислых тропических почв (pH 4,5—5,2) Малайзии, Бангладеш и Бирмы. Описан ряд видов бактерий данного рода — *B. indica, B. mobilis, B. fluminensis, B. derxii*.

Клетки *Beijerinckia* могут быть палочковидной, овальной или круглой формы. У одних видов клетки подвижны, у других — неподвижны. Иногда наблюдается образование капсул. Цисты и эндоспоры отсутствуют.

Большинство культур бактерий рода *Beijerinckia* формируют на безазотистой среде с глюкозой выпуклые, блестящие, нередко складчатые слизистые колонии вязкой консистенции. При старении

колонии окрашиваются в красноватый или темно-коричневый цвет. В отличие от азотобактера виды *Beijerinckia* не усваивают ароматические соединения и хуже ассимилируют органические кислоты. При развитии на среде с углеводами накапливаются кислые продукты (уксусная и другие органические кислоты).

Бактерии рода *Beijerinckia* менее требовательны по сравнению с азотобактером к концентрации фосфорных соединений в среде. Даже небольшие дозы соединений кальция тормозят рост представителей данного рода. Они значительно менее, чем азотобактер, чувствительны к повышенной концентрации солей железа и алюминия, нуждаются в молибдене, но также довольствуются меньшими его дозами. Эти свободноживущие азотфиксаторы фиксируют 18—20 мг азота на 1 г использованного сахара.

Бактерии рода *Beijerinckia* широко распространены в кислых почвах субтропической и тропической зон. Реже встречаются в почвах зоны умеренного климата. В окультуренных кислых почвах содержится больше клеток *Beijerinckia,* чем в целинных. Целинные луговые почвы богаче бактериями рода *Beijerinckia,* чем лесные.

К свободноживущим фиксаторам молекулярного азота семейства *Azotobacteriaceae* относятся также виды **рода *Derxia,*** выделенные из почв Индии с pH 6,5. Это медленно растущие на безазотистых средах палочковидные бактерии со слизистыми капсулами, обладающие на определенной стадии развития жгутиками. Колонии могут быть пленочными или слизистыми, при старении приобретают желтовато-коричневый цвет. *Derxia* используют различные источники углерода — моно-, ди-, полисахариды, спирты, органические кислоты, в среде без азота фиксируют 12—15 мг N_2 на 1 г использованного сахара.

Представитель данного рода — *Derxia gummosa* — развивается в почвах с pH 4,5—6,5, однако лучше растет при pH 5,1—5,5. Виды данного рода распространены в почвах тропической зоны — Индии, Индонезии, тропической Африки, Южной Америки.

До половины XX в. считали, что связывать молекулярный азот могут лишь отдельные специализированные виды микроорганизмов, относящиеся в основном к родам *Clostridium* и *Azotobacter.* Однако положение существенно изменилось, когда для выявления азотфиксаторов вместо метода Кьельдаля стали использовать изотропный метод ($^{15}N_2$), а также ацетиленовый метод (реакция восстановления ацетилена в этилен), выявляющий у бактерий нитрогеназу — ферментный комплекс, обеспечивающий фиксацию молекулярного азота. Последний метод более чем в 10^5 раз чувствительнее метода Кьельдаля и в 10^3 раз — метода изотопных индикаторов ($^{15}N_2$).

В результате применения новых методов было установлено, что функция фиксации молекулярного азота присуща и многим другим микроорганизмам: фототрофным бактериям, цианобактериям, хемолитоавтотрофным бактериям, метилотрофным, сульфатвосстанавливающим, метаногенам и др. Известно уже более ста видов микроорганизмов, обладающих способностью к фиксации азота атмосферы.

В воде рисовых полей, в различных водоемах распространены азотфиксирующие анаэробные фототрофные **пурпурные серобактерии** *(Chromatium, Thiocapsa, Thiocystis* и др.), **пурпурные несерные бактерии** *(Rhodospirillum, Rhodopseudomonas* и др.) и **зеленые серобактерии** *(Chlorobium, Pelodictyon* и др.).

Аэробные **цианобактерии,** обладающие гетероцистами (клетки с толстой клеточной стенкой), способны фиксировать N_2. Среди них преобладают представители родов *Nostoc, Anabaena, Calothrix, Cylindrospermum, Tolypothrix, Scytonema* и др. В почвах обнаружено более 130 видов гетероцистных форм цианобактерии. Наиболее широко распространены в почвах представители рода *Nostoc.*

Усвоение молекулярного азота у цианобактерии происходит в гетероцистах, т. е. в клетках, куда ограничен доступ кислорода. Однако ферментный аппарат, связывающий N_2, обнаружен и в вегетативных клетках. Это дало основание для поиска негетероцистных азотфиксирующих форм. В последнее время они найдены — это представители родов *Synechocystis, Synechococcus, Chroococcidiopsis, Oscillatoria, Lyngbya, Microcoleus,* которые, не обладая гетероцистами, могут связывать N_2.

Цианобактерии распространены во всех почвенно-климатических зонах, однако лучше развиваются в почвах с нейтральной реакцией среды. Поэтому численность и видовой состав описываемых азотфиксаторов значительно возрастают в нейтральных почвах южной зоны. Отдельные виды приурочены к определенным местам обитания. Многие цианобактерии живут в симбиозе с другими растительными организмами, например с грибами, образуя лишайники. Адаптируясь к местным условиям, эти бактерии приобрели способность фиксировать азот при температуре, близкой к 0 °С; иногда азотфиксация происходит даже при —5 °С, оптимальная температура для процесса 15—20 °С.

Некоторые цианобактерии способны фиксировать азот в симбиозе с высшими растениями. Так, у водного папоротника *Azolla,* который растет на поверхности затопленных рисовых полей, в полостях листьев обитает *Anabaena azollae.* Накопление азота в почве в результате симбиоза *Anabaena* с *Azolla* может достигать 300 кг/га в год. Подобного рода симбиоз обнаружен между печеночниками *(Blasia pusilla, Anthoceros punctatus, Peltigera* sp.) и *Nostoc.* В нижней части ствола, в специальных железах у мест отхождения листовых черешков тропического кустарника *Gunnera macrophylla* обитают симбиотические азотфиксирующие цианобактерии *Nostoc punctiforme.* Данный вид имеет гетероцисты и синтезирует нитрогеназу.

Наибольшее значение фототрофные анаэробные бактерии и цианобактерии имеют главным образом в переувлажненных и затопленных почвах (болота, рисовники и т. д.), где они могут связывать до 20—50 кг/га азота в год.

В затопляемых почвах рисовых полей при разложении растительных остатков образуются газообразные соединения — H_2, CH_4, CO_2, которые могут служить источниками энергии для некоторых азотфиксирующих бактерий. Например, *Corynebacterium autotrophicum* окисляет водород и ассимилирует CO_2, т. е. способна к хемолитоавтотрофии и одновременно к фиксации азота атмосферы.

Способность к азотфиксации имеется и у **метилотрофных бактерий** родов *Methylomonas, Methylobacterium* и *Methylococcus,* которые в аэробных условиях могут жить, окисляя только метан или метиловый спирт. Известны анаэробные **сульфатвосстанавливающие бактерии-азотфиксаторы,** относящиеся к родам *Desulfotomaculum* и *Desulfovibrio.* Такие бактерии широко распространены в водоемах и почвах, где в анаэробных условиях идет микробное разложение растительных и животных остатков. Выделены, описаны и многие другие свободноживущие азотфиксирующие бактерии.

Суммарная деятельность свободноживущих бактерий в природных субстратах, в частности в почвах, приводит к накоплению азота. Так, в пахотные почвы зоны умеренного климата за счет свободноживущих азотфиксаторов ежегодно поступает от 26 до 86 кг/га азота в год, в почвы тропической зоны — до 100 и более. Считают, что в среднем в пахотных почвах России свободноживущие азотфиксаторы связывают до 20 кг/га азота в год.

11.2. Ассоциативная азотфиксация

В 1974—1976 гг. бразильский ученый *И. Доберейнер* впервые обнаружила спиралевидные грамотрицательные аэробные (микроаэрофильные) бактерии — азоспириллы, развивающиеся в ризосфере и ризоплане тропических травянистых растений, обладающие способностью к азотфиксации и вступающие в ассоциативные взаимоотношения с растениями. Изучение таких бактерий позволило выделить среди них несколько видов: *Azospirillum lipoferum, A. brasilense, A. amazonense, A. halopraeferans.*

Рост и развитие ассоциативных бактерий связаны с поступлением к ним от растений легкодоступных источников углерода и энергии в виде корневых выделений (сахаров, органических кислот и других органических веществ), а также корневого отпада и опада. Последующие наблюдения выявили, что бактерии рода *Azospirillum* встречаются в ризоплане различных растений и в более северной зоне, хотя доминируют в зоне южных почв.

В ризосфере небобовых растений достаточно широко распространены и азотфиксирующие бактерии родов *Enterobacter, Klebsiella, Escherichia, Erwinia* и *Citrobacter* (семейства *Enterobacteriaceae).* Бактерии перечисленных родов представляют собой грамотрицательные палочки, подвижные (за исключением представителей рода *Klebsiella),* факультативные анаэробы. Они выносят довольно низкое значение реакции среды и в большом количестве обнаруживаются под лесными насаждениями, произрастающими на подзолистых почвах. В зоне умеренного климата такие бактерии обитают под травянистыми небобовыми растениями.

Изучение микробного населения корневой системы овощных культур показало, что азотфиксация в ризоплане данных растений осуществляется главным образом факультативно анаэробными бактериями, среди которых доминируют энтеробактерии, главным образом представители рода *Klebsiella.* Активным азотфиксатором оказался вид *Klebsiella planticola.* Обнаружены азотфиксирующие виды рода *Bacillus: B. polymyxa, B. macerans, B. azotofixans* (последний выявлен на корнях злаков в тропиках).

В ризосфере на корнях кукурузы, сорго и риса обнаружен новый вибриоидный организм — *Herbaspirillum seropedicae,* способный к фиксации азота в условиях ассоциативного симбиоза. На корнях злаковых и других небобовых растений распространены представители рода *Pseudomonas,* среди которых имеется ряд азотфиксаторов. Например, ассоциативный азотфиксатор *P. paucimobilis* часто встречается под рисом.

Ассоциативная азотфиксация протекает практически во всех почвах в прикорневом пространстве или на корнях различных небобовых растений. Достаточно высокий уровень азотфиксации обнаружен в ризосфере тропических растений — сорго, кукурузы, сахарного тростника, паспалум и др. В почвах зоны умеренного климата азотфиксация выявлена в ризосфере разнообразных небобовых растений — зерновых, корне- и клубнеплодных, овощных культур, пастбищных и дикорастущих злаков, растений влажных и суходольных лугов, лесных трав.

При таком практически повсеместном распространении ассоциативной азотфиксации эффективность ее, определяемая деятельностью диазотрофных бактерий, далеко не одинакова под разной растительностью. Так, в хорошо окультуренных почвах под рисом азотфиксация достигает особенно высокого уровня и протекает в среднем со скоростью 45—80 кг/га азота в год, а иногда даже до 330 кг/га азота в месяц. В то же время под пшеницей и под кукурузой, культивируемыми на красноземных почвах, фиксируется соответственно около 20 и 10 кг/га азота в год.

Активность ассоциативной азотфиксации определяется количеством органических веществ — корневых выделений и корневого спада, поступающих в прикорневую зону небобовых растений. Считают, что высокая активность азотфиксации в ризосфере тропиче-

ских растений (сахарного тростника, паспалума, маиса и др.) обусловлена их способностью использовать при фотосинтезе путь через дикарбоновые кислоты (С-4 путь). Этим растениям необходимо интенсивное освещение, максимальная скорость фотосинтеза у них существенно выше, чем у растений, использующих цикл Кальвина (С-3 путь), т. е. овса, пшеницы, ячменя и др. Полагают, что поскольку растения С-4 типа расходуют мало углеводов при фотодыхании, то большее количество последних может быть использовано для роста корней и увеличения корневой экссудации. Перечисленные особенности положительно сказываются на уровне ассоциативной азотфиксации. Интересно отметить, что ассоциативные бактерии *Azospirillum lipoferum* преимущественно развиваются в ризоплане растений с С-4 типом фотосинтеза, а *Azospirillum brasilense* — в ризоплане растений с С-3 типом фотосинтеза.

Уровень азотфиксации, которая протекает в почве без растений (поля под паром, междурядья и т. п.) и осуществляется благодаря деятельности свободноживущих диазотрофов, существенно ниже, чем в почве под растениями. Так, в дерново-подзолистых почвах азотфиксация под посевами злаковых растений составляет около 40 кг/га азота за вегетационный период, под картофелем — 30 кг, на участках, не занятых растениями (пар, междурядья), — только 10—13 кг/га. Обычно свободноживущие в почве бактерии, связывающие азот, используют как источник углерода и энергии пожнивные растительные остатки, а ассоциативные диазотрофы — органические вещества, выделяемые растениями в прикорневую зону в виде корневых экссудатов и корневого опада.

Количество фиксированного свободноживущими и ассоциативными бактериями молекулярного азота в дерново-подзолистой почве под сельскохозяйственными культурами может достигать в среднем не менее 30—40 кг/га азота в год. Причем основная часть азота (около 70%) фиксируется в процессе ассоциативной азотфиксации, которая поэтому играет большую роль в азотном питании небобовых растений.

Ассоциативная азотфиксация может также осуществляться в филлосфере или филлоплане, т. е. на поверхности растений (листьев, стеблей). Здесь обитают так называемые эпифитные бактерии, среди которых широко распространены азотфиксаторы. Доминируют бактерии семейства *Enterobactenaceae,* преимущественно рода *Erwinia (Erwinia herbicola)*. Эти бактерии развиваются и фиксируют азот, используя выделения органических и минеральных соединений, главным образом углеводов и органических кислот при экзоосмосе, а также летучие органические вещества (альдегиды и пр.).

Количество азота, фиксированного ассоциативными бактериями в филлосфере растений, зависит как от вида растения, так и от ряда внешних факторов (температуры, влажности, солнечной радиации и др.). Например, в филлосфере березы продуктивность ассоциативной фиксации составляет около 9 кг/га, а в филлосфере тимофеевки — около 13 кг/га азота за вегетационный период.

Считают, что ассоциативная азотфиксация происходит в фитоплане всех небобовых растений, хотя ее эффективность различна и определяется главным образом генотипом растений.

11.3. Симбиотическая азотфиксация

Характеристика клубеньковых бактерий. Симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы выделены М. Бейеринком в 1888 г. из корневых клубеньков (бородавчатых наростов) бобовых растений (рис. 44). Микроорганизмы назвали **клубеньковыми бактериями,** и было установлено, что они вызывают образование клубеньков, в которых осуществляется фиксация азота атмосферы. Бактерии в клубеньках питаются органическими соединениями, синтезированными растением, а растение получает из клубеньков связанные соединения азота. Так, между бактериями и растениями устанавливаются симбиотические взаимоотношения. Клубеньковые бактерии, заражающие корни различных видов бобовых растений, несколько отличаются друг от друга, однако их рассматривают как группы родственных организмов.

Клубеньковые бактерии представляют собой грамотрицательные, от коротких до среднего размера палочки (0,5—0,9 мкм шириной, 1—3 мкм длиной), подвижные, монотрихи с полярным или субполярным расположением жгутиков или перитрихи, аэробы (рис. 45). Молодые клетки окрашиваются анилиновыми красителями равномерно, за исключением ряда видов, для которых характерно наличие к клетках метахроматических (полифосфатных) гранул. Старые клетки содержат одну или несколько гранул поли-*В*-гидроксимасляной кислоты. Спор не образуют.

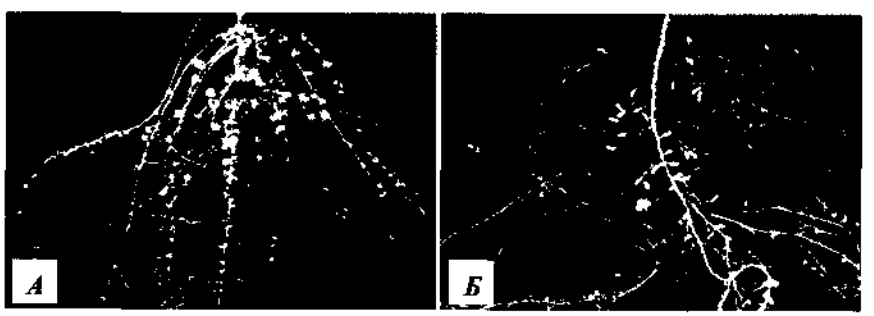


Рис. 44. Клубеньки на корнях соевых бобов *(А)* и клевера лугового *(Б)* (по: Ф. Манжино)

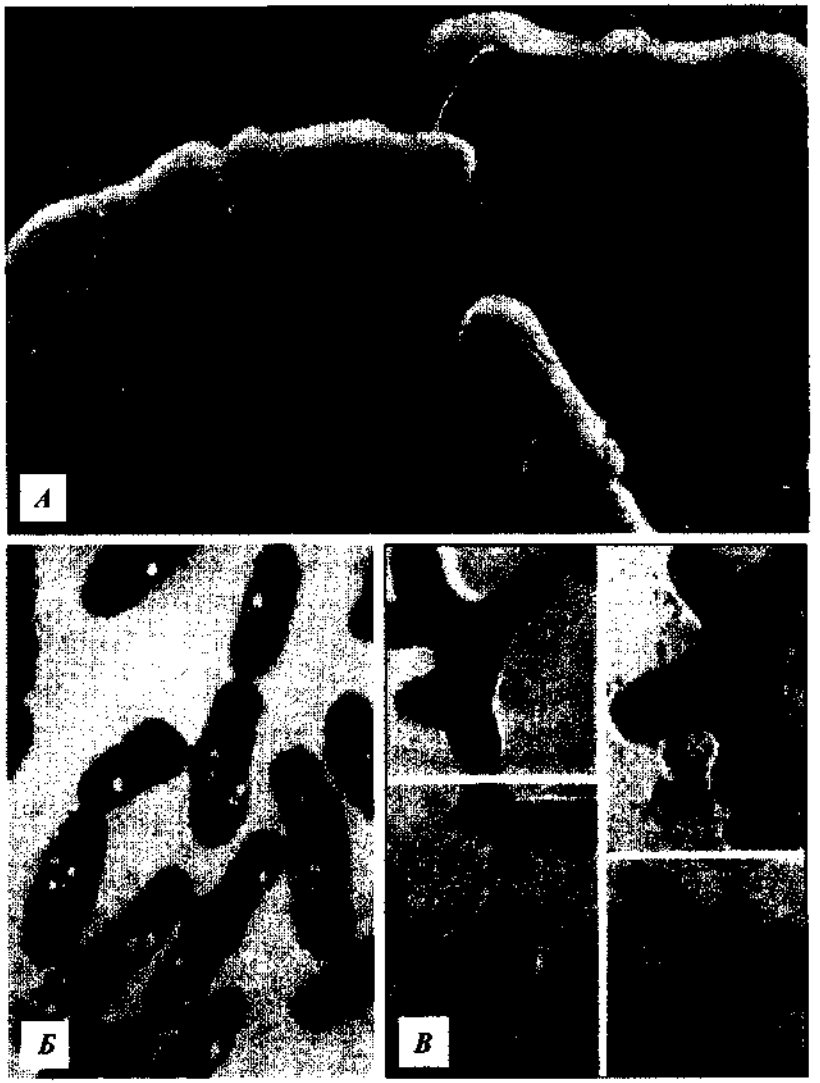


Рис. 45. Клубеньковые бактерии: клетки в сканирующем *(А)* и световом *(Б)* микроскопе; бактероиды *(В)*

На питательных средах клубеньковые бактерии разных видов бобовых растений растут с неодинаковой скоростью. Например, клубеньковые бактерии клевера, гороха, фасоли и люцерны растут быстро, бактерии сои, люпина, арахиса и вигны — медленно. Это дало основание быстрорастущие формы отнести к роду *Rhizobium,* медленнорастущие — к роду *Bradyrhizobium*. На твердых средах клубеньковые бактерии обычно образуют бесцветные прозрачные слизистые колонии, в ряде случаев колонии имеют шероховатую поверхность.

Источником азота для клубеньковых бактерий служат различные соединения — соли аммония и азотной кислоты, многие аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания и т. д. Обычно клубеньковые бактерии фиксируют азот в симбиозе с растением. Однако на специальных питательных средах при отсутствии кислорода чистые культуры *Rhizobium* также способны усваивать некоторое количество молекулярного азота.

Клубеньковые бактерии используют разнообразные углеводы, в том числе и некоторые полисахариды (декстрин, гликоген). При усвоении углеводов в процессе жизнедеятельности некоторых видов образуются кислоты. Бактерии потребляют многие органические кислоты и многоатомные спирты. Фосфор клубеньковые бактерии усваивают из минеральных и органических соединений; калий, кальций и другие элементы получают из неорганических веществ. Клубеньковым бактериям нужны также соединения железа, некоторые микроэлементы (молибден и др.).

Лучше развиваются эти бактерии в питательной среде с витаминами группы В. Ряд витаминов (тиамин, B_{12}, рибофлавин) и ростовые вещества (гетероауксин, гиббереллины, цитокинины и т. д.) микроорганизмы синтезируют сами.

Для большинства культур клубеньковых бактерий оптимальное значение pH среды находится в пределах pH 6,5—7,5, а при pH 4,5—5 и pH 8 их рост приостанавливается. Однако встречаются культуры, относительно устойчивые к кислой среде и образующие клубеньки в почвах с pH 5. Оптимальная температура для большинства культур около 24—26 °С, при температуре ниже 5 °С и выше 37 °С рост прекращается.

Видовая специфичность клубеньковых бактерий. Клубеньковые бактерии формируют симбиотические ассоциации с бобовыми растениями семейства *Leguminosae,* в котором выделяют три подсемейства — *Mimosoideae, Papillonoideae* и *Caesalpinoideae*. До 90% видов первого и второго подсемейств и 23% видов третьего способны вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями. Клубеньковые бактерии характеризуются видовой специфичностью (избирательностью) по отношению к растению-хозяину. Определенный вид бактерий обычно образует клубеньки только на одном или нескольких видах бобовых растений. Так, *Rhizobium leguminosarum* инфицирует горох, вику, кормовые бобы и чечевицу; *Rhizobium phaseoli* — фасоль; *Bradyrhizobiumjaponicum* — сою; *Bradyrhizobium lupini* — люпин; *Bradyrhizobium vigna* — вигну, маш и арахис и т. д.

В 80—90-х гг. XX столетия из клубеньков, образующихся на стеблях тропических бобовых растений, выделены новые формы

клубеньковых бактерий. Так, из стеблевых клубеньков *Sesbania rostrata* — влаголюбивого бобового растения, живущего в Центральной Африке, изолирована клубеньковая бактерия, названная *Azorhizobium caulinodans,* а из стеблевых клубеньков тропических бобовых растений — *Aeschynomene indica* и *Aeschynomene scarba* впервые выделены клубеньковые бактерии, содержащие в клетках бактериохлорофилл *а* и обладающие способностью к фотосинтезу. Они были названы *Photorhizobium thompsonianum*. Эти бактерии образуют клубеньки не только на стеблях, но и на корнях; однако в стеблевых клубеньках связывание азота обычно идет более активно, чем в корневых.

Иногда наблюдается не только видовая, но и сортовая специфичность клубеньковых бактерий. У клубеньковых бактерий клевера, люцерны, эспарцета и гороха сортовая специфичность выражена слабо, а у бактерий сои, люпина и кормовых бобов она проявляется довольно активно. Иногда видовая специфичность клубеньковых бактерий нарушается, и они дают перекрестное заражение, т. е. заражают разные, не очень близкие виды бобовых растений. В таких случаях бобовое растение слабо фиксирует азот атмосферы.

Пока вопрос специфичности клубеньковых бактерий выяснен недостаточно. Однако экспериментальные данные позволяют представить процесс взаимного узнавания бактерий и растений. Известно, что клубеньковые бактерии существуют в почве как сапротрофы, развиваясь за счет органических соединений. Взаимодействие клубеньковых бактерий с корневой системой бобового растения начинается с привлечения (аттракции) клеток бактерий его корневыми выделениями. Подвижные бактерии, способные к хемотаксису, быстрее заражают растения, чем неподвижные.

Обычно заражение растения происходит только через молодые корневые волоски. При первом контакте бактерий с корневым волоском определяется, подходят ли партнеры друг к другу. Бобовые растения содержат лектины — белки или гликопротеины, лишенные ферментативной активности, но способные к специфичному связыванию полисахаридов. Лектины достаточно широко распространены в природе и, как считают, выполняют функцию распознавания. Синтезируемые бобовым растением лектины находятся на наружной поверхности корневых волосков. Наружный слизистый слой клеточной стенки клубеньковых бактерий имеет видоспецифичные полисахаридные цепи. В результате взаимодействия лектинов корневого волоска с поверхностными полисахаридами клубеньковых бактерий определяется, будет ли корневой волосок инфицирован бактериями или нет.

Таким образом, лектины определяют хозяйскую специфичность, реагируя с капсульными полисахаридами на поверхности клубеньковых бактерий. В качестве примера следует привести данные

о значении лектинов сои для формирования ее симбиоза с *Bradyrhizobium japonicum.* В опытах лектины сои связывались с клетками 22 из 25 испытанных штаммов клубеньковых бактерий данного вида и не связывались ни с одним из 23 штаммов клубеньковых бактерий другого вида. Значение лектинов для взаимодействия растения с клубеньковыми бактериями установлено для многих штаммов — *Rhizobium leguminosarum, R. trifolii, Bradyrhizobium japonicum*.

Взаимодействие бактерий с растением-хозяином. Внедрение клубеньковых бактерий в корень бобового растения-хозяина может осуществляться двумя путями: через верхушку корневого волоска или около его конца. У некоторых бобовых растений, например арахиса, бактерии проникают через «расщелины» в основаниях боковых ответвлений корня. При таком инфицировании растение может быть заражено большинством видов клубеньковых бактерий, и можно говорить о низкой специфичности данного бобового растения. Бобовые растения, инфицируемые через корневые волоски, проявляют обычно высокую специфичность в отношении вида клубеньковой бактерии-симбионта.

Известно, что стенка клетки корневого волоска имеет два слоя — первичный (альфа-слой) и вторичный (бета-слой). Первичный слой состоит в основном из пектиновых веществ, гемицеллюлоз и небольшого количества целлюлозных волокон. Целлюлозные волокна альфа-слоя образуют на верхушке корневого волоска разреженную сетку. Плотность целлюлозных волокон во втором слое (бета-слое) значительно выше, поэтому он прочнее первичного слоя. Обычно бета-слой не доходит до верхушки молодого корневого волоска. Однако когда рост волоска бывает закончен, его верхушка также покрывается двойным слоем целлюлозы. Следовательно, клубеньковым бактериям значительно легче проникать в бобовое растение через зону роста только еще формирующихся корневых волосков.

Первый признак инфицирования растения — своеобразное изменение формы корневых волосков, которые изгибаются в виде ручки зонтика. Степень искривления волоска зависит от вида бобового растения, активности заражающего штамма, а также места проникновения бактерий. Искривление корневого волоска, по-видимому, объясняется тем, что прикрепившиеся к корневому волоску бактерии останавливают отложение плотного бета-слоя лишь в месте своего прикрепления, а образование этого слоя на противоположной стороне волоска продолжается. В результате корневой волосок сильно закручивается и бактерии оказываются внутри завитка.

Обычно в месте проникновения бактерий наблюдается разрыхление клеточной стенки корневого волоска, что, возможно, обусловлено действием гидролитических ферментов бактерий. В корне-

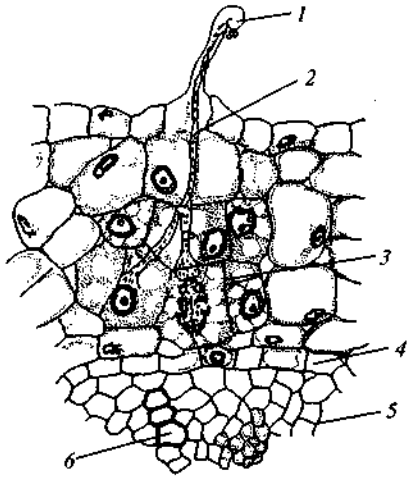


Рис. 46. Схема образования клубенька на корне бобового растения: *1* — инфицированный корневой волосок; *2* — инфекционная нить; *3* — делящиеся клетки растения; *4* — эндодерма; *5* — центральный цилиндр корня; *6* — ксилема (по: Г. Торнтон)

вом волоске клубеньковые бактерии образуют так называемую *инфекционную нить*. Последняя представляет собой гифообразную слизистую массу, в которую погружены размножающиеся клетки клубеньковых бактерий. Нить передвигается к основанию волоска и клеткам эпидермиса. Такой путь, равный 100—200 мкм, она проходит за одни-двое суток, т. е. со скоростью 5—8 мкм/ч. Затем нить из корневого волоска проникает через клетки коры в паренхиму.

После внедрения в растительные клетки инфекционная нить покрывается целлюлозной оболочкой, которая формируется из целлюлозной оболочки клетки, вероятно, для изоляции клубеньковых бактерий. Клубеньковые бактерии могут размножаться только в тетраплоидных клетках коры и частично эпидермиса корня. Когда на пути инфекционной нити встречаются тетраплоидные клетки, часть бактерий переходит из нити в цитоплазму и начинает там размножаться. После инфицирования клубеньковыми бактериями растительная клетка, а также соседние незараженные начинают активно делиться. Усиленное размножение инфицированных клеток и находящихся под их стимулирующим влиянием (при участии ростового вещества) соседних незараженных клеток приводит к формированию ткани клубенька (рис. 46). Обычно инфекция распространяется через тетраплоидные клетки, а кора и проводящие сосуды клубенька образуются из диплоидных клеток.

Бактероиды. Клетки клубеньковых бактерий, перешедшие в цитоплазму растительных клеток, растут, делятся, а затем трансформируются в своеобразные образования — *бактероиды*. Этим заканчивается процесс инфицирования — приблизительно через три-четыре недели после заражения. Бактероиды в 3—5 раз больше по размерам, чем обычные клетки, причем их форма меняется в зависимости от вида бобового растения от шаровидной и грушевидной до вильчатой и ветвистой (рис. 47). Бактероиды не делятся, они составляют до 50% массы клубенька.

Клубеньковые бактерии в клетках растения располагаются в вакуолях, окруженных перибактероидной мембраной — производным плазмалеммы растительной клетки. Бактероиды содержат больше поли-*В*-гидроксимасляной кислоты, гликогена и полифосфатов, чем обычные клетки клубеньковых бактерий, но меньше ДНК. Фактически бактероиды становятся своего рода азотфиксирующими органеллами клеток бобового растения-хозяина. Поэтому их называют азотосомами. Таким образом, рассмотренный симбиоз является внутриклеточным.

Рис. 47. Клетки клубеньковой ткани, наполненные бактероидами клубеньковых бактерий (по: Ф. Бергерсен)

Ткань клубенька, заполненная бактероидами, обычно приобретает красноватую окраску благодаря пигменту *леггемоглобину,* родственному гемоглобину. Обычно такая окраска характерна для клубеньков, активно фиксирующих азот. Леггемоглобин выявляют уже на второй день после образования клубенька, а фиксацию азота — на четвертый день.

Леггемоглобин — один из важнейших продуктов симбиоза; в его образовании участвуют оба партнера — растение и бактерии: простетическая группа (протогем) синтезируется бактериями, а белковый компонент (апогемоглобин) образуется при участии растения. Леггемоглобин непосредственно не участвует в фиксации молекулярного азота, так как бактероиды могут связывать азот и без этого пигмента. Однако леггемоглобин обладает высоким сродством к кислороду, что облегчает его диффузию через клетку растений к бактероиду. Благодаря такой особенности леггемоглобина бактероиды получают кислород в количестве, достаточном для их роста и получения энергии. В то же время в клубеньке не возникает слишком высокого парциального давления кислорода, которое могло бы оказывать ингибирующее влияние на фиксацию азота бактероидами.

Клубеньки, образованные активными и неактивными клубеньковыми бактериями, различают по ряду признаков. Клубеньки, образовавшиеся при инфицировании неактивными клубеньковыми бактериями, содержат мало леггемоглобина и имеют зеленоватый цвет. Клубеньки, образованные активными штаммами, окрашены в розовый цвет. Кроме того, клубеньки неодинаково распределены по корневой системе растений. Активные расы клубеньковых бактерий образуют многочисленные клубеньки на главном корне, а на боковых их бывает мало.

По мере старения и дегенерации клубеньки отмирают. Определенную роль в этом процессе играет опробковение клеток сосу-

дистой системы, задерживающее обмен питательными веществами между растением-хозяином и клубеньком. В клетках клубеньков появляются вакуоли, ядро перестает окрашиваться, а бактероиды растворяются (лизируются). Лизис бактероидов по окончании активной жизни клубеньков обычно совпадает с некрозом клубеньков, наступающим после цветения растения-хозяина. Бактерии, сохранившиеся в неразвившихся инфекционных нитях, выходят в почву, где могут довольно долго (от одного года до 20 лет) существовать в отсутствие растения-хозяина.

У однолетних растений клубеньки также однолетние, у многолетних клубеньки могут функционировать в течение ряда лет. К концу сезона бактероидная ткань клубеньков многолетних растений разрушается, но клубеньки не отмирают и на следующий год вновь начинают функционировать.

Количество клубеньков на корнях бобовых растений всегда более или менее ограниченно. Клубеньки содержат больше азота, чем остальные части растения. Это служит доказательством того, что именно в клубеньках протекает процесс усвоения азота. Причем фиксация азота атмосферы осуществляется только в бактероидах, и около 90% связанного азота переходит из них в виде ионов аммония в цитоплазму корня бобового растения. Передача связанного азота из тканей клубенька в наземную часть растения происходит в период, когда бактероиды жизнеспособны. Определенное количество усвоенного растениями азота выделяется корнями в почву с продуктами корневых выделений, например с аминокислотами (аспарагиновой кислотой).

Условия формирования азотфиксирующей ассоциации. Эффективность азотфиксации симбиотической ассоциации бобовое растение — клубеньковые бактерии определяется наличием у клубеньковых бактерий целого комплекса симбиотических признаков:

- *вирулентности* — способности клубеньковых бактерий входить в контакт с корневой системой бобовых растений, проникать в ткани корня, размножаться в них и индуцировать образование клубеньков;
- *азотфиксирующей активности* — способности связывать молекулярный азот атмосферы при помощи специальной ферментативной системы и превращать его в ионы аммония;
- *эффективности* — способности увеличивать урожай и содержание белка у бобового растения-хозяина за счет передачи растению фиксированного азота и синтезированных биологически активных веществ;
- *конкурентоспособности* — способности внесенного в почву определенного штамма клубеньковых бактерий образовывать клубеньки в присутствии других штаммов того же вида;
- *специфичности* — способности вступать в эффективный симбиоз со строго определенным набором сортов и видов бобовых растений.

Перечисленные признаки генетически обусловлены и детерминированы в определенных генах. Так, способность к симбиозу у клубеньковых бактерий обычно детерминирована плазмидными генами: *hos*-гены обусловливают узнавание хозяина; *nod*-гены определяют способность образовывать клубеньки; *nif*-гены — способность к связыванию молекулярного азота. Плазмиды, в которых локализованы указанные гены, называют *sym*-плазмидами (от англ. *symbiosis inducing)*. У разных видов, а в ряде случаев и штаммов клубеньковых бактерий, число и размеры плазмид сильно варьируют. Так, отдельные штаммы бактерий могут иметь до семи плазмид молекулярной массой от 80 до 4000 МД.

Формирование симбиоза бобовых растений с клубеньковыми бактериями обеспечивается согласованным взаимодействием геномов растений и бактерий. Процесс возникновения и функционирования симбиотического сообщества сопровождается изменением экспрессии некоторых растительных и бактериальных генов. Ряд растительных генов, необходимых для возникновения симбиоза и осуществления азотфиксации, определены в генетических экспериментах.

Взаимодействие бактерий и растений базируется на существовании специальных генетических структур, связанных общими регулирующими механизмами. У бобового растения гены контролируют способность к формированию симбиотических взаимоотношений и место инфицирования. Например, штамм клубеньковых бактерий коровьего гороха заражает растение через корневые волоски, а штамм люпина — через «расщелины» в эпидермисе коры в местах отхождения боковых корешков. Геном бобового растения оказывает влияние на дифференцировку и морфологию бактероидов, количество клеток бактероидов, которые локализованы в одной вакуоли. Считают, что между бобовым растением и бактериями возможен прямой обмен генами.

Проявлением экспрессии генов служит возникновение в растении специфичных белков в ответ на инфицирование его клубеньковыми бактериями. Идентифицировано уже около 40 растительных белков — *нодулинов,* появляющихся лишь в клубеньках. Гены нодулинов обеспечивают бобовым растениям уникальную возможность удовлетворять потребности в азоте за счет его фиксации из воздуха. Можно считать установленным, что эффективность симбиотического сообщества бобовые растения — клубеньковые бактерии определяется в большей степени генотипом растения-хозяина, чем генотипом бактерий-симбионтов.

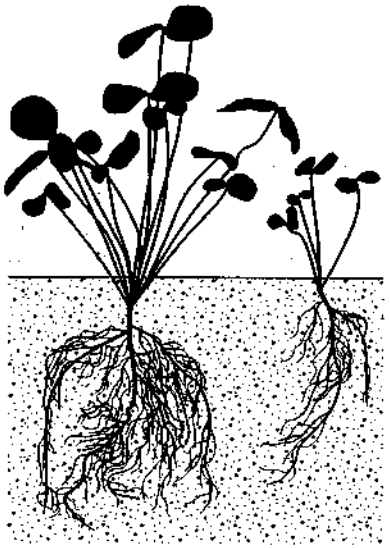


Рис. 48. Растения клевера, зараженные клубеньковыми бактериями: *слева* — растения, зараженные, активным штаммом; *справа* — растения, зараженные неактивным штаммом

Эффективность функционирования симбиотического аппарата также во многом зависит от способности бактерий активно фиксировать молекулярный азот в симбиозе с растением. В почве могут присутствовать штаммы клубеньковых бактерий активные, неактивные и переходные между ними. Заражение бобовых растений активными штаммами клубеньковых бактерий способствует активной фиксации азота. Неактивный штамм дает образование клубеньков, но фиксации азота в них не происходит (рис. 48). Активность клубеньковых бактерий меняется и в зависимости от внешних условий. Особенно легко бактерии теряют активность при неблагоприятных почвенных условиях.

Исследования показывают, что неактивные штаммы клубеньковых бактерий в почвах если и не преобладают, то встречаются очень часто. Возможно, уменьшение активности клубеньковых бактерий вызывается комплексом неблагоприятных свойств почв: повышенной кислотностью, недостатком органических веществ и т. д.

Обычно почвы содержат в достаточно большом количестве клубеньковые бактерии тех видов бобовых растений, которых много в составе дикой флоры данной местности или которые длительное время там культивируются. Если в данной местности не произрастает определенный вид бобовых или родственные ему по инокуляционной способности виды, то и свойственные им клубеньковые бактерии в почвах отсутствуют. Поэтому для обеспечения эффективного симбиоза семена бобовых перед посевом заражают высокоактивными штаммами клубеньковых бактерий, специфичных для данного растения.

На количество клубеньковых бактерий в почве влияют ее свойства и состояние. Например, в нейтральных почвах (черноземах и др.) бактерии размножаются лучше, чем в кислых, здесь чаще встречаются активные формы. Окультуривание почв, особенно с внесением органических удобрений, улучшает условия для размножения клубеньковых бактерий.

11.4. Бактерии-симбионты небобовых растений

У многих небобовых растений, как древесных и кустарниковых, так и травянистых, также существуют корневые клубеньки, способные связывать молекулярный азот. Фиксация азота в таких случаях, как и у бобовых, основана на симбиозе с прокариотами. У древесной и кустарниковой растительности клубеньки чаще всего образуются азотфиксирующими актиномицетами, у травянистой — бактериями. В большинстве случаев симбионтами деревьев и кустарников служат актиномицеты **рода *Frankia*** (рис. 49). Это аэробные организмы с септированным мицелием, образующим спорангии.

Известны 17 родов древесных и кустарниковых покрытосеменных растений, образующих с *Frankia* клубеньки. Они относятся к порядкам *Casuarinales, Coriariales, Fagales, Cucurbitales, Myricales, Rhamnales* и *Resales.* Среди растений, которые весьма эффективно связывают азот, казуарина *(Casuarina),* ольха *(Alnus),* облепиха *(Hippophae),* менее эффективны в этом отношении восковница *(Myrica),* куропаточья трава *(Dryas),* лох *(Elaeagnus)* и шефердия *(Shepherdia).*

Корневые клубеньки древесных растений довольно крупные, обычно они формируются на боковых корнях. Клубеньки бывают двух типов — коралловые (густые сплетения корней, разветвленных наподобие кораллов) и с прорастающими через дольки клубенька корнями (рыхлый пучок утолщенных корней), направленными

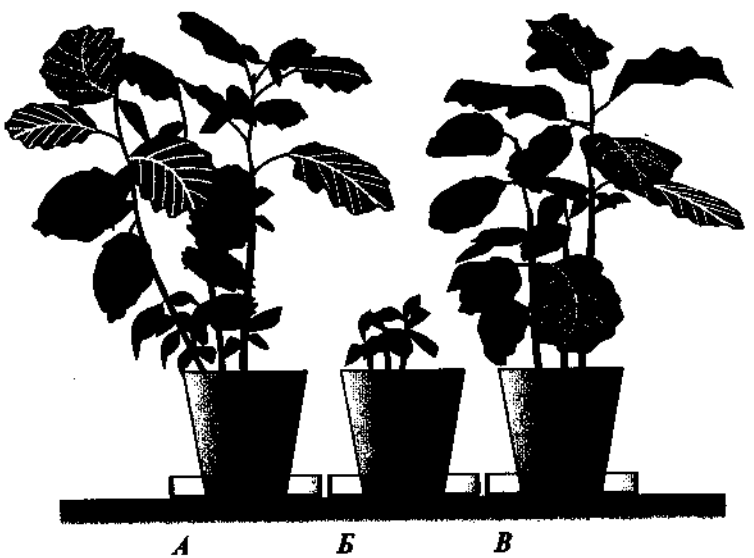


Рис. 49. Влияние заражения актиномицетами рода *Frankia* на рост ольхи: *А, В* — растения, инфицированные *Frankia; Б* — незараженное растение (по: С. О. Суэтин)

вверх. Первый тип клубеньков наблюдается у ольхи и облепихи, второй — у казуарины. Установлено, что азотфиксирующие актиномицеты обладают определенной специфичностью к растениям. Например, одна группа *Frankia* заражает ольху, восковник и «сладкий» папоротник (компония), другая — лох, облепиху и шефердию.

Актиномицеты-симбионты способны инфицировать только паренхимные клетки коры корня. Как и при заражении бобовых, микроорганизм проникает в корни из почвы через корневые волоски, которые в результате скручиваются. В месте инфицирования стенки корневого волоска утолщаются и гифы, проникшие внутрь клетки, покрываются толстым чехлом. По мере продвижения гиф по корневым волоскам чехол утоньшается, и вокруг гиф формируется капсула, которая, как считают, образуется как растением, так и актиномицетом.

Из корневого волоска гифы проникают в эпидермис и кору корня, вызывая деление и гипертрофию инфицированных клеток. Как правило, клубки гиф заполняют центр клеток растения, у клеточных стенок происходит расширение и деление концов гиф, в последнем случае формируются специфичные структуры, так называемые *везикулы* (рис. 50). В клубеньках образуется вещество, подобное леггемоглобину бобовых растений. В конце вегетации везикулы деградируют, но в клетках растений сохраняются гифы, зарастающие весной новые ткани. Обычно при симбиозе с небобовыми растениями энергия азотфиксации актиномицетами рода *Frankia* больше, чем у клубеньковых бактерий бобовых растений.

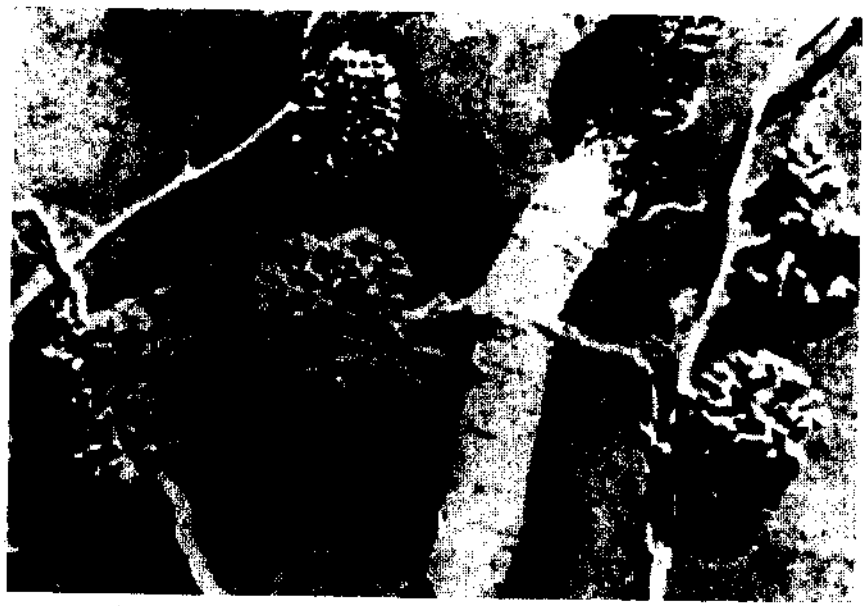


Рис. 50. Везикулы, образованные мицелием *Frankia* в клубеньках ольхи (по: И. Гарднер)

Клубеньки обнаружены у большой группы травянистых растений — злаковых, осоковых, лютиковых и др. В клубеньках этих растений выявлены микробные ассоциации, состоящие из двух-трех видов микроорганизмов, которые представлены грамположительными и грамотрицательными бактериями. Установлено, что в клубеньках осуществляется азотфиксация, однако роль отдельных бактерий в нем пока не определена.

В последнее время из клубеньков на растениях, не относящихся к бобовым, — тропическом кустарнике *Trema orientalis* (семейство крапивных) и близком к нему *Parasponia parviflora* — выделены бактерии, близкие к клубеньковым бактериям бобовых. Указанные бактерии способны заражать бобовые растения и образовывать клубеньки. Их относят к роду *Rhizobium*. Из клубеньков на листьях тропических кустарников *Pavetta* и *Psychotria* выделены азотфиксирующие бактерии, отнесенные к роду *Klebsiella {Klebsiella rubacearum)*. Листовые клубеньки также обогащают растение азотом. Поэтому в Индии, Шри-Ланке и других странах листья *Pavetta* используют как зеленое удобрение.

Азотфиксирующие симбионты обогащают почву азотом в следующей степени: однолетние бобовые (фасоль, соя, вика, бобы, горох, чечевица) накапливают 40—110 кг/га азота в год), многолетние (клевер, люцерна) — 150—220, тропическое бобовое — *Sesbania rostrata* — от 324 (сухой сезон) до 458 (влажный сезон), небобовые растения — 150—300 кг/га азота в год.

11.5. Биохимия азотфиксации

Молекула азота характеризуется очень прочной тройной связью, которая обусловливает инертные свойства газа. Так, азот с трудом вступает в химическую связь с другими элементами и веществами. Используемый в производстве азотных минеральных удобрений метод Габера—Боша, заключающийся в синтезе аммиака из молекулярного азота и водорода на катализаторах, требует высоких температуры и давления. В то же время микробиологическое связывание молекулярного азота осуществляется при обычных температуре и давлении.

Фиксация азота атмосферы представляет собой восстановительный процесс, и первым его продуктом, который можно выявить, служит аммиак. Процесс восстановления азота представляет собой ряд ферментативных реакций, осуществляемых ферментным комплексом нитрогеназой. Активный центр нитрогеназы содержит два компонента: первый состоит из белка, в состав которого входят молибден, железо и сера, или Mo-Fe-белка, второй — из белка, содержащего железо и серу, или Fe-S-белка. Выявлена также ванадий-

содержащая нитрогеназа, однако уровень активности ее на 30% ниже, чем у молибденсодержащей нитрогеназы. В природных субстратах при нехватке молибдена последний может замещаться ванадием.

Впервые нитрогеназа была обнаружена в клетках анаэробного азотфиксатора *Clostridium pasteurianum,* затем у аэробных свободноживущих бактерий, клубеньковых бактерий и других связывающих азот микроорганизмов. Нитрогеназа и катализуемый ею процесс фиксации азота характеризуются чрезвычайно высокой чувствительностью к молекулярному кислороду. Последний служит энергичным акцептором водорода и подавляет образование восстановленных продуктов азота.

У свободноживущих азотфиксаторов существуют особые механизмы, защищающие нитрогеназу от кислорода. Как уже отмечалось, у клубеньковых бактерий функцию защиты нитрогеназы от высокого парциального давления кислорода выполняет леггемоглобин, обладающий высоким сродством к кислороду. Леггемоглобин цитоплазмы клеток клубенька, в которых локализованы бактероиды, препятствует свободному доступу кислорода, обеспечивая дозированное его поступление, что необходимо бактероидам для роста и получения энергии, и в то же время не сказывается отрицательно на фиксации азота.

Считают, что процесс связывания молекулярного азота начинается с поступления азота, растворенного в воде, в азотфиксирующий центр, где в активации молекулы азота участвуют два атома молибдена (рис. 51). В результате взаимодействия с азотом молибден восстанавливается, принимая электроны, которые поступают в активный центр через Fe-S-белок и Mo-Fe-белок. Такой перенос электронов связан с гидролизом АТФ, т. е. идет с затратой энергии. В транспорте электронов к нитрогеназе принимает участие железосодержащий водорастворимый белок-фермент ферредоксин, а в активации водорода воды и переносе протонов — фермент гидрогеназа.

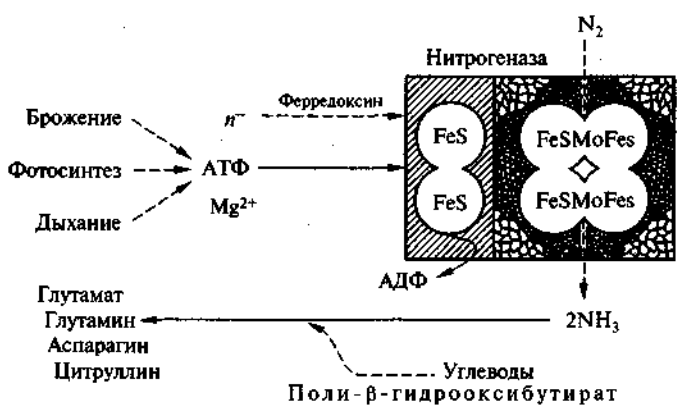


Рис. 51. Схема взаимосвязи процессов, лежащих в основе фиксации молекулярного азота (по: В. Л. Кретович)

Восстановленный ферредоксин, служащий донором электронов, образуется у свободноживущих азотфиксаторов рода *Clostridium* при так называемом фосфорокластическом расщеплении пирувата с образованием ацетилфосфата, а у пурпурных зеленых серобактерий и цианобактерий — в процессе фотосинтеза.

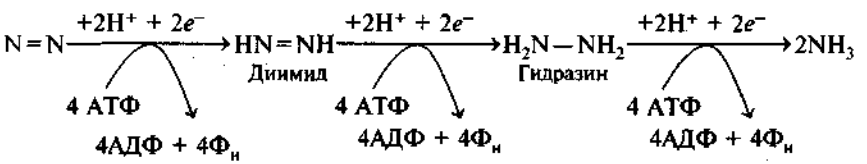
Главный источник АТФ у аэробных азотфиксаторов — окислительное фосфорилирование, у анаэробных — фосфорокластическая реакция, у фототрофных фиксаторов азота — фотофосфорилирование. Для клубеньковых бактерий источником энергии для процесса фиксации азота служат продукты фотосинтеза, поступающие из листьев растений. Они трансформируются и запасаются в бактероидах главным образом в виде поли-*B*-гидроксимасляной кислоты, при использовании которой происходит образование АТФ.

Восстановление одной молекулы азота до двух молекул NH_3 требует затраты энергии в виде 12 молекул АТФ:

$$N_2 + 6H^+ + 6e^- + 12АТФ \longrightarrow 2NH_3 + 12АДФ + 12Ф_н$$

Как видно, процесс фиксации молекулярного азота связан с затратами большого количества энергии. Например, *Clostridium pasteurianum* для связывания 1 мг N_2 в процессе брожения перерабатывает 500 мг сахара. Источниками протонов, электронов и АТФ служат процессы брожения (у анаэробных азотфиксаторов), дыхания (у аэробных азотфиксаторов) и фотосинтеза (у цианобактерий, пурпурных и зеленых серных бактерий).

Восстановление молекулярного азота до аммиака осуществляется в три последовательные стадии. Вначале N_2 превращается в диимид ($HN=NH$), затем в гидразин (H_2N-NH_2) и, наконец, в NH_3:



Установлено, что нитрогеназа может восстанавливать не только молекулярный азот ($N\equiv N$), но и ацетилен ($HC\equiv CH$), азид, закись азота, цианид, нитриты, изонитрилы и протоны. На восстановлении ацетилена основан метод, который используют для выявления нитрогеназы. Ацетилен восстанавливается только до этилена, который достаточно легко определить методом газовой хроматографии. Все до настоящего времени изученные азотфиксирующие бактерии и симбиотические ассоциации обладают способностью восстанавливать ацетилен в этилен. Нитрогеназная система при участии АТФ катализует также восстановление протонов, сопряженно образующихся в процессе азотфиксации, до молекулярного водорода.

Аммиак, образовавшийся в процессе фиксации N_2, связывается кетокислотами, что приводит к синтезу аминокислот. Так, из

2-оксоглутарата и аммиака получается глутаминовая кислота. Глутаминовая кислота с затратой энергии в виде АТФ превращается в глутамин, а из него синтезируется важнейший метаболит — аспарагин. Из щавелевоуксусной кислоты и аммиака образуется аспарагиновая кислота, из пирувата и NH_3 — *а*-аланин и т. д. В дальнейшем аминокислоты идут на синтез белков и других азотсодержащих органических соединений.

Процесс связывания молекулярного N_2 бактериями подвержен регуляции. Так, у многих микроорганизмов синтез нитрогеназы происходит только тогда, когда она нужна, т. е. когда в среде отсутствует источник связанного азота. В присутствии ионов аммония синтез фермента подавляется. В регуляции образования нитрогеназы важная роль принадлежит ферменту *глутаминсинтетазе*. Глутаминсинтетаза и глутаматсинтаза необходимы микроорганизмам, чтобы включать ионы аммония в органические соединения в тех случаях, когда их концентрация NH^+_4 низка. Благодаря высокому сродству к ионам аммония эти ферменты поддерживают концентрацию NH^+_4 в бактериальной клетке на низком уровне. Увеличение концентрации ионов аммония в среде, а следовательно, и внутри клетки бактерии, ингибирует глутаминсинтетазу, а в конечном итоге и синтез нитрогеназы.

Бактериальные гены, вовлеченные в процесс азотфиксации, обозначаются индексами *nif* и *fix*. Синтез нитрогеназного комплекса у микроорганизмов непосредственно кодируется 17 *nif*-генами, которые либо входят в состав хромосомы *(Klebsiella, Bradyrhizobium),* либо существуют в форме огромной мегаплазмиды *(Rhitobium)*. Остальные гены, участвующие в азотфиксации (кроме *nif*-генов), относят к *fix*-генам. Гены *nif* высококонсервативны, поэтому при переносе в другие виды бактерий продукты указанных генов легко «вписываются» в метаболизм нового хозяина. Следовательно, способность к связыванию азота может передаваться от одной бактерии к другой при прямом межклеточном контакте. Благодаря существованию эффективных систем обмена генетической информацией *nif*-гены достаточно широко распространены в мире микроорганизмов.

В 80-х гг. XX столетия разрабатывался генно-инженерный проект, направленный на перенос *nif*-генов в высшие растения с тем, чтобы обеспечивать фиксацию азота непосредственно в растительных тканях независимо от наличия симбиотических микроорганизмов. В рамках этого проекта была предпринята попытка передать группу *nif*-генов *Klebsiella pneumoniae* в клетки низших эукариот — дрожжей. В одном случае все 17 *nif*-генов были интегрированы в хромосому дрожжей, а в другом — была осуществлена трансформация дрожжевых клеток автономной плазмидой со встроенной *nif*-областью.

Однако в обоих типах трансформированных клеток дрожжей — и с хромосомой, и с плазмидной локализацией *nif*-области — отсутствовала как фиксация азота, так и заметная экспрессия каких бы то ни было трансформированных генов. Осуществление азотфиксации вне клеток азотфиксирующих бактерий сопряжено с большими трудностями, в частности, поскольку для связывания N_2, помимо нитрогеназы необходимы еще специфичные железо- и серосодержащие белки, требуется также защита этого фермента от кислорода. Однако удалось передать *nif*-гены от *Klebsiella pneumoniae* к *Escherichia coli* при конъюгации, при этом наблюдались нормальная экспрессия *nif*-генов и успешная азотфиксация. Успешно проведены и другие эксперименты по переносу плазмидных *nif*-генов в клетки неазотфиксирующих прокариот.

Контрольные вопросы и задания

1. Каково значение фиксации молекулярного азота для растений? 2. Приведите примеры свободноживущих микроорганизмов, усваивающих азот. 3. В чем суть ассоциативной азотфиксации и какие микроорганизмы ее выполняют? 4. Какие растения вступают в симбиотические отношения с азотфиксирующими бактериями? 5. Перечислите симбиотические признаки клубеньковых бактерий. 6. На какие стадии можно разделить процесс восстановления молекулярного азота до аммиака?

Глава 12 Микробиологические превращения соединений серы, фосфора, железа

В биосфере постоянно происходит круговорот элементов, в котором основная роль принадлежит микроорганизмам. В предыдущих главах мы познакомились с разнообразными микробиологическими процессами, которые связаны с превращениями углерода, кислорода и азота. Ниже рассматриваются циклические превращения таких важных элементов, как сера, фосфор и железо.

12.1. Биологический цикл соединений серы

Сера — необходимый питательный элемент для организмов. В почве она встречается в форме сульфатов — $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, Na_2SO_4, K_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$, сульфидов — FeS_2, Na_2S, ZnS и органических соединений. Сера содержится в аминокислотах белков — растений, животных и микроорганизмов, валовые ее запасы в почвах сравнительно невелики, и растения часто испытывают недостаток в ней.

Органические и неорганические формы серы под влиянием деятельности микроорганизмов подвергаются в почве различным пре-

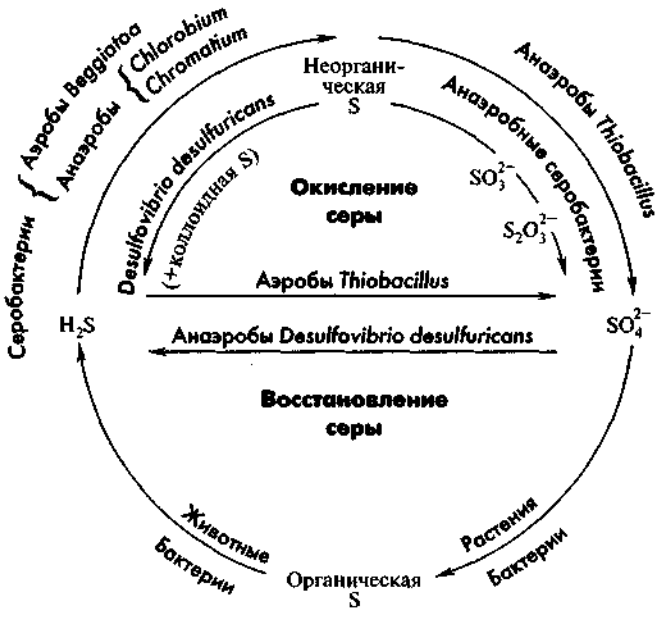


Рис. 52. Биологический цикл превращения серы

вращениям. Направление трансформаций соединений серы регулируется в основном факторами внешней среды. Органические соединения серы могут быть разрушены и минерализованы. В определенных условиях восстановленные неорганические соединения серы подвергаются окислению микроорганизмами, а окисленные (сульфаты, сульфиты и др.), наоборот, могут быть восстановлены в H_2S (рис. 52).

Окисление соединений серы. Среди активных окислителей восстановленных неорганических соединений серы можно выделить следующие группы микроорганизмов:

- тионовые бактерии, представленные родами *Thiobacillus, Thiosphaera, Thiomicrospira, Thiodendron,* а также ахребактерии рода *Sulfolobus;*
- одноклеточные и многоклеточные (нитчатые, образующие трихомы) формы, относящиеся к родам *Achromatium, Thiobacterium, Thiospira, Beggiatoa, Thiothrix, Thioploca* и др.;
- фотосинтезирующие пурпурные и зеленые серные бактерии, а также некоторые цианобактерии;
- хемоорганогетеротрофные организмы родов *Bacillus, Pseudomonas,* актиномицеты и грибы *(Penicillium, Aspergillus).*

Микроорганизмы первой группы обитают в почве. Нитчатые формы встречаются главным образом в грязевых водоемах, возможно их развитие в затопленных почвах, содержащих восстановленные формы серных соединений. Фотосинтезирующие бактерии преимущественно обитают в водной среде (пруды, морские лагуны, озера и т. д.).

Наиболее широко распространены **тионовые бактерии** рода *Thiobacillus,* впервые выделенные из морского ила в 1902 г. *М. Натансоном,* а в 1904 г. — М. Бейеринком. Представители данного рода способны окислять тиосульфат, сероводород, сульфиды, тетратионаты и тиоцианаты. Наиболее изучены виды: *T. thiooxidans, T. thioparus, T. novellus, T. denitrificans, T. ferrooxidans* и др.

Бактерии рода *Thiobacillus* представляют собой неспорообразующие грамотрицательные палочки длиной от 1 до 4 мкм, диаметром около 0,5 мкм. Большинство видов рода подвижны и передвигаются с помощью полярного жгутика. Источником углерода для синтеза органических соединений бактерии служат CO_2 и бикарбонаты.

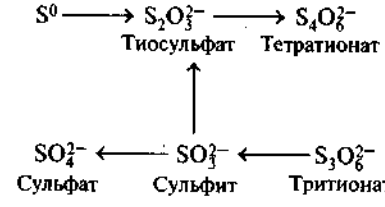
За исключением *T. novellus* и некоторых других видов, относящихся к факультативным хемолитоавтотрофам и хемолитогетеротрофам, представители рода *Thiobacillus* облигатные хемолитоавтотрофы, т. е. живут за счет энергии, выделяющейся при окислении неорганических соединений серы. Ход окислительных процессов, вызываемых серными бактериями, может быть представлен следующими уравнениями:

$$H_2S + 1/_2O_2 \longrightarrow S + H_2O$$
$$H_2S + 2O_2 \longrightarrow H_2SO_4$$
$$2S + 3O_2 + 2H_2O \longrightarrow 2H_2SO_4$$
$$5Na_2S_2O_3 + 4O_2 + H_2O \longrightarrow 5Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 4S$$
$$2Na_2S_2O_3 + 1/_2O_2 + H_2O \longrightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaOH$$

Тетратионаты могут подвергаться дальнейшему окислению до серной кислоты:

$$Na_2S_4O_6 + SO_2 + 6H^+ \longrightarrow Na_2SO_4 + 3H_2SO_4$$

Гипотетическая цепь реакций окисления элементарной серы бактериями рода *Thiobacillus* может быть представлена в следующем виде:



По имеющимся данным, для окисления бактериями молекулярной серы необходим ее контакт с клетками, причем скорость

процесса зависит от площади соприкосновения элемента с бактериальными клетками. Последнее позволяет предположить, что на клеточной поверхности бактерий действуют ферменты, способствующие поступлению серы внутрь клетки, и под их влиянием сера восстанавливается до сульфидного иона, окисление которого происходит в дальнейшем внутриклеточно. *Sulfolobus sp.* и *Thiobacillusferrooxidans* кроме окисления серы обладают также способностью окислять двухвалентное железо Fe^{2+}.

Тионовые бактерии — облигатные аэробы, за исключением *T. denitrificans,* который в присутствии нитрата развивается как анаэроб. В последнее время обнаружены сероокисляющие бактерии, способные к жизнедеятельности при pH 2—3 и температуре 70—75 °С и сохраняющие жизнеспособность при 90 °С. Это **термоацидофильные архебактерии,** факультативные хемолитоавтотрофы рода *Sulfolobus.* Распространены они в термальных серных источниках.

Одноклеточные бесцветные серобактерии представлены *Achromatium, Thiobacterium, Macromonas, Thiospira* и др. Эти организмы имеют сферическую, овальную, палочковидную или извитую форму, есть подвижные и неподвижные, грамотрицательные. К **многоклеточным бесцветным (нитчатым) серным бактериям** относят микроорганизмы родов *Beggiatoa, Thioploca, Thiothrix* и др. Они окисляют сероводород до элементарной серы, которая временно откладывается внутри клеток. Установлена способность бактерий указанных родов окислять серу и использовать органические вещества. Способность автотрофного усвоения CO_2 для снабжения клеток углеродом пока не доказана.

Окисляют соединения серы также **фотолитоавтотрофные пурпурные и зеленые серные бактерии.** Они обычно обитают в среде, где имеется H_2S. Большой роли в почвах не играют.

Серу могут окислять многие хемоорганогетеротрофные микроорганизмы, например некоторые виды родов *Bacillus, Pseudomonas,* актиномицетов и грибов. Хемоорганогетеротрофные организмы окисляют серу в присутствии органических веществ. Такое превращение представляется для них побочным процессом в главном направлении метаболизма. Окисление серы хемоорганогетеротрофными микроорганизмами идет довольно медленно и слабо.

Бактерии, окисляющие неорганические соединения серы, применяют при разработке месторождений полезных ископаемых. Так, проведены исследования, которые позволили начать применение окисляющих серу бактерий из рода *Thiobacillus .(T. ferrooxidans)* для выщелачивания бедных сульфидных руд. Наиболее практически освоены методы микробиологического выщелачивания меди из минералов, в которых медь соединена с серой. Обработке подвергают отвалы бедных руд на поверхности или под землей. Аналогично бактерии рода *Thiobacillus* можно использовать для получения различных металлов и редких элементов из минералов, содержащих серу.

Использование микробов в качестве «металлургов» экономически выгодно. Стоимость меди, полученной микробиологическим выщелачиванием, обходится в два с половиной раза дешевле, чем гидрометаллургическим способом. Микробиологический способ разработки полезных ископаемых применяют во многих странах мира.

Восстановление неорганических соединений серы. Оно осуществляется при разнообразных обменных процессах. Сульфаты могут быть источником серы как для микро-, так и для макроорганизмов. Усвоение данных соединений сопровождается восстановлением серы в биосинтетических процессах, при так называемой ассимиляционной сульфатредукции. Если растворимые сульфаты закрепляются в клетках микроорганизмов, процесс обозначают как *иммобилизацию* серы.

В плохо аэрированных, затопляемых почвах, с дефицитом кислорода, а также в водах лиманов, некоторых морей и других водоемов в зоне анаэробиоза происходит микробиологическое восстановление сульфатов в результате диссимиляционной сульфатредукции, или сульфатного дыхания.

Среди бактерий, вызывающих восстановление сульфатов, наиболее подробно изучены неспорообразующие — род *Desulfovibrio* и спорообразующие — род *Desulfotomaculum.*

К роду *Desulfovibrio* относят неспороносные грамотрицательные изогнутые палочки, иногда S-образные или спиральные, имеющие полярные жгутики и отличающиеся большой подвижностью. Это облигатные анаэробы, мезофилы (оптимальная температура 30 °С). Обнаружены в морской воде или иле, пресной воде и почве. Типичный вид — *Desulfovibrio desulfuricans.* Известны также *D. vulgaris* и *D. gigas.* Среди представителей рода встречаются галофилы.

Бактерии рода *Desulfotomaculum* представлены грамотрицательными, прямыми или изогнутыми спорообразующими подвижными палочками с перитрихальным расположением жгутиков. Это облигатные анаэробы, восстанавливающие сульфаты до сульфидов. Они обнаружены в пресных водах, почвах, геотермальных областях, некоторых испорченных продуктах, в кишечнике насекомых и рубце животных. *Desulfotomaculum nigrificans* может превращать сульфаты в сульфиды при высоких температурах (оптимум 55 °С). К роду *Desulfotomaculum* относят также *D. orientis,* представленный изогнутыми палочками, *D. ruminis* и О. *acetooxidans,* имеющие прямые палочки.

Обнаружен ряд новых сульфатредуцирующих бактерий, — в частности, рода *Desulfobacter* с неспорообразующими палочками, родов *Desulfococcus* и *Desulfosarcina,* представленных кокковыми

формами, и рода *Desulfonema,* — имеющих нитевидную форму и передвигающихся скольжением.

Сульфатредуцирующие бактерии — специализированная группа анаэробных микроорганизмов, использующих сульфат как акцептор электронов (водорода) для окисления органических соединений или водрода. Большинство сульфатредуцирующих бактерий относится к гетеротрофам, но известны и автотрофные виды. Донором электронов (водорода) для сульфатредукторов служат органические соединения (кислоты, спирты), а также молекулярный водород; продуктом восстановления соединений серы является H_2S.

Анаэробное окисление органических веществ некоторыми сульфатредуцирующими бактериями *(Desulfotomaculum nigrificans, D. orientis, D. ruminis, D. vulgaris, D. desulfuricans* и др.) является неполным и ведет к аккумуляции уксусной кислоты и ее солей как конечного продукта:

$$2CH_3CHOHCOONa + MgSO_4 \longrightarrow H_2S + 2CH_3COONa + CO_2 + MgCO_3 + H_2O$$

Лактат натрия — Ацетат натрия

Другие виды осуществляют полное окисление органических веществ, в том числе и ацетата, до CO_2.

Восстановлению могут подвергаться и другие соединения серы, например тиосульфаты и молекулярная сера. Восстановление SO_3^{2-} и $S_2O_3^{2-}$ до S_x° осуществляют облигатно анаэробные бактерии *Clostridium thermosulfurogenes,* выделенные из термального источника. Это хемоорганогетеротрофы, термофилы, они могут вызывать брожение с образованием этанола, молочной и уксусной кислот, H_2, осуществляют гидролиз пектина и крахмала. Восстановление тиосульфата *C. thermosulfurogenes* выполняют с образованием молекулярной серы, которая откладывается на их клеточных стенках и выделяется в среду.

Молекулярную серу могут восстанавливать до H_2S многие термоацидофильные облигатно анаэробные архебактерии — *Desulfurococcus mucosus, Pyrococcus furiosus, Thermoproteus tenax* и др. Перечисленные виды обитают в кислых гидротермальных источниках. Так, для *Pyrococcus furiosus* оптимальная кислотность среды составляет 1, температурный оптимум — 100 °С. В анаэробных условиях серу могут восстанавливать архебактерии рода *Sulfolobus,* которые, как указывалось выше, в аэробных условиях серу окисляют.

Значительное количество сероводорода образуется при минерализации белковых соединений. Возбудителями данного процесса служат бактерии родов *Pseudomonas, Bacillus, Proteus, Clostridium* и др. Считают, что биогенная сера, которая поступает в атмосферу в виде органических летучих соединений, представляет главным образом продукт жизнедеятельности бактерий, минерализующих белковые вещества.

Сульфатредуцирующие бактерии наносят определенный ущерб, разрушая материалы, неустойчивые к сероводороду. Указанные организмы разлагают нефтяные продукты, загрязняют сероводородом промышленный газ и т. д. Деятельность сульфатредуцирующих бактерий — одна из причин коррозии металлического оборудования в анаэробной зоне. Считают, что ущерб от коррозии трубопроводов под землей наполовину может быть отнесен на счет этих микроорганизмов.

Сероводород токсичен, поэтому при накоплении его в почве растительность быстро погибает. Если сероводород образуется в водоеме, то растения и животные в нем также гибнут. В некоторых озерах, лиманах и даже в открытом море на определенной глубине (в Черном море на глубине 200 м) сероводород накапливается в таком количестве, что полностью подавляет развитие большинства живых существ.

В то же время бактерии, восстанавливающие сульфаты, играют большую роль в геологических процессах. Они образуют H_2S, участвующий в образовании серных руд. При окислении сероводорода серными бактериями появляются залежи серы промышленного значения. Сульфатредуцирующие бактерии участвуют и в образовании сульфидных руд.

12.2. Превращение соединений фосфора

Превращение органических соединений фосфора. По значению в питании растений фосфор занимает второе место после азота. Он входит в состав почвы, растений и микроорганизмов в виде органических и неорганических соединений.

В почву соединения фосфора поступают с растительными и животными остатками, а также с минеральными удобрениями.

Фосфор в почве может быть в следующих формах:

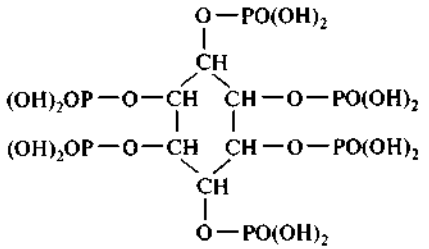
- в составе первичных минералов — в форме фосфатов кальция (апатиты, оксиапатиты, фторапатиты, фосфориты), фосфатов или оксифосфатов железа (вивианит);
- в органической форме — от 25 до 85% общего фосфора в разных почвах; органический фосфор составляет от 0,5 до 2% органического вещества почвы; фосфор входит в состав фитина и других инозитфосфатов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, лецитина и гумусовых соединений.

Сельскохозяйственные растения содержат от 0,05 до 0,5% фосфора. У растений, как и у животных, данный элемент находится в форме органических соединений (фитин, фосфолипиды, нуклеиновые кислоты и т. д.). Фосфор (неорганический ортофосфат) может также присутствовать в клеточных вакуолях в качестве внутреннего буфера.

В противоположность азоту и сере, которые в растительных тканях находятся в восстановленной форме ($=NH_2$, $=SH$), фосфор входит в органические соединения в окисленной форме — в виде фосфата.

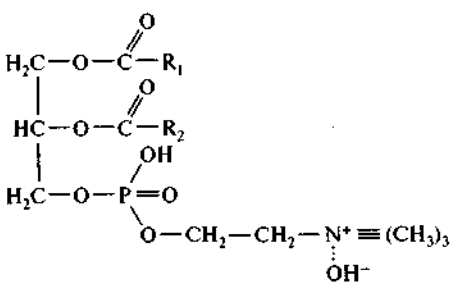
В обмен микроорганизмов вовлекаются такие фосфорорганические соединения, как фитин, фосфолипиды, нуклеопротеиды.

Фитин — кальциймагниевая соль инозитфосфорной кислоты:



Инозитфосфорная кислота

Фосфолипиды, или **фосфатиды,** или сложные жиры, представляют собой эфиры глицерина и высокомолекулярных жирных кислот. Например, один из спиртовых гидроксилов глицерина образует эфир с фосфорной кислотой, которая, в свою очередь, связана с каким-либо другим соединением. Таким соединением может быть холин (тогда фосфолипид носит название *лецитин),* или коламин (тогда фосфолипид именуют *кефалином):*



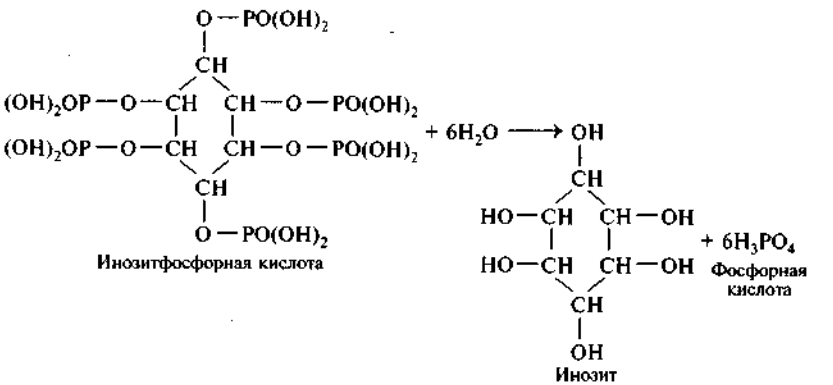
Лецитиноподобное соединение
(R_1, R_2-жирные кислоты)

Нуклеопротеиды состоят из белков и нуклеиновых кислот. В молекулу последних входит ряд пуриновых и пиримидиновых оснований, пентоза (сахар) и фосфат.

Большой резерв органического фосфора в почве не может быть использован растениями без предварительного превращения его микроорганизмами в доступную неорганическую форму.

Органические источники фосфора усваиваются микроорганизмами с различной скоростью. Легче всего дефосфорилируются нуклеиновые кислоты, фитин разлагается медленно, лецитин по скорости разложения занимает среднее положение. В качестве примера показано разложение фитина микроорганизмами. Под влиянием фермента фитазы фосфат отщепляется от

инозитфосфорной кислоты или ее кальциймагниевой соли — фитина с образованием инозита и фосфорной кислоты:



Инозитфосфорная кислота

Инозит

Органические соединения фосфора разлагаются бактериями родов *Pseudomonas, Bacillus (B. megaterium, B. mesentericus),* грибами родов *Penicillium, Aspergillus, Rhizopus, Trichothecium,* некоторыми актиномицетами и другими микроорганизмами. Разложение указанных соединений осуществляют также дрожжи *(Rhodotorula, Saccharomyces, Candida, Hansenula* и др.).

Разложение органических веществ при участии микроорганизмов сопровождается фиксацией в клетках определенного количества фосфора в виде тех же органических веществ. Поэтому внесение в почву органических соединений, слишком бедных фосфором, например соломы, может вызывать биологическое закрепление фосфатов и связанное с ним фосфорное голодание растений.

Превращение неорганических соединений фосфора. Ряд неорганических форм фосфора в почве представлен нерастворимыми фосфатами кальция (апатиты, оксиапатиты, фосфориты), которые содержатся в основном в нейтральных и щелочных почвах (в кислых преобладают соли железа и алюминия). Такие соединения фосфора входят в состав минералов и недоступны или слабо доступны растениям. Многие микроорганизмы могут переводить нерастворимые соединения фосфорной кислоты в растворимое состояние, среди них представители бактерий, актиномицетов, грибов и других групп микроорганизмов родов *Pseudomonas, Bacillus, Micrococcus, Mycobacterium, Penicillium, Aspergillus* и т. д. Растворение фосфатов в почве происходит в результате образования диоксида углерода или различных кислот.

Появляющийся в результате дыхания или других процессов разрушения органического вещества диоксид углерода в присутствии воды переходит в угольную кислоту, которая более или менее быстро растворяет нерастворимый фосфат:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 2CO_2 + 2H_2O \longrightarrow 2CaHPO_4 + Ca(HCO_3)_2$$

Мобилизация нерастворимых соединений фосфора происходит также благодаря образованию микроорганизмами органических кислот и кетокислот при неполном окислении углеводов или их брожении. В некоторых случаях растворению фосфатов способствуют азотная кислота, образующаяся при жизнедеятельности нитрифицирующих бактерий, серная кислота, появляющаяся в результате деятельности сероокисляющих бактерий.

12.3. Превращение соединений железа

Железо в небольших количествах необходимо всем живым существам. В почве оно содержится в органическом и неорганическом виде. Растительные организмы усваивают неорганические соединения железа, находящиеся в почве в растворимом виде. Существенную, если не основную, роль в трансформации железа в природе, в частности в переводе нерастворимых его соединений в растворимые и обратно, играют микроорганизмы. Биологический цикл железа показан на рисунке 53.

Минерализация органических соединений, содержащих железо. Органические вещества, содержащие железо, могут быть представлены ферментами каталазой и пероксидазой, цитохромами, железопорфириновыми соединениями и др. Минерализацию железосодержащих органических соединений осуществляют многие хемоорганогетеротрофные организмы (бактерии, актиномицеты и грибы). Органическую часть молекулы, содержащей железо, усваивает тот или иной микроорганизм, а железо освобождается и в аэробных условиях, как правило, осаждается в виде гидроксида. Таким образом, осаждение элемента часто происходит в результате непосредственного воздействия микроорганизмов на органическую часть соединения, а не на само железо.

шгт **Окисление восстановленных соединений железа.** Многие микроорганизмы прямо или косвенно участвуют в окислении железа. Их называют железобактериями. Данные организмы окисляют комплексные органические соединения железа, а образующийся в результате гидроксид железа откладывается на поверхности их клеток. Железобактерии представлены нитчатыми бактериями, флексибактериями, одноклеточными бактериями различных родов, микоплазмами, цианобактериями.

Рис. 53. Биологический цикл превращения железа

Все железобактерии подразделяют на две большие группы: хемоорганогетеротрофы и хемолитоавтотрофы. К хемоорганогетеротрофным железобактериям относят нитчатые, одноклеточные формы бактерий и микоплазмы.

Нитчатые железобактерии разнообразны по морфологии, окисляют неорганические соединения железа в болотах, ручьях, железистых источниках, озерах, дренажных трубах и других влажных местах с образованием охристых осадков. Указанные микроорганизмы называют охрообразователями. К ним относятся грамотрицательные, аэробные бактерии, имеющие слизистые чехлы, в которых накапливается окисное железо. У одних видов железобактерий нити неподвижны *(Leptothrix),* флексибактерии обладают способностью к скольжению *(Toxothris, Spirothrix).*

Род *Leptothrix* включает железобактерии, образующие цепочки клеток. Их боковая поверхность выделяет гидроксид железа, из которого формируется цилиндрический чехол, покрывающий всю цепочку. По мере утолщения чехла ограничивается доступ к клеткам закисного железа, кислорода и CO_2. Вследствие этого бактериальные клетки покидают старые чехлы, выходят наружу и начинают строить новые чехлы. Из пустых чехлов образуются охристые осадки в водоемах.

Окисление Fe^{2+} *Leptothrix* осуществляет в результате действия перекиси водорода, которая образуется при окислении органических соединений и концентрируется в чехлах, поступающее туда железо при участии фермента каталазы окисляется и откладывается в виде гидроксида. Подобной функцией обладают и некоторые слизистые цианобактерии.

Нитчатые бактерии обитают в воде. Их можно культивировать на средах с органическим веществом. По-видимому, они хемоорганогетеротрофы. Одни нитчатые бактерии *{Leptothrix ochraceae)* свободно плавают в воде, не прикрепляясь к субстрату, другие прикрепляются к какому-либо твердому предмету в воде. Размножаются нитчатые формы поперечным делением с образованием специализированных подвижных клеток.

Одноклеточные бактерии могут окислять железо в почвах (или других средах) с нейтральной реакцией среды при наличии закисного железа и органических веществ. К таким микроорганизмам относят коринеформную бактерию *Arthrobacter siderocapsulatus* и стебельковую бактерию со спирально закрученными стебельками, образующую звездчатые комплексы клеток в виде розеток, — *Seliberia stellata.*

К хемоорганогетеротрофным бактериям, аккумулирующим железо в почвах, относят и **микоплазмы.** Это мелкие бактерии без клеточной стенки, обычно они ассоциированы с прокариотными или эукариотными микроорганизмами и обладают способностью к паразитизму. Микоплазмы полиморфны, они имеют кокковидные клетки, связанные тонкими нитями, на поверхности которых откладываются окислы железа. Указаннная группа микроорганизмов представлена родами *Gallionella, Siderococcus, Metallogenium.*

Типичный представитель рода *Gallionella — G. ferrugineae* — имеет вибриоидные клетки со жгутиками. Клетки расположены на длинном плоском, спирально перекрученном стебельке. Одна сторона клетки вогнутая, другая — выпуклая. Из последней выделяется наружу коллоидный гидроксид железа, из которого постепенно формируется стебелек.

При делении клетки стебелек дихотомически ветвится. Изучение стебельков под электронным микроскопом показало, что они способны к самостоятельному росту и на них возникают новые клеточные образования. В стебельках обнаружен белок. По-видимому, стебельки — живые образования, а не мертвые части железобактерий.

До последнего времени было не выяснено: эти бактерии — хемоорганогетеротрофы или хемолитоавтотрофы. У представителей рода *Gallionella,* однако, выявлена рибулозобифосфаткарбоксилаза, что свидетельствует о способности бактерий использовать энергию, освобождающуюся при окислении $Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+}$, т. е. их можно отнести к хемолитоавтотрофам.

К типичным **хемолитоавтотрофным железобактериям** относят облигатно ацидофильные организмы, способные получать энергию в результате окисления закисного железа и использовать углерод диоксида углерода.

Группу таких микроорганизмов представляют: тионовая бактерия — *Thiobacillusferrooxidans,* грамотрицательная бактерия с довольно сложным циклом развития (псевдококки — вибрионы-спириллы) — *Leptospirillum ferrooxidans* и архебактерия *Sulfolobus acidocaldarius.* Все перечисленные микроорганизмы развиваются в кислых средах (оптимум pH 2—3 и ниже). Они обитают в кислых рудничных водах, содержащих сульфиды разных металлов, в том числе пирит (FeS_2), а также в пиритизированных торфяниках, железистых источниках.

Реакцию окисления двухвалентного железа в трехвалентное при участии *Thiobacillusferrooxidans* можно записать так:

$$4Fe^{2+} + 4H^{+} + O_2 \longrightarrow 4Fe^{3+} + 2H_2O$$

Выявлены термофильные штаммы *Sulfolobus acidocaldarius,* которые наряду с соединениями серы окисляют двухвалентное железо.

Установлена способность к накоплению оксидов железа у некоторых фототрофов, в частности цианобактерий. Подобную же способность проявляют нитчатые зеленые бактерии и отдельные водоросли.

Хемолитоавтотрофные и ряд хемоорганогетеротрофных микроорганизмов, под влиянием которых происходит трансформация железа в природе, принимают участие в образовании железистых отложений. Последние обусловливают формирование осадочных железистых руд в болотах, озерах и других водоемах.

Многие железобактерии окисляют не только железо, но и марганец. Например, нитчатая бактерия *Leptothrix discophorus* обладает способностью окислять Mn^{2+} до Mn^{4+}. Выделен *Metallogenium symbioticum,* отнесенный к железоокисляющим микоплазмам, осуществляющий окисление марганца в строго аэробных условиях. В присутствии марганца указанный организм приобретает форму «паучка» с нитями, покрытыми окислами марганца и расходящимися из одного центра.

Восстановление окисленных соединений железа. В хорошо дренированных почвах и водоемах большая часть железа и марганца встречается в окисленном состоянии. При анаэробиозе наблюдаются восстановительные процессы в основном как результат активности хемоорганогетеротрофных бактерий родов *Bacillus, Clostridium* и др. Окисные соединения железа и марганца восстанавливают многие гетеротрофные аэробные организмы, резко смещающие окислительно-восстановительный потенциал среды.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие группы микроорганизмов существуют за счет энергии, выделяющейся при окислении неорганических соединений серы? 2. Кратко охарактеризуйте основные направления трансформации соединений серы в почве. 3. В каких формах фосфор может находиться в почве? 4. Какие виды бактерий участвуют в трансформации соединений железа в почве? 5. Приведите примеры химических реакций, осуществляемых микроорганизмами рассматриваемых групп.

Раздел 2

Сельскохозяйственная микробиология

Микроорганизмы почвы и их сообщества

Мир почвенных микроорганизмов весьма разнообразен, однако в курсе микробиологии в основном рассматривают бактерии, в том числе актиномицеты, микроскопические грибы и близкие к ним организмы. Прочие группы обычно изучают в других курсах.

13.1. Методы определения численности, состава и активности почвенных микроорганизмов

Прямые методы определения численности микроорганизмов. При определении состава и активности почвенных микроорганизмов прежде всего встает вопрос об общем количественном анализе микроорганизмов почвы. Наиболее объективный метод такого анализа — прямое микросконирование почвы по С.Н.Виноградскому. В соответствии с предложенной ученым методикой готовят почвенную суспензию и под микроскопом в определенном ее объеме подсчитывают общее число микроорганизмов. При подготовке почвенной суспензии целесообразно использовать один из рекомендуемых способов диспергирования почвы и десорбции микроорганизмов из почвенных частиц: растирание почвы, обработка поверхностно-активными веществами, ультразвукам и т. д. Далее пересчетом устанавливают, сколько микроорганизмов приходится на 1 г исследуемой почвы.

По Виноградскому, препараты готовят на предметном стекле и просматривают под оптическим микроскопом. В поле зрения можно видеть палочковидные бактерии, мелкие и крупные кокки, обрывки мицелия грибов и актиномицетов и другие микроорганизмы. Определение числа бактериальных клеток прямым микроскопированием облегчается при использовании люминесцентного микроскопа и красителей. При этом микроорганизмы лучше видны среди мелких частиц почвы. Красителями могут служить акридиновый оранжевый, изотиоционат и др.

При окрашивании акридиновым оранжевым красный тон приобретают мертвые клетки, зеленый — живые. Для окраски мицелия и установления его длины при прямом микроскопировании пользуются диацетатом флуоресцеина. Иногда прямую микроскопию применяют для микробиологического анализа срезов почвы, помещенных в метилметакрилат, фильтратов почвенных суспензий (на фильтрах Зейца), окрашенных метиленовым синим или другими красителями.

Б. В. Перфильев и *Д. Р. Габе* для подсчета микроорганизмов в почве рекомендовали пользоваться сконструированной ими капиллярной камерой, глубина которой не превышает 30—40 мкм, а ширина — не более диаметра поля зрения микроскопа. Подсчитав число микроорганизмов в капилляре, можно также сделать пересчет на 1 г почвы.

Для прямого подсчета микроорганизмов почвы используют электронный микроскоп, при помощи которого наряду с обычными видами можно обнаружить множество мельчайших форм микроскопических существ. Для прямого анализа микрофлоры почвы применяют и сканирующий электронный микроскоп, дающий объемное изображение анализируемых объектов (рис. 54).

Прямые методы дают представление об общей численности микроорганизмов в почве. Однако внешний облик микроорганизмов, как правило, не позволяет судить об их видовой принадлежности и функциях. Определить принадлежность микроскопических существ, обнаруженных в почве, к разным систематическим и физиологическим группам можно при помощи разнообразных приемов.

Косвенные методы определения численности микроорганизмов. Так, состав отдельных групп[1] микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, грибы и т. д.) может быть уточнен посевом почвен-

[1] Здесь и далее понятие «группы микроорганизмов» имеет, как правило, не таксономический, а скорее, морфо-физиологический и функциональный — экологический смысл. Анализ подобных групп традиционно использовался в почвенной микробиологии, и именно в таком виде результаты исследований были представлены в большинстве цитированных работ. Поэтому несколько условное понятие «групп» в учебнике сохранено, содержание же термина ясно из текста.

Студентам же, наверное, полезно задуматься, сколько раз за последние десятилетия менялись объем и содержание ключевых терминов в микробиологии. Например, «бактерии» — палочковидные микроорганизмы, палочковидные неспорообразующие микроорганизмы (в отличие от бацилл); преимущественно одноклеточные формы (в отличие от мицеальных — актиномицетов); прокариоты (за исключением прокариотических сйнезеленых водорослей, впоследствии цианобактерий); все прокариоты (включая цианобактерии); наконец, снова лишь группа прокариот (поскольку к другой группе, или домену, теперь относят археи, или архебактерии). *(Прим. ред.)*

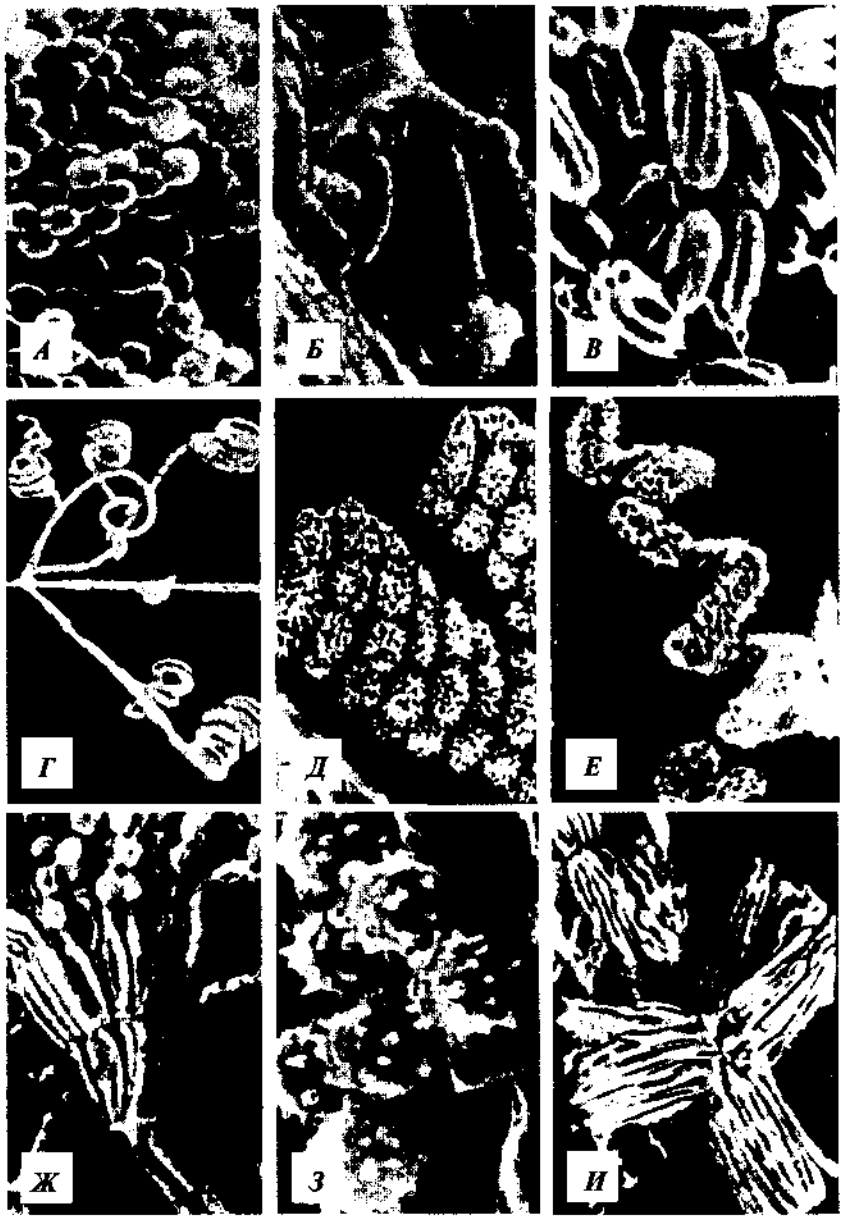


Рис. 54. Почвенные микроорганизмы под сканирующим электронным микроскопом: *А* — неспорообразующие бактерии; *Б* — спорообразующая бактерия; *В* — споры бациллы; *Г— Streptomyces sp:, Д, Е* — спороносцы стрептомицетов; *Ж* — конидиеносец *Penicillium; З* — конидии *Penicillium; И* — конидиеносец *Aspergillus* (по: В. С. Гузев и др.)

ной суспензии на различные твердые питательные среды, где затем развиваются колонии микроорганизмов тех или иных групп. В практике обычно используют агаризованные или желатинизированные, а иногда силикагелевые питательные среды.

После инкубации засеянных чашек в термостате подсчитывают выросшие на твердой питательной среде колонии. Допуская, что каждая колония произошла из одного зародыша того или иного микроорганизма, устанавливают число клеток в исходном образце почвы.

Подобный пересчет имеет ряд условностей. Например, бактериальные колонии могут вырасти на питательной среде не из одной клетки, а из группы клеток, оставшихся не разделенными в почвенной взвеси. Колонии грибов и актиномицетов вырастают как из обрывков мицелия разной величины, так и из спор. Дифференцировать колонии, образованные из спор или мицелия указанных микроорганизмов, невозможно. Поэтому правильнее богатство почв мицелиальными микроорганизмами учитывать, измеряя длину их мицелия при прямом микроскопировании.

Представляют значительный интерес примерные соотношения числа микроорганизмов, подсчитываемых в одной и той же почве различными методами. В таблице 3 приведены соответствующие данные Д. И. Никитина для дерново-подзолистых почв Подмосковья.

Таблица 3

Соотношение показателей численности микроорганизмов, определенных разными методами в дерново-подзолистых почвах

Метод	Число микроорганизмов в 1 г почвы	Соотношение показателей, полученных разными методами
Посев на твердые питательные среды	$1–3.10^6$	1[1]
Прямой подсчет под оптическим микроскопом	$5–20.10^8$	150-1500
То же под электронным микроскопом	$20-25.10^9$	До 15 000

[1]Принято за единицу.

Как видно, прямая микроскопия дает показатели, во много раз превосходящие те, что получены методом посева. Указанное явление объясняется прежде всего тем, что при прямом анализе под-

считывают живые и мертвые клетки. Число последних может быть велико, так как индивидуальная жизнь микроорганизмов очень коротка. Однако численность мертвых клеток в почве обычно не превышает 25% общего числа.

Общие показатели численности микроорганизмов, как бы условны они ни были, представляют интерес. На их основании можно примерно вычислить массу совокупности микроорганизмов в почве. Как показывают подсчеты, эта масса составляет десятые доли процента массы почвы. При последовательном сравнении почв, начиная от более северных и кончая южными, можно отметить постепенное увеличение в них доли микробной массы.

Определение микробной биомассы. В последнее время для установления микробной массы почвы применяют косвенный метод, рекомендованный Д.Дженкинсоном. Почву обрабатывают летучим антисептическим веществом, убивающим микроорганизмы. После дефумигации почвы определяют количество выделяемого диоксида углерода, который в основном образуется из отмерших клеток. Затем расчетным путем примерно устанавливают массу органического вещества микроорганизмов.

Предложены и другие косвенные методы определения в почве массы отдельных групп микроорганизмов — для бактерий по специфичной для прокариот мурамовой кислоте, для грибов — по хитину, входящему в состав их клеток, для водорослей — по количеству хлорофилла и т. д. Почвенную биомассу примерно измеряют и по компонентам микробной клетки — АТФ и ДНК и более точно биохимическим методом — по содержанию аденозина и аденина при помощи флуориметрии.

Применяется оригинальный «регидрационный метод»: почву подсушивают при температуре не выше 70 °С, что нарушает барьер проницаемости микробных клеток, и в водную или солевую вытяжку переходит часть внутренних компонентов клетки. Концентрация таких компонентов может быть измерена и с использованием определенного коэффициента установлена биомасса микроорганизмов в почве.

В связи с тем, что при микроскопическом исследовании почв отдельные показатели условны, надежнее использовать одновременно несколько методов. По обобщенным данным Д. Г. Звягинцева, сырая масса бактерий в пахотном слое различных почв колеблется от 0,5 до 15 т/га, микроскопических грибов — от 5 до 20 т/га.

Учет численности отдельных физиологических групп. При анализе почв нередко учитывают число отдельных физиологических групп микроорганизмов. Это делают так называемым методом титра, при котором твердые или жидкие избирательные (элективные) питательные среды для определенных групп микроорганизмов засевают разными разведениями почвенной суспензии. После выдерживания в термостате отмечают ту степень разведения, в которой есть искомая группа микроорганизмов, и простым пересчетом определяют численность представителей данной группы в почве. Так узнают, насколько богата почва нитрификаторами, денитрификаторами, целлюлозоразлагающими и другими микроорганизмами.

Метод титра используют при учете почвенных водорослей и простейших. Для водорослей берут минеральные среды, которые после засева рядом разведений почвенной суспензии выдерживают при искусственном освещении. При учете простейших также методом разведений почвенной суспензии инфицируют среды, содержащие микроорганизмы, которыми простейшие могут питаться.

Для характеристики типа почвы и ее состояния важны не только показатели численности разных групп микроорганизмов, но и анализ состояния в почве представителей отдельных родов и видов. За редким исключением, физиологические группы микроорганизмов очень разнообразны. Внешняя обстановка может резко менять их видовой состав, но почти не отражается на числе физиологических групп. Поэтому при анализе почвы важно установить состояние отдельных видов микроорганизмов.

Диагностика до вида даже обычных сапротрофов почвы невозможна. Поэтому сейчас исследователи стремятся выявить микроорганизмы, характерные для определенных почв. Список подобных *индикаторных микроорганизмов* пока невелик, но будет возрастать по мере развития почвенной микробиологии. Уже сейчас определение индикаторных микроорганизмов помогает установить тип почвы, ее окультуренность и предсказать характер воздействия на почву агротехнических и агрохимических приемов.

Наблюдение за микроорганизмами в природе. Приведенные методы анализа позволяют определить численность микроорганизмов или отдельных их групп в почве, но не выявляют их состояния (распределения, взаимосвязей и т. д.). Для выяснения данного вопроса существует ряд подходов. Так, в XX в. *Н. Г. Холодный* рекомендовал изучать микробные пейзажи почвы при помощи «стекол обрастания». В соответствии с данным методом в почву закладывают предметные стекла и оставляют на определенный срок. Поверхность стекол обрастает микрофлорой, характерной для данной почвы. Последующий микроскопический анализ стекол позволяет получить представление как о составе, так и о взаимоотношениях микроорганизмов в почве.

Новые возможности в области изучения микробных пейзажей почвы открыл капиллярный метод Б.В.Перфильева и Д. Р. Габе. Для изучения группового состава микроорганизмов почв ими сконструирован капиллярный прибор — *педоскоп,* который может быть использован и для работы с грунтами. Педоскоп представляет собой набор капиллярных ячеек с пятью-шестью прямоугольными каналами. Ячейки закладывают в пазы широкого стек-

лянного держателя (рис. 55) и заполняют полужидкой агаризованной средой, содержащей в качестве органического субстрата гумусовые вещества (фульвокислоты), что создает для микроорганизмов условия, близкие к почвенным. Педоскоп выдерживают в почве полтора-два месяца, затем просматривают под микроскопом. Описанный метод позволяет выявить характерные для почвы микробные ассоциации.

Оценка биологической активности почв. При анализе почв устанавливают не только состав их микронаселения, но и суммарную биохимическую активность. Одним из показателей такой активности служит нитрификационная способность почвы, характеризующая мобилизуемость азотного запаса почвы в результате деятельности микроорганизмов.

Нитрификационную способность устанавливают по нарастанию в почве количества нитратов после выдерживания при определенных условиях в термостате. По результатам такого анализа можно судить о потенциальной способности почвы накапливать то или иное количество минерального азота. Если в начале опыта в почву внести соль аммония, то по накоплению нитратов можно получить дополнительное представление об активности нитрифицирующих бактерий.

При изучении почвенной биодинамики определяют интенсивность «дыхания» почвы по выделению почвой CO_2. Данная проба отражает в основном интенсивность разложения в почве органических соединений.

Можно установить быстроту распада в почве любого химического вещества путем учета продуктов распада или убыли внесенного в почву соединения. Для этого используют метод «аппликаций», при котором в почву помещают полосы бумаги или лучше

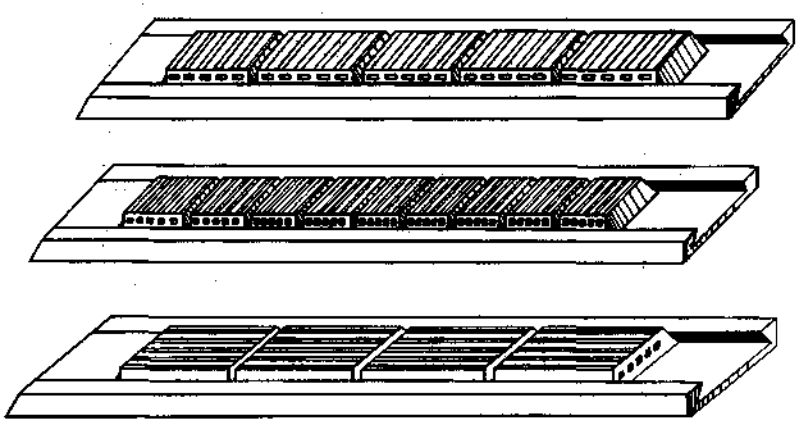


Рис. 55. Педоскоп с различными типами капиллярных ячеек (по: Б. В. Перфильев и Д. Р. Габе)

льняной ткани, закрепленной на стекле. Периодически материал извлекают из почвы, просматривают и фиксируют на нем зоны распада (рис. 56).

Аппликационный метод весьма показателен при решении некоторых агрономических задач. Например, он помогает выявить интенсивность процессов в разных горизонтах пахотного слоя, установить действие различных удобрений, мелиорирующих средств и т. д.

Для оценки биологической активности почвы исследуют также ферменты, находящиеся в почве. В основном их продуцируют микроорганизмы, поэтому между показателями активности ферментов почвы и определенными микробиологическими процессами намечается коррелятивная зависимость.

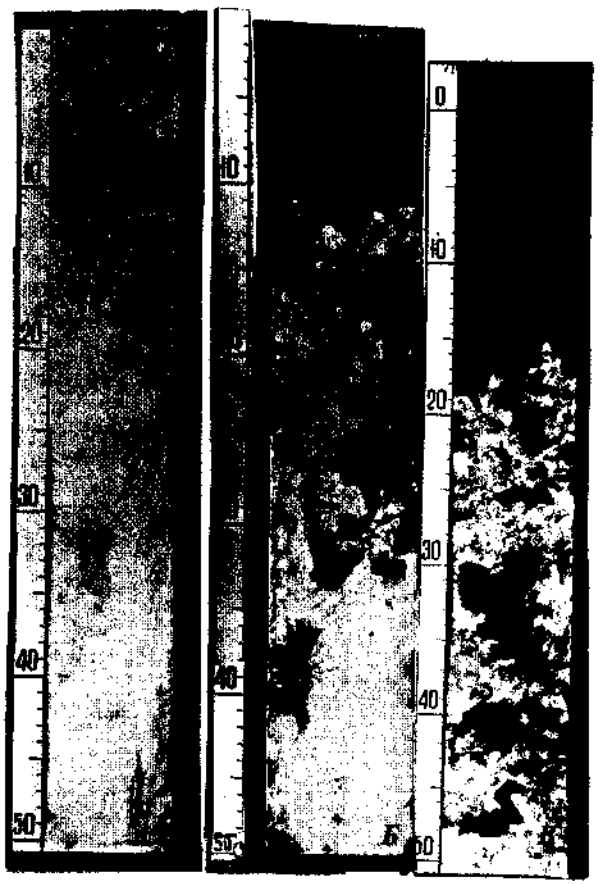


Рис. 56. Распад льняной ткани под действием микроорганизмов в черноземе: *А, Б, В* — в течение одного, двух и трех месяцев соответственно

Подобная связь отмечена, например, между активностью инвертазы и интенсивностью дыхания почвы, активностью оксидазы и динамикой нитратов. Абсолютные значения отдельных показателей активности ферментов различаются для почв разных климатических зон, что может быть использовано в диагностических целях.

При отмирании микроорганизмов окружающая среда еще более обогащается ферментами, которые в значительной части адсорбируются почвенными коллоидами, что способствует стабилизации последних. Отмечено, что ферментные процессы в почве прекращаются при значительно более низкой влажности, чем деятельность микроорганизмов. Следовательно, биохимические процессы могут протекать даже в относительно сухих почвах. Определение активности ферментов почвы может дать представление об их плодородии.

В зависимости от теоретических или практических задач почвенные микробиологи пользуются различными комплексами методов анализа почвы.

13.2. Структура микробных сообществ почв разных типов

Долгое время микроорганизмы вообще и почвенные в частности рассматривали как космополиты, более или менее однородно распределенные по поверхности земного шара. Предполагалось, что почвы различаются лишь по численности, но не по составу их микронаселения.

Детальное изучение специфики микрофлоры почвенных типов началось в нашей стране в сороковых годах прошлого столетия. Сейчас работу по изучению микробных ценозов различных почв проводят во многих научно-исследовательских учреждениях нашей страны.

Численный состав микроскопических существ почв отличается большой динамичностью. Даже за относительно короткие промежутки времени число микроорганизмов в почве может значительно меняться. Это следствие динамики температуры и влажности почвы, состояния растительного покрова и т. д. (рис. 57). Почти во всех почвах наблюдается большая или меньшая активизация деятельности микроорганизмов весной. Очевидно, это связано с обогащением почв отмершей за осенне-зимний период растительностью и достаточным увлажнением.

Кроме сезонных изменений, в численности почвенной микрофлоры отмечаются и кратковременные флуктуации. О причине последних существуют разные предположения. Некоторые исследователи допускают, что число бактерий может резко снижаться вследствие уничтожения их фагами или простейшими. Предполагают также накопление каких-то токсичных веществ в почве (этилена,

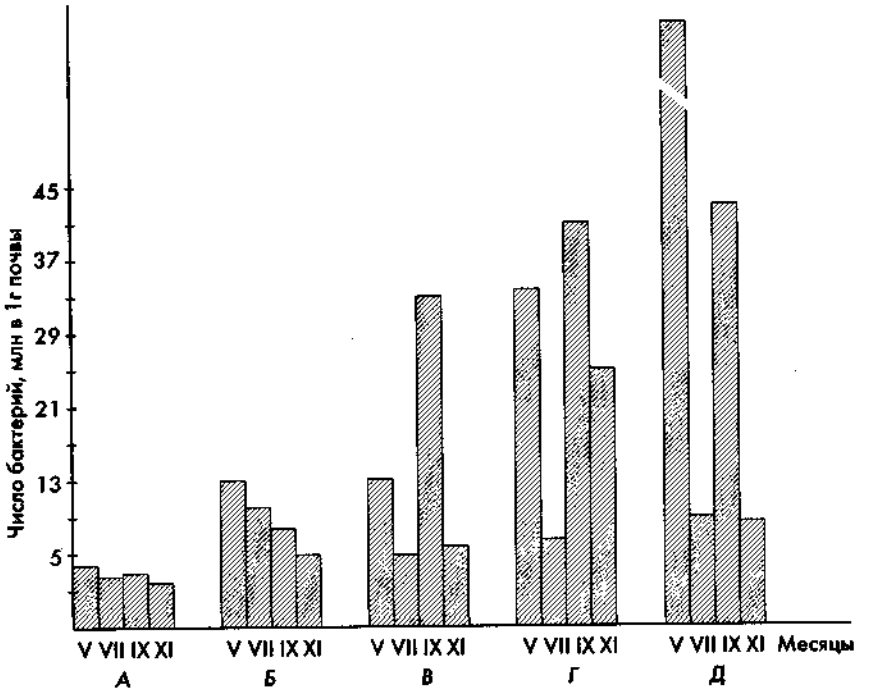


Рис. 57. Динамика численности сапротрофных бактерий в поверхностном горизонте почв: *А* — в северном подзоле; *Б* — в дерново-подзолистой; *В* — в серой лесной; Г — в черноземе; *Д* — в каштановой

окиси этилена и др.), временно подавляющих развитие определенных групп микроорганизмов.

Однако скорее всего флуктуации определяются неравномерным распределением микроорганизмов в почве. В связи с этим каждая взятая проба отличается по составу микробов от другой, что создает впечатление существенной динамики численности. Колебания численности микробов не снимают вопроса о неодинаковой плотности заселения микроорганизмами почв различных типов. Несмотря на колебания, легко заметить, что в одних почвах микробов больше, в других меньше. Если ориентироваться на средние цифры, то можно составить представление о богатстве тех или иных почв микроорганизмами.

Микробиологические анализы дают условные показатели, но при пользовании одной и той же методикой для изучения разных почв получают вполне сопоставимые результаты. Все применяющиеся методы (прямое микроскопирование и посев на разные питательные среды) еще раз свидетельствуют о большем богатстве микробами южных почв по сравнению с северными.

По мере перехода от более холодного северного климата к южному микронаселение почв возрастает; во многих южных почвах и микробиологические процессы протекают более энергично.

Сапротрофная группировка микроорганизмов. Наиболее изучена **сапротрофная,** или **зимогенная** (от греч. *myme* — закваска), группировка микроорганизмов у различных почв, т. е. микроорганизмы, разлагающие в основном легко доступные органические соединения. Обычно сапротрофов учитывают методом посева на твердые, а иногда и в жидкие питательные среды, содержащие те или иные органические вещества. Наиболее часто используют мясо-пептонный агар и крахмало-аммиачный агар, на которых хорошо выявляются бактерии и, в частности, актиномицеты. Для учета микроскопических грибов чаще используют подкисленный сусло-агар, среду Чапека и т. д.

В таблице 4 приведены усредненные данные о численности и соотношение основных групп сапротрофных микроорганизмов в верхних слоях различных почв (горизонт А целинных почв и пахотный слой окультуренных).

Данные таблицы не только подтверждают положение о большем богатстве почв южной зоны микроорганизмами, но и позволяют вскрыть закономерность, которая не выявляется прямым микроскопированием. Оказалось, что в почвах северной зоны спорообразующих бактерий и актиномицетов значительно меньше, чем в южных. Это объясняется тем, что бациллы и актиномицеты размножаются на более поздних этапах разложения растительных остатков. Кроме того, северные почвы имеют кислую реакцию, которую плохо переносят актиномицеты. В южных почвах по сравнению с северными относительное число грибов уменьшается при одновременном росте их видового разнообразия. Окультуренные почвы всех зон обычно богаче микроорганизмами, чем целинные. Вертикальная поясность влияет на состав почвенной микрофлоры так же, как и широтная зональность.

Отдельные почвы существенно различаются по глубине микробиологического профиля. С углублением в почву количество микроорганизмов постепенно уменьшается и меняется их состав. Снижение численности клеток с глубиной до известной степени связано с уменьшением количества гумуса в нижележащих слоях почвы, но прямая корреляция отсутствует. Обычно с увеличением глубины численность микроорганизмов снижается более резко, чем уменьшается содержание гумуса. В гумусных и нейтральных почвах микробиологический профиль, как правило, все же более глубокий. По мере углубления в почву значительно меняется и характер микрофлоры. В более глубоких слоях относительно больше бацилл

Таблица 4

Численность и соотношение отдельных групп микроорганизмов в почвах разных типов (учет методом посева)

Зоны	Почвы	Состояние почв	Общее число микроорганизмов, тыс. на 1 г почвы	Бактерии	Споры (из числа бактерий)	Актиномицеты	Грибы
				%			
Тундра и тайга	Тундрово-глеевые и глеево-подзолистые	Целинные	2140	95,6	0,7	1,4	3,0
		Окультуренные	4870	98,0	0,6	1,6	0,4
Лесо-луговая	Подзолы и дерново-подзолистые	Целинные	1080	89,3	12,0	8,1	2,6
		Окультуренные	2620	70,7	14,9	28,2	1,1
Луговая степь и степь	Черноземы	Целинные	3630	63,8	21,4	35,4	0,8
		Окультуренные	4530	64,4	24,5	35,1	0,5
Сухая степь	Каштановые	Целинные	3480	64,8	19,3	34,7	0,5
		Окультуренные	6660	67,6	23,0	32,0	0,4
Пустынная степь и пустыня	Бурые и сероземы	Целинные	4490	63,4	17,7	36,1	0,5
		Окультуренные	7380	66,1	19,8	33,6	0,3

Примечания: 1. Общее число микроорганизмов вычислено как сумма бактерий, актиномицетов и грибов. Количество бацилл включено в общее число бактерий. 2. Большая обсемененность микроорганизмами почв тундры и тайги по сравнению с почвами лесо-луговой зоны объясняется, очевидно, тем, что северные почвы анализировали только летом, когда число микроорганизмов в почве максимально. Данные для других почв получены в результате многократных анализов.

и часто актиномицетов. Это особенно заметно в черноземах и сероземах.

Как видно из приведенных данных, в составе зимогенной микрофлоры богато представлены бактерии, особенно неспорообразующие формы. Однако количество их в разных почвах неодинаково. Так, можно считать доказанным, что гнилостные бактерии *Pseudomonas fluorescens,* являющиеся пионерами освоения органических растительных остатков, более богато представлены в почвах севера, где медленно идет минерализация. В почвах юга они обнаруживаются в значительном числе лишь в течение краткого времени после внесения растительных остатков.

Представители рода *Arthrobacter,* по ряду признаков родственные актиномицетам, в большем числе встречаются в почвах южной зоны (табл. 5). Они характерны для более поздних стадий распада органического вещества и предпочитают нейтральную среду. В почвах севера очень часто присутствует значительное количество коринебактерий.

Таблица 5

Изменение соотношения Pseudomonas fluorescens и *Arthrobacter* в различных почвах, % колоний, учтенных на питательной среде

Зона	Почва	Pseudomonas	*Arthrobacter*
Тундра	Тундровый подзол	До 80	0-5
Лесо-луговая	Подзол и дерново-подзолистая	До 20	0-5
Сухая степь	Чернозем	До 15	До 10
Пустынная степь	Серозем	До 8	50-60

Из неспорообразующих азотфиксирующих бактерий виды рода *Beijerinkia* распространены только в кислых субтропических почвах (латеритах и желтоземах). Представители рода *Enterobacter* в большом количестве встречаются в лесных почвах средней полосы, а рода *Spirillum* — в южной зоне.

Основательнее изучены группировки спорообразующих бактерий, развитие которых связано с присутствием в почве более переработанного органического вещества. Каждому типу почв свойствен характерный набор преобладающих видов бацилл. Другие виды здесь могут быть, но в очень малом количестве.

В почвах с энергичными мобилизационными процессами преобладают бациллы, использующие не только азот органический, но и минеральный азот *(Bacillus megaterium, B. mesentericus, B. subtilis).* Наоборот, в почвах со слабо протекающими процессами минерализации органических веществ доминируют спорообразующие бактерии, для которых необходим органический азот *(B. cereus, B. mycoides* и др.). В этом проявляется глубокая связь физиологии микроорганизмов со свойствами среды их обитания (табл. 6).

Таблица 6

Доминирующие виды рода *Bacillus* в разных почвах

Зоны	Почвы	*B. agglomeratus, B. asterosporus*	*B. mycoides*	*B. cereus*	*B. virgulus*	*B. idosus*	*B. megaterium*	*B. mesentericus, B. subtilis*	*B. adherens*	*B. gasificans*	*B. brevis*	*B. solanyperda*
Тундра	Тундрово-глеевая	+										
Тайга	Глеево-подзолистая	+		+	+							
Лесо-луговая	Подзол	+	+	+	+							
	Дерново-подзолистая	+	+	+								
Луговая степь и степь	Чернозем			+		+	+			+		
Сухая степь	Каштановая					+	+	+		+	+	+
Пустынная степь	Бурозем и серозем					+	+	+		+	+	+
Полупустыня	Солонцы					+	+	+	+	+	+	+

В. Т. Емцевым детально изучена экология спорообразующих азотфиксирующих бактерий рода *Clostridium.* Некоторые из них, например *C. pasteurianum,* в больших количествах встречаются толь-

ко в северных почвах. В почвах южной зоны доминируют *C. acetobutylicum*. При окультуривании почвы состав почвенной микрофлоры, в том числе бацилл и клостридий, существенно меняется, появляются спорообразующие виды, свойственные более южной зоне.

Иногда с органическими удобрениями (навоз или компост) в почву вносят специфичные для этих удобрений бациллы. Так, в разогревающемся при созревании навозе содержится много клеток *Bacillis mesentericus, B. subtilis* и термофильных бактерий.

С вертикальной поясностью почв связана в основном такая же смена бациллярных и клостридиальных форм, как и при зональном распределении. Однако почвы вертикальной поясности нельзя считать полными аналогами горизонтально-зональных, поэтому и в составе их микроорганизмов имеются некоторые различия.

Грибы. Северные почвы, имеющие кислую реакцию, наиболее богаты грибами. Вообще в разлагающейся растительной массе и в верхних слоях почвы их биомасса значительно больше бактериальной. Учет массы грибного мицелия в разных почвах, проведенный *Т. Г. Мирчинк,* показал, что в тундре на 1 г почвы приходится 4 мг мицелия грибов, в лиственных лесах — до 1 мг, а в почвах южной зоны — 0,4—0,7 мг.

В почвах южной зоны родовой и видовой состав микроскопических грибов более разнообразен, чем в северных. В первых доминируют представители рода *Aspergillus,* а во вторых — *Penicillium*. По имеющимся данным, род *Penicillium* в северных почвах представлен 35—40 видами, а в южных — лишь 10—15. Обратная картина наблюдается для грибов рода *Aspergillus:* в северных почвах в небольшом числе встречаются три—пять видов рода, в южных — 15—20.

Северные почвы беднее, чем южные, грибами рода *Fusarium,* которые особенно обильно размножаются в каштановых почвах и сероземах. Некоторые виды, например *Fusarium sambicinum,* свойственны только щелочным почвам. Мукоровыми грибами богаты почвы северных районов, однако некоторые роды *{Choanephora, Cunninghamella, Rhizopus)* приурочены к южным почвам.

В почвах обычно встречаются грибы с темнопигментированным мицелием *(Dematium, Cladosporium, Macrosporium, Alternaria* и т.д.). Их экология плохо изучена, но отмечается, что представители рода *Dematium* более распространены в почвах с малоактивными мобилизационными процессами, т. е. в основном в северной зоне, а виды рода *Alternaria* чаще встречаются в окультуренных почвах.

Выявлено, что одни виды рода *Mortierella (M. vanaceae, M. usabellina)* распространены в кислых почвах, другие *(M. alpina, M. dichotoma)* — в нейтральных. Установлены индикаторные микроскопические грибы для определенных типов почв.

По данным *И. П. Бабьевой,* в тундре при большой пестроте почвенного покрова основная часть **дрожжей** сосредоточена на мхах и торфе. Доминантные виды дрожжей в тундровых почвах не относятся к типичным педобионтам и более характерны для живых и отмирающих частей растений. Они представлены базидиомицетами (роды *Rhodotorula, Rhodosporidium, Cryptococcus).*

В лесных биогеоценозах много дрожжей имеется в подстилке. Они составляют группу базидиальных грибов (виды родов *Candida, Trichosporon* и др.). В минеральных горизонтах почвы дрожжей значительно меньше. Здесь доминируют типичные педобионты — из аскоспоровых грибов *Lipomyces starkeyi,* из базидиомицетов — виды *Candida* и *Cryptococcus.*

В степном биогеоценозе травяной опад также богат дрожжами. Здесь встречается до 14 видов родов *Cryptococcus, Aureobasidium, Rhodosporidium* и др. Для почвы характерно доминирование *Lipomycestetrasporium.*

В биогеоценозах полупустынь и пустынь на растительности доминируют дрожжи родов *Sporodiobolus, Tilletiopsis* и *Sporobolomyces,* образующие баллистоспоры, рассеивающиеся токами воздуха и имеющие в жизненном цикле стадии, устойчивые к засухе, — хламидоспоры. Численность их видов невелика. Дрожжи в указанных регионах приурочены не к поверхностному слою почвы, а обитают на некоторой глубине — ниже 20 см. Род *Lipomyces* в почве пустынь отсутствует. Доминируют криптококки.

Актиномицеты. Группа актиномицетов бактерий актиномицетной линии чрезвычайно обширна. В последние годы в изучении экологии и географии этих микроорганизмов достигнуты большие успехи. Типичные формы, относящиеся к аэробам и образующие мицелий, широко распространены в почве. Подобно бациллам, стрептомицеты бедно представлены в северных почвах, но в южных их численность резко возрастает, что подтверждается всеми методами исследования.

Слабый рост актиномицетов в почвах северной зоны может быть объяснен как замедленным темпом разложения здесь органического вещества, так и слабой толерантностью организмов к почвенной кислотности. Имеющиеся сведения нередко противоречивы, но несомненно, что почвы южной зоны не только богаче актиномицетами, но и имеют более разнообразный их видовой состав.

Очевидно, некоторые актиномицеты распространены чрезвычайно широко (группы albus, griseus, globisporus, violaceus и аспорогенные формы albus). Однако группы violaceus и аспорогенные albus богаче представлены в южных почвах. Некоторые группы актиномицетов *(fradis, flavus, chromogenes, rubroaurantiacus)* в заметных количествах обнаружены в серых лесных почвах. К югу их численность

также возрастает. Создается впечатление, что группа *verticillatus* и аспорогенные формы *flavus* и *chromogenes* также тяготеют к наиболее южным почвам.

Смена состава актиномицетов в разных почвах хорошо выявляется на примере пигментированных культур. Они гораздо больше распространены в почвах, формирующихся в условиях теплого климата. Установлено, что и виды рода *Actinomadura* широко распространены повсеместно, но их видовое разнообразие значительно богаче в южных почвах.

Целлюлозоразрушающие микроорганизмы. Процесс распада целлюлозы, вызываемый как бактериями, так и грибами, представляет существенный интерес для познания почвообразования. Большая часть растительных остатков состоит из целлюлозы. Изучение микроорганизмов, разрушающих ее, показало, что их состав существенно меняется в разных почвах. В северных почвах (тундра) этот процесс связан с деятельностью некоторых медленно растущих грибов, относящихся главным образом к родам *Dematium* и *Penicillium*. В зоне тайги в составе данной группы появляются микобактерии и виды рода *Cellvibrio*. В южных почвах грибы в значительной степени вытесняются как уже указанными видами бактерий, так и представителями родов *Cytophaga* и др. В заметных количествах здесь появляются грибы рода *Chaetomium*. Биоценоз описанного состава в отличие от северного разрушает целлюлозу быстро.

Изучение особенностей физиологии разных групп целлюлозоразлагающих микроорганизмов позволило объяснить их своеобразную экологию. Особенности выражаются главным образом в требовательности к источникам азотного питания. Микроорганизмы северных почв (в основном грибы), хотя и медленно, растут и на бедных азотными соединениями средах. Микроорганизмы южных почв, разрушающие целлюлозу, нуждаются в высоком уровне азотного питания. На юге процесс минерализации азота протекает значительно энергичнее, что благоприятствует развитию микроорганизмов, более требовательных к условиям среды.

Автохтонная микрофлора. Автохтонные (от лат. *autochthonous* — коренная, местная) микроорганизмы почвы разлагают гумусовые соединения. Гумус представляет собой комплекс разных по сложности соединений, весьма стойких к воздействию микроорганизмов. Отдельные составляющие гумуса существуют в почве многие сотни лет. Другие фракции гумуса, например фульвокислоты, разлагаются относительно легко. Поэтому при недостаточном поступлении в почву растительных остатков содержание гумуса в ней существенно снижается, в основном за счет фульвокислот.

Среди микроорганизмов, способных достаточно энергично минерализировать гумусовые соединения почвы, характерны представители рода *Nocardia,* называемые иногда проактиномицетами. Род включает довольно много видов, различающихся по морфологическим и физиологическим признакам. Гумусовые соединения разрушаются с помощью проактиномицетов, образующие окрашенные в красной цвет колонии (*N. rubra, N. corallina* и др.), бесцветные и желтоокрашенные формы проактиномицетов такой спобностью не обладают.

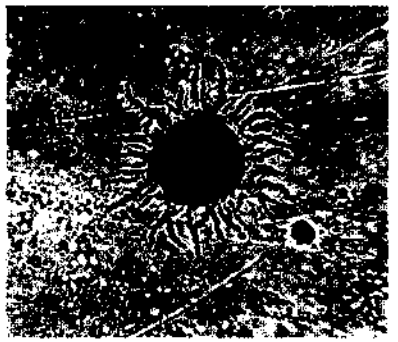


Рис. 58. Колонии микроорганизмов рода *Nocardia* на почвенном агаре (по: Е. 3. Теппер)

Долгое время нокардий в почве не обнаруживали. Это объясняется тем, что на обычных питательных средах колонии указанных микроорганизмов по внешнему виду неотличимы от колоний большинства сапротрофных бактерий. *Е. 3. Теппер* предложила использовать агаризованную среду с почвенной вытяжкой, на которой бактерии рода *Nocardia* образуют колонии с мицелиальной периферией, что позволяет легко их диагносцировать (рис. 58).

Разрушающие гумус проактиномицеты способны усваивать и простые органические соединения (аминокислоты, сахара, органические кислоты и т. д.). Исходя из этого, автохтонную группировку микроорганизмов следует воспринимать как подгруппу сапротрофов, обладающую более мощным ферментативным аппаратом и способную разлагать сложные цикличные соединения. Наблюдения показывают, что чем энергичнее в почвах идут мобилизационные процессы, тем выше численность микроорганизмов рода *Nocardia.*

К процессу разложения гумуса причастны бактерии родов *Pseudomonas, Arthrobacter, Mycobacterium, Micromonospora, Clostridium* и т. д., а также грибы (виды *Penicillium, Aspergillus* и т. д.). Доказано, что чистые культуры микроорганизмов менее активно разлагают гумус, чем смешанные.

Микроорганизмы, трансформирующие гумусовые соединения, играют существенную роль в формировании почвенного профиля. Так, накопление соединений железа и алюминия в определенных горизонтах подзолистых почв связано с разрушением микроорганизмами перегнойных комплексов. *Т. В. Аристовская* установила отложение железа в культурах бактерий *Pedomicrobium, Seliberia* и других на средах с железогумусовыми комплексами. Последнее свидетельствует об использовании данными бактериями гумусовой части как источника органических веществ. Освободившиеся гидроксиды железа и алюминия вступают в реакции с фульвокислотами и

способствуют их выпадению из раствора и закреплению в аллювиальном горизонте почвы.

При избыточном увлажнении в глубине почвы создаются анаэробные условия, бактерии восстанавливают окисное железо. В результате образуются оглеенные горизонты.

Олиготрофные микроорганизмы. Олиготрофы составляют большую группу почвенного микронаселения. Многие представители группы не растут на обычных питательных средах, так как не выносят высокой концентрации органических веществ и предпочитают ассимилировать питательные вещества из растворов с низкой концентрацией как азотсодержащих (олигонитрофилы), так и органических углеродсодержащих (олигокарбофилы) соединений.

Олиготрофы завершают минерализацию органических соединений, т. е. представляют собой группировку, метаболически связанную с типичными представителями зимогенной микрофлоры. Олиготрофы относят к группировке, названной *Г. А. Заварзиным* «микрофлора рассеяния». Эта группировка очень разнообразна. В нее входят многие типичные сапротрофы, способные развиваться на бедных субстратах, а также ряд весьма специфичных видов (см. ниже). Олиготрофы могут быть учтены посевом почвенных суспензий на бедные питательные среды.

Убедиться в существовании значительной группы олиготрофов, особенно в почве, удобряемой органическими веществами, можно на основании многолетнего опыта, проведенного в МСХА. В почве, длительное время (более 50 лет) находившейся под паром, встречается очень мало олиготрофов. В почве, занятой бессменной рожью, т. е. ежегодно обогащаемой пожнивными остатками, численность как зимогенной, так и олиготрофной группировки намного выше. В почве, обогащенной органикой, олиготрофы получали хороший запас питательных веществ после разрушения пожнивных остатков зимогенными микроорганизмами.

Установлено, что относительная численность олиготрофов в северных почвах намного ниже, чем в южных. Это может быть объяснено тем, что в холодном климате минерализация органических соединений проходит медленно. В условиях юга при достаточном увлажнении жизнедеятельность микроорганизмов более энергична, органические остатки быстро разрушаются и олиготрофы размножаются более активно.

Значительная часть олиготрофных бактерий отличается необычными морфологией и циклом развития. Это весьма большой комплекс так называемых новых форм микроорганизмов, которые условно подразделяют на четыре группы.

Первая группа — **почкующиеся бактерии.** Это мелкие палочковидные микроорганизмы, обычно образующие протоплазменные гифы, на концах которых формируются почки. После созревания

последние отделяются и дают начало новому организму. Молодые почки подвижны.

К данной группе относят виды родов: *Hyphomicrobium* с неветвящимися гифами; *Pedomicrobium* с ветвящимися гифами; *Hyphomonas,* которым свойствен плеоморфизм; *Blastobacter,* у которых гифы не образуются, но формируются почки на клетке.

Вторая группа — **простекобактерии.** Имеют на клетке выросты *(простеки)* диаметром 0,3 мкм и менее. Эти выросты представляют собой часть клетки, включая клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану и цитоплазму.

К простекобактериям относят ряд родов: *Prosthecomicrobium* — палочковидные бактерии, размножающиеся делением, имеющие многочисленные заостренные выросты до 2 мкм в длину; *Ancalomicrobium* — близкие по морфологии к предыдущему, но с более длинными (свыше 2 мкм) пальцевидными выростами и размножающиеся почкованием; *Labrys* — бактерии с радиально-лучевым строением клеток, напоминающие двухлезвийный топор и размножающиеся почкованием; *Stella* — имеющие форму морской звезды с радиально-лучевой симметрией, размножаются делением. К простекобактериям относят и ряд других микроорганизмов.

Третья группа — **стебельковые бактерии.** Для них характерны вибриоидные или палочковидные клетки, образующие стебелек, который окружен общей оболочкой с клеткой. До формирования стебелька молодые клетки имеют жгутики. Стебелек служит для прикрепления к субстрату. В чистых культурах, где плотность популяций высока, многие клетки прикрепляются друг к другу, образуя розетки. Размножаются делением перетяжкой.

В группу стебельковых бактерий входят часто встречающиеся в почве виды родов *Caulobacter* и *Asticcacaulis.* У первых стебелек отходит от конца клетки; у вторых — прикреплен к ее боковой стороне.

Четвертая группа — **тороидальные,** или **кольчатые, бактерии.** Клетки их отличаются изогнутой формой, неподвижные, размножаются делением. К данной группе относят виды родов: *Microcyclus,* имеющие изогнутые клетки; *Renobacter* — с палочковидными клетками и *Spirosoma* — со спиралевидными клетками.

Систематическое положение некоторых представителей олиготрофных микроорганизмов пока трудно определить. Это, в частности, относится к роду *Seliberia* — бактериям с длинными палочковидными спирально изогнутыми клетками, часто соединенными в звездообразные комплексы — розетки. Размножаются виды указанного рода, образуя почки. Молодые клетки *Seliberia* подвижны.

Отдельные виды олиготрофов участвуют в разложении органических соединений на разных этапах, однако их экология и роль

в почвенных процессах еще недостаточно изучены. Ряд представителей олиготрофной группировки бактерий показан на рис. 59.

Хемолитоавтотрофные и **фотолитоавтотрофные микроорганизмы.** В почвах они представлены весьма разнообразно; вызывают окисление неорганических соединений, образующихся при микробной трансформации преимущественно органических веществ. Наиболее изучены **нитрифицирующие бактерии,** деятельность которых характеризует энергию мобилизационных процессов в почве. Еще в 20-х гг. XX в. было установлено, что по мере движения от севера к югу активность процесса нитрификации усиливается. Это результат усиления в условиях более теплого климата процессов распада органических остатков, при которых выделяется NH_3, служащий энергетическим и питательным субстратом для нитрификаторов. В условиях вертикальной зональности наблюдается аналогичное явление — по мере подъема в горы, где климат более суров, энергия нитрификационного процесса снижается.

Помимо хемолитоавтотрофных микроорганизмов, в почвах обитают фотолитоавтотрофные микроскопические существа, среди которых наиболее типичны **цианобактерии** и **эукариотические водоросли.** В условиях арктических пустынь и тундры, на поверхности и в глубине почвы развиваются преимущественно зеленые и желто-зеленые водоросли, много азотфиксирующих цианобактерий.

В подзолистых почвах преобладают одноклеточные (виды родов *Chlamydomonas, Coccomyxa, Chlorococcum, Chlorella)* и некоторые нитчатые зеленые водоросли. Им сопутствуют нитчатые желто-зеленые и некоторые диатомовые водоросли. Цианобактерии, особенно в хвойных лесах, играют небольшую роль.

При дерновом почвообразовательном процессе отмечается обильное разрастание водорослей, среди которых значительно число видов цианобактерий, в том числе азотфиксаторов *(Nostoc, Cα-lothrix, Anabaena, Tolypothrix* и др.). Богато представлены зеленые и желто-зеленые водоросли. В луговых и ковыльных степях черноземной зоны под густым травостоем водоросли развиваются менее интенсивно. Они представлены широко распространенными видами зеленых водорослей, интенсивно размножаются и цианобактерии.

В южных сухих и полупустынных степях при разреженном травостое развитие водорослей усиливается. На поверхности каштановых почв образуются пленки водорослей, в которых ведущая роль принадлежит цианобактериям, в том числе и азотфиксаторам. При пустынном почвообразовании состав альгофлоры напоминает таковой в полупустынной зоне, но численность водорослей существенно снижается. Преобладают цианобактерии (осцилляториевые), распространены зеленые водоросли, причем максимальное их количе-

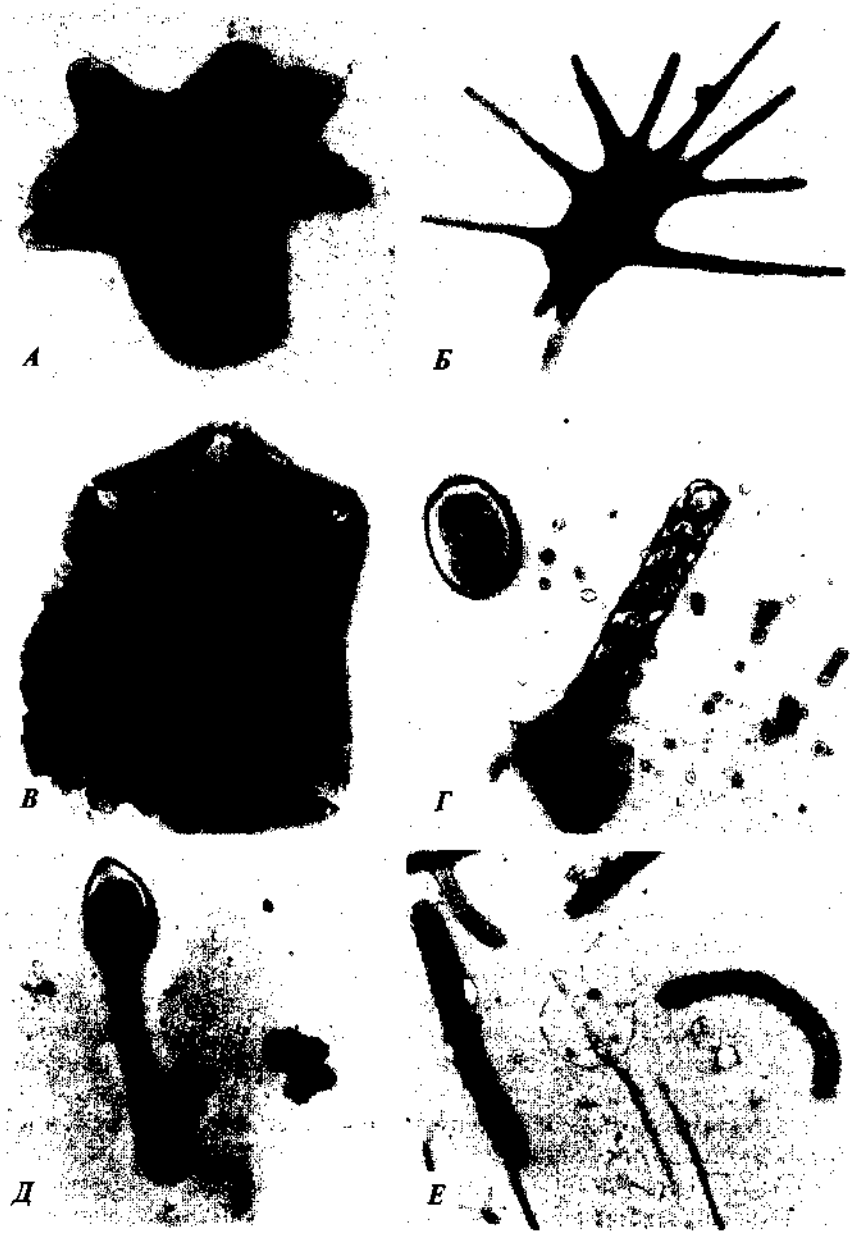


Рис. 59. Олиготрофные микроорганизмы под электронным микроскопом:
А — Zabrys monachus; Б — Prosthecomicrobium sp.; В — Stella humosa; Г— Seliberia sp.; Д — Hyphomicrobium sp.; Е — Prosthecomicrobium polyspheroidum (по: Д. И. Никитин, Л. В. Васильева)

ство часто наблюдается не в поверхностном слое, а на некоторой глубине.

На рисунке 60 приведена схема структуры микробных сообществ почвы, которая иллюстрирует взаимоотношения описанных выше группировок почвенных микроорганизмов.

Специфика живого микронаселения почвы подтверждает закон зональности В. В. Докучаева и делает возможной микробиологическую диагностику направленности почвообразовательного процесса, оценку плодородия почвы и его изменения в результате деятельности человека.

Некоторые группировки микроорганизмов при антропогенном воздействии на почву изменяются довольно слабо. Они отражают тип почвообразовательного процесса и могут быть индикаторами, которые достаточно консервативны и хранят информацию о былых состояниях факторов почвообразования. К таким сравнительно стабильным показателям относится показатель соотношения основных групп микроорганизмов.

При окультуривании почвы в микробном ценозе возникают существенные изменения. Увеличивается численность микробного населения, в ценозе появляются организмы, свойственные более южной почвенной зоне. Об этом свидетельствует пример с целлюлозоразлагающими микроорганизмами, состав которых резко меняется при внесении удобрений (рис. 61). Следовательно, микроорганизмы можно использовать для анализа типа и состояния почвы.

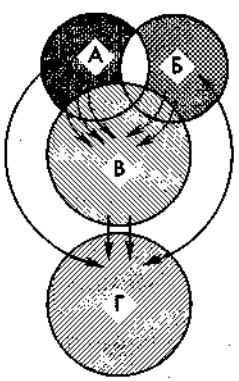


Рис. 60. Схема структуры микробных сообществ почвы: *А* — зимогенная микрофлора; *Б* — автохтонная микрофлора (разлагающая гумус); *В* — олиготрофные микроорганизмы; *Г* — хемоавтотрофы

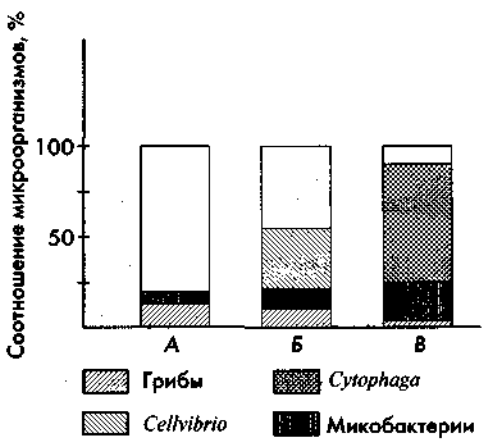


Рис. 61. Состав целлюлозоразлагающих микроорганизмов в различно удобренных дерново-подзолистых почвах МСХА: *А* — до окультуривания; *Б* — внесены минеральные удобрения; *В* — внесен навоз

Контрольные вопросы и задания

1. Какие методы позволяют определить численность и состав отдельных групп микроорганизмов в почве? 2. Как установить быстроту распада в почве определенного химического вещества? 3. Чем определяется изменение численности микроорганизмов по сезонам года, при окультуривании почвы? 4. Дайте сравнительную характеристику примерного микробиологического состава микрофлоры почвы тундры, лиственного леса.

Экологические особенности развития микробных сообществ почвы

На активность микроорганизмов и формирование их сообществ в почве влияет ряд природных и атропогенных[1] факторов. Среди них температура почвы, ее влажность, воздушный режим, окислительно-восстановительный потенциал, кислотность и механические свойства, а также биотические факторы.

14.1. Температура почвы

Температура почвы определяется географическим фактором и сезоном года. Наблюдаются и суточные колебания температуры, которые сильнее всего сказываются в поверхностном слое почвы. Сезонные колебания температуры влияют на весь профиль почвы. В криофильных почвах на определенной глубине залегает постоянный мерзлотный слой, подавляющий активность микроорганизмов.

В одной и той же зоне температурный режим почвы зависит также от ее способности поглощать тепловые лучи, теплоизлучения, от характера растительности и т. д.

Напомним, что среди микроорганизмов имеются психрофилы, размножающиеся при относительно низких положительных температурах; мезофилы, которые растут при обычных температурах окружающей среды, и термофилы, нуждающиеся в высокой температуре.

Основная масса почвенных микроорганизмов принадлежит к мезофилам. Наблюдения показывают, что при температуре ниже 5 °С в почве практически перестает накапливаться CO_2, т. е. приостанавливается распад органических соединений. При такой температуре, по данным *В. Флайга,* резко тормозится процесс нитрифика-

[1] Роль антропогенных факторов в формировании микробных сообществ почвы показана в главе 15.

ции, свидетельствующий о мобилизации почвенного азота. Если за 100% принять энергию данного процесса при 25 °С, то относительная интенсивность накопления нитратов (в %) при более низких температурах будет следующая:

20 °С	80
15 °С	50
10 °С	20
5 °С	10
1 °С	1

Доказано, что оптимум и максимум температуры для большинства почвенных мезофильных микроорганизмов меняются в зависимости от климата. Бактерии в южных почвах, как правило, имеют более высокие температурные оптимум и максимум.

В этом сказывается приспособительная реакция микроорганизмов к условиям среды. Она отсутствует лишь у видов бактерий, завершающих процесс минерализации органических остатков *(Bacillus megaterium, B. subtilis, B. mesentericus* и др.). В основном это спорообразующие виды. Для их существования температурная адаптация не имеет столь большого значения.

В почвах южной зоны, как правило, обитают микроорганизмы, предъявляющие повышенные требования к теплу. Например, южные почвы значительно богаче теплолюбивыми грибами рода *Aspergillus,* в то время как в северных преобладают виды рода *Penicillium,* способные развиваться при более низких температурах.

Теплолюбивые микроорганизмы при оптимальной для них температуре более активны, чем психрофильные. Термофилы обладают исключительно высокой биохимической активностью. В связи с этим в южных почвах при благоприятных условиях микробиологические процессы протекают более энергично, чем в северных. Однако термофильных микроорганизмов даже в южных почвах мало, и существенной роли в почвенных процессах они не играют. Это объясняется тем, что при сильном нагревании почва быстро пересыхает, создавая неблагоприятную обстановку для размножения термофилов. В почву термофильные микроорганизмы поступают в основном с навозом, при созревании которого происходит их массовое размножение. Поэтому богатство почвы термофилами может служить косвенным признаком степени ее унавоженности.

Чтобы получить представление о том, насколько неодинакова напряженность микробиологической деятельности в почвах разных климатических зон в связи с различиями температурного фактора, можно сопоставить температуры почвы за теплый период с оптимальными температурами мезофильных бактерий (табл. 7).

Из данных таблицы видно, что оптимальные для развития бактерий значения температуры во всех пунктах лежат значительно выше физической температуры почвы. Лишь в отдельные моменты, причем только на юге, эти значения могут совпадать. Таким образом, в южной зоне дефицит тепла меньше, поэтому при благоприятной влажности микробиологические процессы здесь протекают более интенсивно.

Таблица 7

Сопоставление температуры почвы разных климатических зон с потребностью мезофильных форм бактерий в тепле

Пункт	Средняя температура почвы за май и август (а)	Примерная оптимальная температура для бактерий (б)	Разница (б - а)
Архангельск	10,5	28,5	18,0
Москва	12,7	30,0	17,3
Курск	16,4	34,0	17,6
Северный Кавказ	22,4	35,5	13,1
Ташкент	30,0	38,0	8,0

Возникает вопрос — как сказываются низкие температуры зимнего периода на почвенной микрофлоре? Казалось бы, в это время масса микроорганизмов должна гибнуть, но исследования нередко указывают на увеличение количества бактерий. Предполагали даже, что в почве существует особая группировка холодоустойчивых микроорганизмов, но это не подтвердилось. Увеличение числа бактерий в холодный сезон года объясняется, видимо, десорбцией микроорганизмов из почвенных частиц, наступающей при коагуляции коллоидов под влиянием низких температур. Возможно, в таких условиях определенную роль играет и замедленное отмирание бактерий.

14.2. Влажность почвы

Огромное влияние на жизнедеятельность микроорганизмов оказывает влажность почвы. Вода, составляющая жидкую фазу почвы, содержит то или иное количество растворенных веществ. Растения и микроорганизмы усваивают питательные вещества в основном из почвенного раствора.

Клетки корневой системы растений и микроорганизмов для ассимиляции водного раствора имеют более высокое осмотическое давление, чем почвенный раствор. По величине осмотического давления клетки микроорганизмов почвы существенно различаются (см. с. 97). Большинство из них способны развиваться в почве при

наличии по крайней мере гигроскопичной влаги. В южных почвах микробы адаптированы к более сухим условиям существования, чем в северных. Некоторые актиномицеты и ряд грибов развиваются даже при крайне низкой влажности почвы.

Растения более требовательны к влаге, чем микроорганизмы. Как известно, завядание большинства из них происходит уже при влажности почвы, равной 1,5 максимальной гигроскопичности («мертвый» запас влаги). В обычных почвах со средней влажностью осмотическое давление раствора колеблется в пределах $0,5 \cdot 10^5 — 5 \cdot 10^3$ Па. В солончаках, богатых растворимыми солями, осмотическое давление может достигать $1,6.10^7$ Па.

Можно считать, что мобилизационные, агрономически желательные процессы лучше всего протекают при влажности почвы, приближающейся к 60% полной влагоемкости. При таком увлажнении в почве достаточно воды и воздуха, находящихся между почвенными агрегатами. При более сильном увлажнении воздух из почвы вытесняется, что подавляет аэробные микробиологические процессы. Подобная обстановка, например, создается на залитых водой рисовых полях, где относительно благоприятные аэробные условия имеются лишь в самом поверхностном слое почвы.

Установлено, что аммонификация и нитрификация лучше всего проходят при влажности почвы, равной 60% полной влагоемкости. Оптимум фиксации азота несколько сдвинут в сторону более высокой влажности. Это, очевидно, объясняется тем, что молекулярный азот связывают многие бактерии, склонные к анаэробиозу.

В природной обстановке влажность почвы сильно колеблется, особенно резко в неорошаемых почвах южной зоны. Здесь в период дефицита влаги нередко подавляется деятельность бактерий, но активизируются актиномицеты и грибы. При значительном иссушении активная деятельность микроорганизмов в почве вообще прекращается. В сухих степях наиболее энергичные микробиологические процессы вообще протекают не летом, а весной и осенью, т. е. при более низкой температуре, но достаточной влажности.

Таким образом, в почвенных процессах огромное значение имеет сочетание условий температуры и влажности: как высокая, так и низкая температура подавляют эти процессы в почве, а интенсивнее всего они идут при 20—30 °С (табл. 8).

Следует отметить, что при низкой влажности почвы, не обеспечивающей сколько-нибудь интенсивного развития микроорганизмов, в ней могут достаточно активно работать разнообразные ферменты. Это показывает, что в период дефицита влаги почва не представляет собой инертный субстрат. В полевых условиях благоприятный водный режим может быть создан обработкой почвы, поливом, мелиорацией и т. д.

Таблица 8

Градации возможной интенсивности микробиологических процессов при различных условиях среды

Температура почвы, °С	Коэффициент увлажнения по Иванову[1]	Возможная интенсивность микробиологической деятельности
>=30	>=1,5	Сильная
30-20	1,49-1,0	Очень интенсивная
20-10	0,99-0,6	Довольно интенсивная
10-5	0,59-0,30	Слабая
5	0,29-0,13	Очень слабая

[1] *Коэффициент увлажнения* представляет собой отношение количества выпавших осадков к количеству испарившейся воды.

Температурно-водный режим оказывает большое влияние на формирование микробных сообществ почвы. Наблюдения свидетельствуют о закономерной смене микробных сообществ в ходе распада органического вещества. Так, в первые фазы разложения растительных остатков на них развиваются грибы и неспорообразующие бактерии. Позднее увеличивается число бацилл и актиномицетов. Происходит также смена систематических групп микроорганизмов. В разных климатических зонах разложение органического вещества идет с неодинаковой скоростью, что существенно сказывается на составе микрофлоры почвы.

Температура почвы и ее влажность в сочетании оказывают огромное влияние на полевую всхожесть семян сельскохозяйственных растений. При низких температурах снижается иммунитет семян к различного рода микроорганизмам, а высокая влажность почвы приводит к уменьшению содержания кислорода в почвенном воздухе, что вредит развивающимся проросткам.

14.3. Воздушный режим почвы

Воздушный режим почвы имеет не меньшее значение для микробиологических процессов, чем температура и влажность. Воздух содержится в почвенных порах, которые составляют в отдельных случаях от 25 до 70% общего объема почвы. Содержание воздуха в почве подвержено сильным колебаниям в зависимости от ее увлажнения, уплотнения и т. д.

В связи с потреблением почвенными организмами и корнями растений содержание кислорода в почвенном воздухе ниже, чем в

атмосфере. В затопленных почвах иногда кислорода почти нет. В воздухе слежавшейся почвы кислорода около 2%, в хорошо взрыхленной — до 20%.

В почвенном воздухе обычно повышено содержание диоксида углерода, который выделяют микроорганизмы и корни растений. Чаще всего CO_2 составляет 0,3—1,5% в почвенном воздухе (в атмосферном — 0,03%). В затопленных почвах количество CO_2 повышается до 10%. В атмосфере щелочных почв диоксид углерода почти отсутствует. В целом газовый состав почвенного воздуха подвержен суточным и сезонным колебаниям.

Большое количество CO_2 ежесуточно выделяется из почвы, а вместо него из атмосферы поступает воздух. Данный процесс, получивший название «дыхание почвы», имеет огромное значение для жизни растительного мира.

Известно, что различным газам свойственна неодинаковая растворимость в воде. Так, при 20 °С в 100 мл воды растворяется 3,1 мл кислорода; 1,5 мл азота; 87,8 мл диоксида углерода. При повышении содержания CO_2 в воздухе почвенный раствор сильно обогащается этим газом. Вследствие высокой растворимости CO_2 в воде при обогащении им почвы может возникнуть обстановка, близкая к анаэробиозу, несмотря на относительно высокое содержание в почвенном воздухе кислорода, который растворяется хуже. Анаэробные условия легче создаются в микропорах и капиллярных промежутках почвы.

Аэробные микроорганизмы хорошо переносят повышенное содержание в воздухе CO_2. Нередко при этом отмечается даже улучшение их роста при обогащении воздуха диоксидом углерода. Тем не менее при 1—1,5% и более активность некоторых групп микроорганизмов подавляется. Вероятно, отчасти по этой причине в нижних горизонтах пахотного слоя меньше микроорганизмов, чем в верхних.

Вместе с тем аэробные цианобактерии лучше развиваются при повышенном содержании CO_2 в почве. Оптимальная для них концентрация CO_2 равна 1%, максимальная для ряда представителей достигает 12% и выше.

Семена зерновых культур лучше всего прорастают при содержании кислорода в почве около 20%. Если его запас снижается до 10—15%, то прорастание семян тормозится. При содержании в почве 2,5—5% кислорода семена обычно прорастают очень медленно и развитие всходов сильно задерживается.

14.4. Окислительно-восстановительный потенциал почвы

Обеспеченность почвы кислородом связана с ее окислительно-восстановительными условиями, характеризующимися величиной **окислительно-восстановительного потенциала *(Eh)*. В** верхнем

слое подзолов значение *Eh* обычно колеблется в пределах 600—750 мВ, в черноземах — 350—600, в сероземах — 350—400 мВ. Приведенные показатели усреднены, так как почва представляет собой гетерогенную среду и в отдельных ее зонах наблюдаются существенные колебания значений *Eh*.

При снижении показаний *Eh* до 200—250 мВ в почве начинают развиваться микробиологические процессы резко восстановительного характера, например образование глея. В нейтральных почвах уже при *Eh* 250 мВ восстанавливается такое количество марганца, что образовавшиеся закисные соединения данного элемента могут отравить растения. При *Eh* 340 мВ создается обстановка, благоприятствующая энергичному восстановлению нитратов до свободного азота денитрификаторами.

В затопляемых почвах, например на рисовых полях, более или менее удовлетворительно обеспечивается кислородом лишь поверхностный слой в несколько сантиметров. Глубже значения окислительно-восстановительного потенциала снижаются до 100—110 мВ, вследствие чего в таких слоях идут восстановительные процессы, в частности образование сероводорода из сульфатов.

Нежелательны для почвы и резко окислительные условия. Так, в нейтральных почвах (pH 6,5—7) при *Eh* 550 мВ, а в кислых (pH около 5) при *Eh* 680 мВ происходит почти полное окисление солей железа и марганца, указанные элементы выпадают из раствора в виде гидроксидов, что приводит к нарушению питания растений.

На окислительно-восстановительный потенциал почвы могут оказывать влияние ионы растворимых элементов с переменной валентностью, например Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} и другие, а также изменение pH среды, влияющее на устойчивость этих ионов.

Вещества, составляющие твердую и коллоидно-дисперсную фазу, в установлении окислительно-восстановительного потенциала почвы не участвуют, но обладают буферными свойствами и служат резервом для образования потенциалопределяющих ионов. В частности, это относится к гумусовым соединениям почвы.

Диапазон колебаний окислительно-восстановительных условий почв различной влажности в зависимости от их кислотности схематично показан на рисунке 62. Как видно, в нормально увлажненных почвах создаются более или менее аэробные условия. Относительно анаэробную обстановку можно часто наблюдать лишь внутри отдельных комочков почвы, потому что микроорганизмы, находящиеся на поверхности агрегатов, поглощают кислород, не пропуская его внутрь комка. В течение вегетационного периода значение окислительно-восстановительного потенциала в почве также более или менее колеблется.

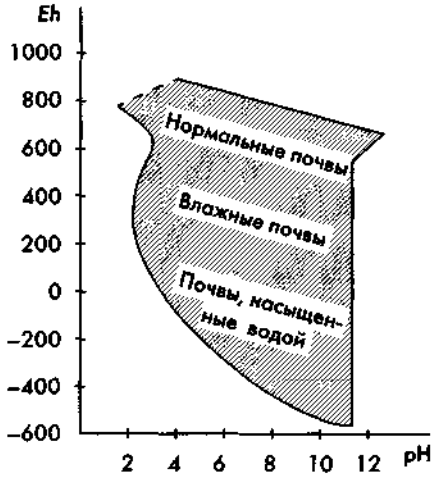


Рис. 62. Диапазоны изменения *Eh* и pH почв разной влажности (по: Баас-Бекинг)

Японские исследователи *Т. Нагатсука* и *Х. Фурузака* установили, что при давлении кислорода, равном $2 \cdot 10^4$ Па, в почвенной суспензии развиваются только аэробы, при уменьшении доступа кислорода доминируют анаэробы.

К аэробным микроорганизмам почвы относят мицелиальные грибы, большинство актиномицетов и значительную часть других бактерий. Аэробные актиномицеты и бактерии могут существовать при относительно небольших запасах кислорода, что делает понятным их размножение в глубоких слоях почвы. Как было показано Н. Н. Худяковым, некоторые аэробные почвенные микроорганизмы *(Bacillus subtilis, Aspergillus niger* и др.) способны размножаться при содержании в почве 0,13—0,26% кислорода.

Отдельные группы аэробных микроорганизмов неодинаково относятся к обеднению воздуха кислородом. Так, мукоровые грибы более требовательны к O_2, чем представители рода *Penicillium.* Некоторые бактерии, например *Bacillus mycoides,* тяготеют к верхним слоям почвы, а другие, как *B. idosus,* одинаково хорошо растут как в верхних, так и в глубоких слоях. Приведенные примеры объясняют, почему по мере углубления в почву наряду с уменьшением количества микроорганизмов существенно изменяется соотношение их групп и видов.

Большинство аэробных бактерий при росте на жидких питательных средах снижают значение *Eh* до 100—120 мВ. Многие из них могут жить и в анаэробных условиях (например, за счет восстановления нитратов и т. д.).

Возникает вопрос о месте обитания в почве анаэробных микроорганизмов, к которым в основном относятся бактерии. Максимальная численность анаэробных бактерий наблюдается в верхних слоях почвы. Это связано с тем, что здесь имеется небольшое количество органических веществ, а анаэробные микрозоны, в которых эти микроорганизмы размножаются, возникают в каждом комочке почвы.

Для хорошего развития сельскохозяйственных растений необходимы определенные окислительно-восстановительные условия. Ухудшение аэрации ослабляет мобилизационные процессы, что снижает урожай. Так, при значительном уплотнении почвы урожайность снижается более чем на 25%.

Оптимизации окислительно-восстановительных условий в почве можно достигнуть правильной обработкой и мелиоративными мероприятиями. Корневая система отдельных растений, например риса, может хорошо развиваться в почвах, где преобладают восстановительные процессы.

Вследствие деятельности разных групп микроорганизмов газовый состав почвы значительно отличается от атмосферного. Так, в почве есть газы, практически отсутствующие в атмосфере. Это оксиды азота, сероводород, метан, оксид углерода, молекулярный водород и др. Количество газов варьирует в зависимости от условий почвенной среды.

14.5. Кислотность почвы

На характер микрофлоры большое влияние оказывает активная кислотность почвы. По величине pH почвы могут быть разделены на следующие группы: сильнокислые (pH 3—4), кислые (4—5), слабокислые (5—6), нейтральные (6—7), щелочные (7—8), сильнощелочные (8—9) и выше.

В подзолах значение pH среды обычно находится в пределах 3,5—5,0, в черноземах — 6,5—7,2, в сероземах — 7,5.

Значение pH одной и той же почвы на разных, даже близко расположенных, участках поля может несколько различаться. В течение вегетационного периода кислотность почвенной среды также подвержена изменениям, что обусловлено жизнедеятельностью микроорганизмов, образованием ими CO_2, кислот и т. д.

Определяемое обычными методами значение pH среды дает лишь средний показатель кислотности почвы. На самом деле для отдельных точек одной и той же почвы эта величина неодинакова, и микроорганизмы разных микрозон находятся далеко не в одинаковых условиях. В кислых почвах имеются микрозоны, где могут размножаться микроорганизмы, не переносящие высокой кислотности, в щелочных почвах встречаются относительно кислые микрозоны.

Кроме того, одна и та же величина реакции среды может иметь неодинаковое значение в жизнедеятельности микроорганизмов в разных почвах. Так, в подзолах уже небольшое снижение pH вызывает освобождение алюминия, токсичного для ряда микроорганизмов; такого не наблюдается в богатых кальцием черноземах. Поэтому подкисление подзолов вызывает более сильное подавление микробиологических процессов, чем подкисление в той же степени черноземов.

К алюминию особо чувствительны актиномицеты, азотобактер и многие водоросли. Повышенное содержание этого элемента переносят грибы и ряд бактерий. Отчасти вследствие этого северные почвы бедны актиномицетами и азотобактером.

Микроорганизмы одной и той же систематической группы неодинаково относятся к кислотности среды. Так, большинство бактерий почвы не развивается при значении реакции среды ниже pH 4,5—5, но некоторые из них (например, *Thiobacillus thiooxidans)* могут сохраняться в жизнеспособном состоянии даже при pH 0,9. Минимальные значения кислотности среды для грибов составляют pH 2—3, но некоторые грибы рода *Mortierella* не выносят подкисления. Чувствительны к низким значениям реакции среды актиномицеты. В связи с этим становится понятным, почему в любой почве могут быть найдены представители основных групп микроорганизмов, но в кислых почвах относительно больше микроскопических грибов, чем в щелочных. В последней группе почв лучше размножаются бактерии и актиномицеты.

Несмотря на разную кислото- и щелочеустойчивость, все группы микроорганизмов проявляют активную жизнедеятельность в нейтральной среде. Поэтому нейтрализация кислых и снижение pH щелочных почв приводят к активизации микробиологических процессов, благоприятных для возделывания культурных растений.

14.6. Механический состав почвы

На деятельность почвенных микроорганизмов большое влияние оказывает механический состав почвы. Основная масса почвенных микроорганизмов (90—99%) связана с твердой фазой почвы, и лишь незначительная их часть развивается в почвенном растворе. Объясняется указанная особенность способностью твердых частиц почвы удерживать (адсорбировать) клетки микроорганизмов. Н. Н. Худяков и его ученики показали, что микроорганизмы активно поглощаются частицами почвы. Можно полагать, что в основе адсорбции лежит взаимодействие положительно заряженных частиц почвы с отрицательно заряженными клетками микробов.

В крупных почвенных агрегатах значительно больше микроорганизмов, чем в мелких. Это объясняется не только величиной агрегатов, но и большим содержанием в них органических веществ, обусловливающих активное размножение микроорганизмов. Способность почв адсорбировать микроорганизмы непостоянна и зависит от влажности почвы, ее температуры, дисперсности и др. Поскольку перечисленные факторы меняются в течение года, изменяется и адсорбция.

В почвенном растворе также присутствуют питательные для микроорганизмов вещества, активизирующие их размножение в водной фазе почвы. Кроме того, на распределение микроорганизмов между твердой и водной фазами почвы значительно влияют растительные остатки, обогащающие почвенный раствор органическими соединениями. На растительной массе также обильно представлены микроорганизмы. Их очень много в ризосфере и ризоплане, так как выделяющиеся из корней в почву органические соединения служат питанием для микроорганизмов. Таково же значение корневого опада отмирающих корней. Много микроорганизмов развивается и на погибших почвенных животных. Питанием некоторым группам микроорганизмов служат гумусовые соединения, а также продукты их распада.

Каждому типу почвы свойствен определенный **профиль.** У одних почв гумусовый слой невелик, у других он очень мощный. От этого зависит глубина распространения микроорганизмов в почве. Однако по мере углубления в почву количество гумуса уменьшается более постепенно, чем численность микроскопических существ.

14.7. Биотические факторы

На характер сообщества микроорганизмов почвы большое влияние оказывают биотические факторы, и прежде всего взаимоотношения организмов. Например, между микроорганизмами можно наблюдать так называемые *метабиотические* отношения, при которых продукты жизнедеятельности одних видов служат источником для существования других. Так, нитрификаторы развиваются, только если в почве достаточно аммиака, вырабатываемого гнилостными микробами.

Как уже сообщалось в главе 5, существуют *синтрофные* взаимоотношения микроорганизмов. Под данным термином понимают явление, при котором два вида или более растут на среде, недоступной каждому виду в отдельности. Это объясняется обменом факторами или субстратами роста, а иногда удалением одним микроорганизмом какого-либо компонента, токсичного для другого микроба.

У представителей микромира отмечен и *прямой паразитизм.* Так, существуют хищные грибы, образующие кольца или липкие головки, при помощи которых они улавливают нематод, служащий им источником питания (рис. 63). Описаны скользящие нитевидные бактерии, способные присоединяться к клеткам других видов бактерий, водорослей и нематод, вызывая их лизис.

Большая группа грибов, паразитирующих на других грибах, получила название **микофильных** грибов. Мелкая бактерия рода *Bdellovibrio* (вибриопиявка), как обнаружил *К. Штольп,* внедряется в клетки более крупных бактерий и питается их содержимым. Паразитами многих микроорганизмов служат фаги.

Б. В. Громов выявил среди микроскопических водорослей паразитов родов *Aphelidium* и *Amoeboaphelidium,* представляющих собой промежуточные между простейшими и водорослями формы. Разнообразны и взаимоотношения микроорганизмов с другими группами живых существ. *Protozoa* (простейшие) поедают многие бактерии и грибы. Питанием для мелких клещей и других животных служит не только мертвый органический субстрат, но и микроорганизмы.

Рис. 63. Ловчие кольца, образуемые мицелием хищного гриба; в одно из них попала нематода (по: А. Р. Сопрунов)

Таким образом, развитие микробных сообществ в почве определяется целым комплексом природных абиотических, биотических, а также антропогенных факторов.

Контрольные вопросы и задания

1. От чего зависит скорость почвообразовательного процесса? 2. Что представляют собой гумусовые вещества по химической природе? 3. Какими факторами среды определяется развитие микробного ценоза почвы? 4. Дайте определения понятиям: метабиотические отношения микроорганизмов, синтрофные взаимоотношения микроорганизмов.

Влияние антропогенных факторов на микробное сообщество почвы

15.1. Обработка почвы. Мелиорация

Среди антропогенных факторов наибольшее влияние на микробное сообщество почвы имеют разнообразные приемы обработки и мелиорации.

Обработка почвы. В настоящее время в земледелии используют различные приемы основной и поверхностной обработок почвы. Для выполнения основной обработки используют как общие приемы — вспашку, безотвальное рыхление, фрезерование и др., так и специальные приемы — двухъярусную и трехъярусную вспашку, щелевание, кротование и др. К приемам поверхностной и мелкой обработок почвы относят лущение, культивацию, боронование, прикатывание и др. Главный прием основной обработки почвы, влияющий на жизнедеятельность ее микрофлоры, — вспашка. Она должна создавать в почве благоприятные условия для протекания мобилизационных процессов, в результате которых накапливаются питательные вещества для растений. Однако в сельскохозяйственной науке и практике существуют разные подходы к решению вопроса об использовании различных приемов основной обработки почвы. Обоснование их связано с почвенными микробиологические процессами. Переходя к анализу воздействия разных приемов основной обработки почвы на микрофлору, отметим прежде всего уже упомянутую биологическую разнокачественность пахотного слоя, которая выражается в постепенном снижении численности микроорганизмов по мере углубления в почву.

Как видно из таблицы 9, по мере углубления в почву численность практически всех групп микроорганизмов снижается. При этом химический состав почв в пределах пахотного слоя тождествен. Снижение численности микронаселения с глубиной может быть следствием ухудшения воздушного режима и накопления каких-либо токсичных веществ в нижних слоях почвы, очевидно, продуктов неполного распада растительных остатков.

Таблица 9

Распределение микроорганизмов в пахотном слое почвы, тыс. на 1 г

Слой почвы, см	Аэробные и факультативно-аэробные бактерии	Анаэробные бактерии	Нитрификаторы	Актиномицеты	Грибы
Дерново-подзолистая почва (поля МСХА)					
0-5	5700	270	1000	640	53
10-15	4400	230	1000	420	41
15-20	2700	180	100	250	20
Чернозем обыкновенный (Воронежская обл.)					
0-5	6300	310	10000	1950	48
10-20	5700	240	10000	2020	43
20-30	4800	180	1000	1860	41

В зоне достаточного увлажнения, в частности в дерново-подзолистых почвах, верхний горизонт пахотного слоя остается более богатым микроорганизмами в течение всего вегетационного периода. Черноземы, как и все неорошаемые почвы юга, находятся в зоне недостаточного увлажнения, и летом их верхние слои обычно подсыхают, поэтому количество микроорганизмов здесь заметно меньше.

Снижение микробиологической активности по мере углубления в почву подтверждается и таким суммарным показателем, как «дыхание почвы», т. е. выделение диоксида углерода, служащее показателем жизнедеятельности микроорганизмов. Самый активный по энергии дыхания — верхний слой почвы. Лучше аэрируемая парующая почва «дышит» энергичнее, чем занятая растительностью. Верхний слой незанятой почвы при безотвальной обработке выделяет больше CO_2, чем при вспашке. Последнее объясняется тем, что при безотвальной обработке основная масса растительных остатков остается наверху.

При аппликационной пробе на заложенном вертикально в почву полотне также отчетливо выявляется зона максимальной активности микроорганизмов. При нормальном увлажнении почвы эта зона расположена в верхнем горизонте пахотного слоя.

Почвы глубоких горизонтов пахотного слоя, химически ничем не отличаясь от почвы из высоколежащего горизонта, неблагоприятно действуют на растение. Если чашки Петри наполнить почвой из разных горизонтов окультуренного чернозема и посеять в нее семена растений, то прорастание семян и развитие растений лучше всего идет в почве из горизонта 0—10 см, хуже — из горизонта 15—25 см и совсем плохо в почве из горизонта 30—40 см (подпахотного). Можно сделать вывод о том, что плодородие почвы определяется не только ее химическим составом, но и деятельностью микроорганизмов.

Разные слои парующей почвы, вспаханной с оборотом пласта, не отличаются по плодородию. Верхний горизонт, перемещенный вниз, сохраняет высокое плодородие, а в нижнем (ставшем верхним) при улучшении аэробиоза активизируются мобилизационные микробиологические процессы и плодородие существенно повышается.

Отдельные горизонты пахотного слоя сохраняют свои особенности в течение 1—1,5 месяцев после вспашки. Позднее верхний слой обогащается микробами, а в нижнем активность их подавляется. Таким образом, в нижнем горизонте пахотного слоя происходит аккумуляция потенциального плодородия, переходящего в плодородие эффективное при активизации деятельности микроорганизмов.

Накопление в нижних слоях почвы резерва плодородия подтверждается опытом, проведенным на хорошо окультуренной дерново-подзолистой почве МСХА. На небольших делянках (20 $м^2$) слои почвы толщиной 5 см были сняты и перемещены так, как это происходит при разных приемах обработки. Разное расположение слоев существенно сказалось на урожае посеянного на делянке овса.

При пересчете урожая на 1 га были получены следующие данные:

Прием обработки	*Урожайность овса, т/га*
Поверхностное рыхление слоя 0—5 см	1,19
Рыхление всех слоев и расположение их без оборота пласта	1,78
Рыхление всех слоев и перемещение их в обратном порядке	3,06
Смешивание всех слоев (имитация вспашки)	3,02

Положительное действие оборота пласта объясняется, вероятно, тем, что подвижные органические вещества, аккумулированные в нижнем горизонте, попадая вверх, в условиях лучшего аэробиоза быстро подвергаются минерализации и повышают плодородие почвы. Верхний слой почвы, наиболее биологически активный, постепенно становится менее плодородным.

Следовательно, оборот пахотного слоя может дать значительный эффект. Однако вопрос о том, как часто целесообразно его делать, следует решать в зависимости от многих условий (системы земледелия, почвенно-климатических условий и т. д.). Поэтому система обработки почвы не должна быть одинаковой в различных почвенно-климатических условиях и даже в одной и той же зоне, но при неодинаковом использовании земли.

Мелиорация. Огромное значение в повышении плодородия почв имеют мелиоративные мероприятия. К ним относят орошение почв в зонах недостаточного увлажнения, осушение избыточно увлажненных почв, внесение в кислые и щелочные почвы соединений, нормализующих реакцию среды, удаление из почвы избыточных солей и т. д.

В зонах недостаточного увлажнения при дефиците влаги микробиологические процессы почвы приостанавливаются и большая часть микроорганизмов переносит засуху в анабиотическом состоянии. Увлажнение почвы активизирует микрофлору, что приводит к накоплению питательных веществ для растений и способствует их росту.

Полив должен быть строго нормирован. Избыточное увлажнение почвы вызывает нежелательные явления, снижающие плодородие (вторичное засоление, ухудшение структуры почвы и т. д.).

Осушение переувлажненных почв благоприятно сказывается на составе микрофлоры, в частности это относится к вводимым в куль-

туру торфяникам. В мелиорированных торфяниках обычно накапливается избыток доступных растениям соединений азота (аммиака и нитратов). Часть нитратов поступает в дренажные воды и теряется для урожая. Поэтому следует учитывать такого рода изменения микробиологических процессов при мелиорации и регулировать их доступными приемами, например глубиной дренажной системы, спуском из нее воды и т. д. Одним из методов предупреждения избыточной минерализации органических соединений торфяников является насыпное пескование, которое применяют в некоторых странах Западной Европы. На поверхность торфа наносят песок слоем 10—15 см, и в дальнейшем механической обработке подвергается только песчаная насыпь. Это задерживает развитие в торфяной массе активных микробиологических процессов. Эксплуатация пескованных торфяников исчисляется иногда сотнями лет.

Для химической мелиорации кислых подзолистых и дерново-подзолистых почв широко применяют известкование. Применение извести устраняет кислотность и уменьшает содержание в почве подвижного алюминия, токсичного для многих микроорганизмов и растений. Внесение извести резко меняет соотношение отдельных групп микроорганизмов почвы и активизирует деятельность тех из них, которые важны для плодородия почвы (табл. 10).

Таблица 10

Изменение состава микроорганизмов дерново-подзолистой почвы при известковании

Дата наблюдения	Вариант опыта	Число микроорганизмов разных групп, тыс. на 1 г почвы					
		бактерии, всего	бациллы	актиномицеты	грибы	азотобактер	нитрификаторы
27 июня	Контроль	3900	770	160	67	0	1
	Известкование	6500	1600	250	10	2	5
10 августа	Контроль	2900	880	200	130	0	1
	Известкование	15500	2130	2200	50	15	10

Известь способствует образованию клубеньков у бобовых растений, особенно у люцерны и клевера. Из бобовых лишь для люпина предпочтительна кислая реакция среды.

В южной зоне нашей страны большие площади заняты солонцовыми почвами. Для их сельскохозяйственного освоения проводят химическую мелиорацию, чаще всего гипсование, в результате которого натрий в почвенном поглощающем комплексе замещается на кальций, что заметно улучшает физические свойства почвы и нейтрализует ее реакцию (обычно щелочную). Состав почвенной микрофлоры нормализуется — угнетаются анаэробы, в частности сульфатредукторы.

Бактерии, восстанавливающие сульфаты, образуют сульфиды, которые в рассматриваемых почвенных условиях (при наличии CO_2) превращаются в соду:

$$Na_2S + CO_2 + H_2O \longrightarrow Na_2CO_3 + H_2S$$

При внесении в почву гипса образуются труднорастворимый карбонат кальция, выпадающий в осадок, и сульфат натрия, в растворе имеющий нейтральную реакцию и легко удаляемый промывкой.

Для введения в сельскохозяйственное использование после открытой разработки полезных ископаемых огромное значение имеет рекультивация земель. При рекультивации, когда удается поверхностный слой выровненной территории покрыть почвой, нормализация жизни почвенного слоя наступает весьма быстро.

Первоначально в заселении таких субстратов большое участие принимают цианобактерии, фиксирующие молекулярный азот. Им сопутствуют зеленые, желто-зеленые и диатомовые водоросли. Сопровождающая водоросли группировка бактерий представлена неспороносными бактериями с преобладанием микобактерий. В более поздние сроки окультуривания она обогащается бациллами и актиномицетами.

15.2. Органические удобрения

Органические удобрения — навоз, городские отходы, компосты и др. способствуют интенсификации микробиологических процессов, поскольку они являются источником энергии и элементов питания микроорганизмов.

Навоз. Содержание органического вещества в навозе составляет 20—25%; количество питательных для растений веществ ограничивается долями процента (0,5% азота, 0,2% P_2O_5, 0,6% K_2O) и около 75% воды. Органическая часть навоза в расчете на беззольную сухую массу содержит до 40% перегнойных соединений, около 30% целлюлозы и лигниноподобных веществ.

При переводе животноводства на промышленную основу в хозяйствах получают «жидкий навоз». Содержание воды в нем достигает 90—98%. Однако фракция сухих веществ такого навоза по составу близка к обычному.

Д. Н. Прянишников различал четыре способа хранения навоза: под скотом; нерегулированное хранение на гноище; приготовление «холодного» навоза немедленным уплотнением в навозохранилище и изготовление «горячего» навоза при временной рыхлой укладке с последующим уплотнением.

При хранении навоза под скотом формируется удобрение высокого качества. Однако антисанитарные условия, возникающие при таком способе хранения, заставляют отказываться от его применения.

При нерегулируемом хранении навоз вывозят и сваливают на гноище. В зависимости от условий хранения он может получаться удовлетворительного или низкого качества. Уплотнение навоза, защита его от дождя, предупреждение стока жидкости — все это условия получения навоза с хорошими удобрительными свойствами.

Холодным способом навоз готовят в специальных навозохранилищах с бетонированными дном и стенами. В навозохранилищах должен быть колодец для сбора стекающей на дно навозной жижи. Завезенный в хранилище навоз сразу же уплотняют, а по заполнении помещения изолируют его поверхность от воздуха. Брожение такого навоза протекает медленно, и температура не поднимается выше 30—40 °С.

При горячем способе приготовления навоз держат в хранилище некоторое время в виде рыхлой массы, без уплотнения, примерно метровым слоем. Через два—четыре дня, когда температура массы поднимается до 60—70 °С, ее уплотняют и укладывают сверху второй слой навоза, который разогревается, а нижний уплотненный слой постепенно охлаждается и т. д.

Описанный способ приготовления навоза вызывает значительные потери питательных для растений веществ, и прежде всего — соединений азота. Раньше предполагали, что при горячем способе погибают семена сорняков. Это считалось преимуществом способа. Однако в специальных опытах указанное предположение не подтвердилось. В связи с этим в последнее время горячий способ приготовления навоза считают нерациональным.

Динамика температуры при горячем и холодном способах приготовления навоза показана на рисунке 64. Интенсивность разогревания зависит не только от доступа воздуха, но и от состава навоза. Существенно влияние на разогревание навоза и количества находящейся в нем подстилки. Чем больше соломы, тем сильнее навоз разогревается. Солома обеспечивает более рыхлую укладку навоза, лучшую аэрацию его массы и развитие аэробных микробиологических процессов, выделяющих много тепла.

В свежем навозе размножается огромная масса разнообразных микроорганизмов. В зависимости от условий хранения навоза их развитие имеет специфику. В таблице 11 приведены данные о раз-

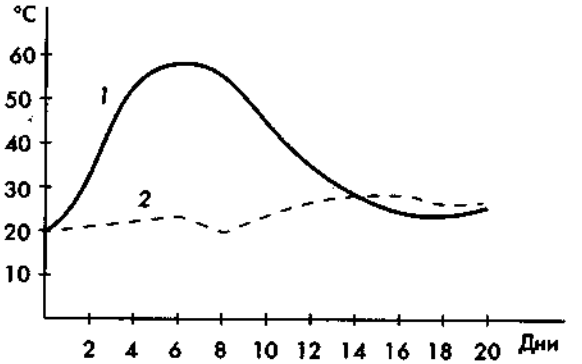


Рис. 64. Температура навоза, созревающего в разных условиях: 1 — при горячем способе хранения; *2* — при холодном способе хранения

витии сапротрофных мезофильных микроорганизмов при хранении смешанного навоза холодным способом. Они показывают, что главную роль в созревании холодного навоза играют неспорообразующие бактерии, а численность бацилл и актиномицетов здесь невелика. В свежем навозе первоначально более половины микроорганизмов составляют кокковидные бактерии, число которых постепенно уменьшается. Большинство из них являются аммонификаторами, начинающими гнилостный процесс.

В навозе довольно много бактерий рода *Pseudomonas,* представителей группы кишечной палочки и других неспорообразуюших палочковидных аммонификаторов. Некоторые из них могут вызывать денитрификацию. В навозе присутствуют и гнилостные спорообразующие бактерии — *Bacillus subtilis, B. mesentericus, B. megaterium, B. mycoides* и т. д., но при холодном способе приготовления эти виды размножаются слабо.

Таблица 11

Динамика численности микроорганизмов при созревании холодного навоза, млн на 1 г навоза (по: В. Н. Былинкина)

Группа микроорганизмов	Исходный материал	Период от момента закладки навоза			
		дней	месяцев		
		15	1	2	4
Не образующие спор бактерии	960	2600	1800	140	130
Бациллы	6	15	20	7	6
Актиномицеты	1	1,6	1,8	0,9	1,5

Многие аммонифицирующие бактерии навоза могут вызывать распад мочевины. Общее число подобных форм микроорганизмов достигает 200—300 млн на 1 г навоза. Грибы существенного значения в созревании холодного навоза не имеют, так как для их развития нужен обильный доступ воздуха.

Многочисленна в навозе группа аэробных микроорганизмов, разлагающих целлюлозу. Среди них много представителей *Cytophaga,* несколько беднее представлен род *Cellvibrio* и др. Обнаружены также анаэробные разрушители целлюлозы *(Clostridium omelianskii).* В холодном навозе можно встретить термофильную целлюлозоразлагающую бактерию *Clostridium thermocellum.* Но в целом группа термофильных и термотолерантных бактерий в холодном навозе немногочисленна и не превышает 1—1,5 млн на 1 г массы.

В навозе встречаются нитрификаторы, проявляющие активность только в самом поверхностном его слое, куда проникает необходимый им кислород. Помимо окисления аммиака, некоторые из этих микроорганизмов разлагают в навозе пуриновые основания.

Иначе развивается процесс при горячем способе созревания навоза. В первый период созревания в рыхло сложенной массе бурно развиваются разнообразные мезофильные микроорганизмы — аэробные неспороносные бактерии, грибы и частично актиномицеты. Через несколько дней, когда температура навоза поднимется до 60—70 °С, его уплотняют.

В результате подъема температуры и удаления из навоза воздуха большая часть мезофильной микрофлоры отмирает. Некоторая часть актиномицетов и неспорообразующих бактерий переносит повышенную температуру в анабиотическом состоянии. Активно размножаться в разогревшемся навозе могут лишь термофильные и термотолерантные актиномицеты и бактерии. Последние представлены в основном спорообразующими формами *(Bacillus subtilis, B. mesentericus).* Целлюлозу в горячем компосте разлагает термофильная бактерия *Clostridium thermocellum.*

Абсолютная численность термофильных микроорганизмов в навозе даже в период разогревания не бывает высокой. Это можно объяснить тем, что хотя эти микроорганизмы быстро размножаются, индивидуальная жизнь их коротка. Обмен веществ в клетке термофилов идет очень интенсивно, что приводит к сильному разогреванию субстрата, в котором они размножаются. Динамика численности микроорганизмов в горячем навозе приведена в таблице 12.

Степень повышения температуры навоза зависит не только от доступа кислорода, но и от состава навоза. Например, при окислении содержащих азот органических веществ выделяется больше тепла, чем при распаде углеводов. Поэтому конский навоз, в котором больше веществ, содержащих азот, разогревается сильнее, чем навоз крупного рогатого скота. Данные Д. Н. Прянишникова, характеризующие энергию разогревания навоза, приведены в таблице 13. Если, например, для парникового хозяйства нужно получить более равномерное и продолжительное разогревание почвы, то пользуются смесью навоза разных животных.

Рассмотрим характер изменений основных компонентов навоза при его созревании. До 40% азота находится в навозе в виде гиппуровой и мочевой кислот, но большая часть — в виде мочевины. Последняя легко гидролизуется уробактериями и многими сапротрофными бактериями. При этом образуется углекислый аммоний, который легко диссоциирует на NH_3 и CO_2.

Таблица 12

Динамика численности микроорганизмов при созревании холодного навоза, млн на 1 г навоза (по В. Н. Былинкиной)

Группа микроорганизмов	Исходный материал	Период с момента закладки; температура навоза				
		2 дня; 30 °С	5 дней; 60 °С	6 дней; около 50 °С	2 месяца; 20 °С	3,5 месяца; 17 °С
Бактерии (общее число)	450	610	15	16	17	19
Термофильные бактерии	0,03	2,0	5,0	4,0	0,3	0,2
Споры	1,8	1,7	1,9	3,1	9,3	8,5
Актиномицеты:						
мезофильные	2,9	23,4	0,5	0,5	0,6	0,6
термофильные	0,2	0,6	0,6	3,3	1,8	1,3

Таблица 13

Динамика температуры в разогревающемся навозе, °С

Навоз	Срок с момента закладки, дни									
	3	4	5	12	16	20	24	28	32	36
Конский	5	50	75	55	25	24	22	20	18	17
Овечий	5	35	50	65	40	20	18	18	17	16
Крупного рогатого скота	5	15	25	35	42	40	30	20	10	10

Если атмосфера насыщена диоксидом углерода, то диссоциация карбоната аммония не происходит. Это способствует сохранению аммиака, так как после диссоциации он улетучивается из навоза. Таким образом, при рыхлом состоянии навоза потери азота сильно возрастают. Плотная укладка навоза способствует насыщению всей его массы CO_2, который образуется бактериями при разложении разных углеродсодержащих веществ.

При повышенной температуре распад мочевины и карбоната аммония усиливается, поэтому при горячем способе приготовления навоза потеря азота возрастает до 30%. Правильное приготовление навоза холодным способом резко снижает потери азота. Если вместо соломенной подстилки применяют торфяную, хорошо поглощающую аммиак, то потери снижаются до нескольких процентов.

В аммиак постепенно превращаются и другие содержащие азот соединения — гиппуровая и мочевая кислоты, а также белковые вещества. Все указанные соединения подвергаются микробиологическим трансформациям в начальный период созревания навоза. В аэробных условиях азот в навозе частично теряется вследствие нитрификации. Если аммиак окисляется до азотной кислоты, то она вымывается из поверхностных слоев навоза в более глубокие и там подвергается восстановлению денитрифицирующими бактериями. Нитриты, образующиеся при нитрификации, также могут реагировать с аминокислотами, и при этом выделяется свободный азот. Для уменьшения потерь азота в навоз рекомендуется вносить гипс, который, реагируя с аммиаком, дает нелетучий сульфат аммония.

Убыль сухого вещества при созревании горячего навоза достигает 40%, а холодного — 20—25%. При этом основные потери определяются разложением углеродсодержащих соединений. Распаду подвергаются пентозаны, пектиновые вещества, целлюлоза и другие соединения. Пентозаны и пектиновые вещества сбраживаются легче, чем целлюлоза и особенно лигнин. В процессе приготовления навоза соотношение C : N постепенно сужается.

Значительная часть растительных остатков и других компонентов навоза во время его созревания подвергается гумификации. Гумусовые соединения медленно минерализуются, вследствие чего азот (частично и фосфор) действует не только в первый год после внесения навоза, но и, в последующие по крайней мере два года.

Перевод животноводства на промышленную основу связан с применением бесподстилочного метода уборки экскрементов. Последние удаляют механическими или гидравлическими средствами, иногда самотеком. Жидкий навоз собирают в карантинные навозохранилища, при необходимости обезвреживают химическими средствами, затем перекачивают в основные навозохранилища.

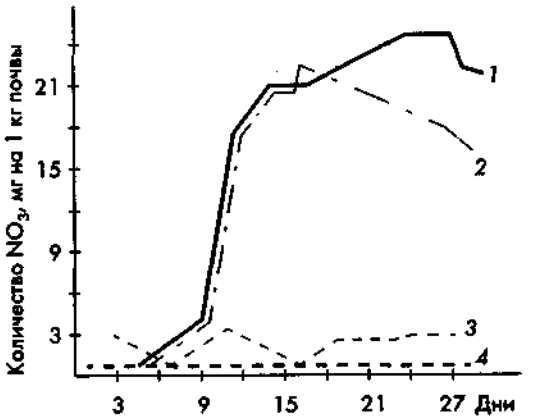


Рис. 65. Накопление нитратов в почве в зависимости от внесения удобрений с разным соотношением C : N:
1 — зеленая масса люцерны (C : N = 17,5 : 1);
2- клевер (C : N =16,4:1);
3 — без органических удобрений;
4 — солома злаков (C : N = 82 : 1) (по: Д. Хатчингс)

Перед использованием жидкого навоза на удобрение его разделяют на твердую и жидкую фракции. Твердую часть пускают на удобрение после компостирования, жидкую неразбавленную массу также применяют как удобрение, но во вневегетационный период. Обычно жидкую фракцию навоза используют для удобрительно-увлажнительного полива во время вегетации растений при разбавлении водой в 2—10 раз.

В бесподстилочном навозе значительная часть азота (40—60%) содержится в форме аммиака. Поэтому при его использовании целесообразно применять ингибиторы нитрификации.

Скорость минерализации навоза в почве определяется рядом факторов, но при других благоприятных условиях она зависит в основном от соотношения в навозе C : N. Обычно навоз вызывает повышение урожая в течение двух-трех лет в отличие от азотных удобрений, которые не имеют последействия. Широко используют также зеленые удобрения, или сидераты. Это растительная масса, запахиваемая в почву. Она более или менее быстро минерализуется в зависимости от почвенно-климатических условий (рис. 65).

Солома. В последнее время солому также используют как органическое удобрение. Внесение соломы обогащает почву гумусом. Кроме того, в ней содержится около 0,5% азота и другие необходимые растениям элементы. При разложении соломы выделяется много диоксида углерода, что также благотворно действует на посевы.

Еще в начале XIX в. английский химик *Ж. Деви* указывал на возможность применения соломы как органического удобрения.

Однако до последнего времени запахивать солому не рекомендовали. Это обосновывали тем, что в соломе велико соотношение C : N (около 100 : 1), и ее заделка в почву вызывает биологическое закрепление минерального азота. Растительные материалы с меньшим соотношением C : N такого явления не вызывают. Растения, посеянные после запашки соломы, испытывают недостаток азота. Исключение составляют лишь бобовые культуры.

Недостаток азота после заделки соломы можно компенсировать внесением азотных удобрений из расчета 6—7 кг азота на 1 т запаханной соломы. При этом положение не вполне исправляется, так как солома содержит некоторые вещества, токсичные для растений. Требуется некоторый период времени для их детоксикации, которую проводят микроорганизмы, разлагающие эти соединения.

Проведенная в последние годы экспериментальная работа позволяет дать рекомендации по устранению неблагоприятного влияния соломы на сельскохозяйственные культуры.

В условиях северной зоны солому в виде резки целесообразно запахивать в верхний слой почвы. Здесь в аэробных условиях все токсичные для растений вещества довольно быстро разлагаются. При мелкой запашке через один-полтора месяца происходит разрушение вредных соединений и начинает освобождаться биологически закрепленный азот. На юге, особенно в субтропической и тропической зонах, разрыв времени между заделкой соломы и посевом может быть минимальным даже при глубокой запашке. Здесь все неблагоприятные факторы перестают действовать быстро.

При соблюдении приведенных рекомендаций почва обогащается органическим веществом и в ней активизируются мобилизационные процессы, в том числе деятельность азотфиксирующих микроорганизмов. В зависимости от ряда условий внесение 1 т соломы приводит к фиксации 5—12 кг молекулярного азота.

Торф. Нередко удобрением служит низовой торф. Он обладает огромной влагоемкостью (полная влагоемкость достигает 90%). В сухом веществе такого торфа содержится 80—93% органических соединений, три четверти которых — гумусовые и лигниноподобные вещества. Содержание органического азота в низовом торфе колеблется в пределах 1,5—4%, причем минерализуется микроорганизмами он крайне медленно. Большой экспериментальный материал свидетельствует о том, что даже огромные дозы низового торфа (100—200 т/га) не дают существенного эффекта.

Компост. Некоторые хозяйства стремятся полностью перейти на «биологическое» земледелие, отказавшись от использования минеральных удобрений и химических средств защиты растений. Это

связано с охраной окружающей среды. Однако для высоких урожаев требуются достаточно высокие дозы органических удобрений.

В настоящее время для получения органических удобрений используют метод компостирования различных органических отходов. Отходы, поддающиеся компостированию, варьируют от городского мусора, представляющего собой смесь органических и неорганических компонентов, до более гомогенных субстратов, таких, как навоз, отходы растениеводства, сырой активный ил и нечистоты.

По современным представлениям, компостирование — это экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодеградации смешанной популяцией микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности (по К. Форстеру и Д. А. Вейду, 1990). В процессе биодеградации органический субстрат претерпевает физические и химические превращения с образованием стабильного гумифицированного конечного продукта. Этот продукт представляет ценность для сельского хозяйства и как органическое удобрение, и как средство, улучшающее структуру почвы.

Процесс компостирования представляет собой сложное взаимодействие между органическими отходами, микроорганизмами, влагой и кислородом. В отходах обычно существует своя эндогенная смешанная микрофлора. Микробная активность возрастает, когда содержание влаги и концентрация кислорода достигают необходимого уровня. Конечный продукт, компост, содержит наиболее стабильные органические соединения, продукты распада, биомассу мертвых микроорганизмов, некоторое количество живых и продукты химического взаимодействия этих компонентов.

Компостирование представляет собой динамический микробный процесс, протекающий благодаря активности сообщества микро- и макроорганизмов различных групп:

- микроорганизмы — бактерии, в том числе актиномицеты; мицелиальные грибы и дрожжи; водоросли; вирусы;
- микрофауна — простейшие;
- высшие грибы;
- макрофауна — двупарноногие многоножки, клещи, ногохвостки, черви, а также муравьи, термиты, пауки и жуки.

В процессе компостирования принимает участие множество видов *бактерий* — более 2000 и не менее 50 видов грибов. Эти виды можно подразделить на группы по температурным интервалам, в которых каждая из них активна. Для психрофилов предпочтительна температура ниже 20 °С, для мезофилов — от 20 до 40 °С и для термофилов — свыше 40 °С. На последней стадии компостирования преобладают, как правило, мезофилы. Хотя количество бактерий в компосте очень велико — 10^8—10^9 клеток на грамм влажного компоста, из-за малых размеров (1—8 мкм) они составляют менее половины общей микробной массы. *Актиномицеты* растут гораздо медленнее, чем большинство бактерий и грибов, и на ранних стадиях компостирования не составляют им конкуренции. Они более заметны на после-

дующих стадиях процесса компостирования. Их численность ниже численности бактерий и составляет величину порядка 10^5—10^6 клеток на грамм влажного компоста.

Грибы играют важную роль в деструкции целлюлозы, и состояние компостируемой массы должно регулироваться таким образом, чтобы оптимизировать активность этих организмов. Важным фактором является температура, так как грибы погибают, если она поднимается выше 55 °С. После понижения температуры они вновь распространяются из более холодных зон по всему объему компостируемой массы.

Вирусы — ультрамикроскопические облигатные паразиты, вызывающие заболевания растений, животных и человека. Если зараженный растительный материал подвергается компостированию, количество патогенных вирусов в нем резко снижается преимущественно благодаря температурно-временным воздействиям.

Простейшие — одноклеточные организмы, питающиеся бактериями, водорослями и другими простейшими. Полагают, что именно простейшие управляют численностью бактериальной популяции.

После того как достигнут максимум температуры, компост, остывая, становится доступным для широкого ряда почвенных *животных*. Они поедают других животных, их экскременты и органические остатки. Многие почвенные животные вносят большой вклад в переработку компостируемого материала благодаря его физическому дроблению. Эти животные также способствуют перемешиванию разных компонентов компоста. Ткани организмов, принадлежащих макрофауне, богаты азотом и легко разрушаются. Масса этих организмов представляет собой непрерывно пополняемый и опустошаемый запас соединений азота.

Органические отходы. Органические отходы промышленного, сельскохозяйственного или коммунального происхождения представляют собой смесь Сахаров, белков, жиров, гемицеллюлозы, целлюлозы, лигнина и неорганических солей в широком интервале концентраций:

- водорастворимые соединения (сахара, аминокислоты и др.) — 2-30%;
- соединения, растворимые в эфире и спирте (жиры, масла, воски), — 1—15%;
- белок — 5—40%;
- гемицеллюлоза —10—30%;
- целлюлоза — 15—60%;
- лигнин — 5—30%;
- зола — 5—25%.

Состав фракций растительных отходов зависит от возраста растения, его типа и среды. Свежее растительное сырье содержит много водорастворимых веществ, белков и солей. При увеличении возраста соли возвращаются в почву и низкомолекулярные соединения превращаются в более высокомолекулярные, особенно гемицеллюлозу, целлюлозу и лигнин. Состав отходов животноводства зависит от типа животного и от его корма. В процессе компостирования простые низкомолекулярные соединения легко

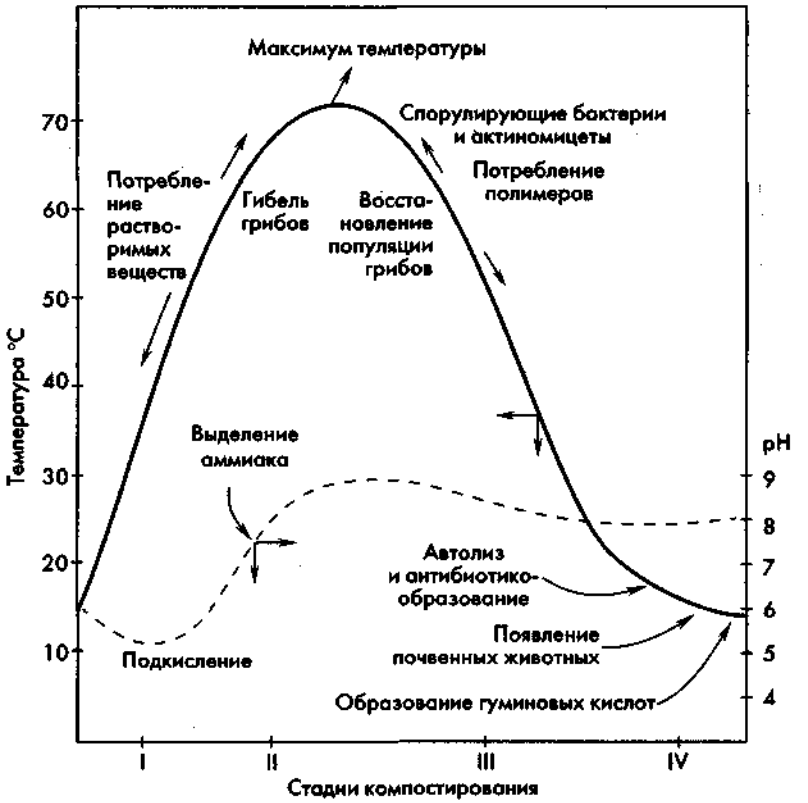


Рис. 66. Динамика температуры *(сплошная линия)* и pH *(пунктирная линия)* в куче органических отходов в процессе компостирования (по: К. Ф. Форстер и Д. А. Дж. Вейз)

метаболизируются микроорганизмами, а полимерные соединения — после их гидролиза экзоферментами.

Когда органические отходы складывают для компостирования, то благодаря изолирующему влиянию субстрата сохраняется теплота, образующаяся вследствие биологической активности, и температура повышается (рис. 66). Процесс компостирования можно разбить на четыре стадии: мезофильная, термофильная, остывание, созревание.

В начальной мезофильной стадии микроорганизмы, присутствующие в отходах, начинают быстро размножаться, температура поднимается до 40 °С, среда подкисляется за счет образования органических кислот. При увеличении температуры выше 40 °С начинают гибнуть исходные мезофилы и преобладать термофилы. Это поднимает температуру до 60 °С, при которой грибы становятся неактивными. Далее процесс продолжается спорообразующими бак-

териями и актиномицетами; pH среды повышается. В течение термофильной фазы наиболее легко разлагаемые субстраты, такие как сахара, крахмал, жиры, белки, быстро потребляются, и скорость процесса начинает падать после того, как в него вовлекаются более устойчивые субстраты. При этом скорость тепловыделения становится равной скорости теплопотери, что соответствует достижению температурного максимума. Затем компост вступает в стадию остывания. В течение стадии остывания pH медленно снижается, но среда остается щелочной. Термофильные грибы из более холодных зон вновь захватывают весь объем компостируемой массы и вместе с актиномицетами потребляют трудноразложимые полисахариды, гемицеллюлозу и целлюлозу, разрушая их до моносахаридов, которые потом могут быть использованы широким кругом микроорганизмов.

Первые три стадии компостирования — мезофильная, термофильная, остывания протекают очень быстро, за дни или недели, в зависимости от используемой системы компостирования. Заключительная стадия — созревание, в течение которой потери массы и тепловыделения малы, длится несколько месяцев. В этой стадии происходят сложные реакции между остатками лигнина из отходов и белками отмерших микроорганизмов, приводящие к образованию гуминовых кислот. Конечная реакция компоста — слабощелочная.

Высокая температура является необходимым условием успешного компостирования, хотя при сильном ее повышении процесс биодеградации подавляется из-за ингибирования роста микроорганизмов. Однако температура порядка 60 °С необходима для борьбы с термочувствительными патогенными микроорганизмами. Поэтому следует поддерживать условия, при которых, с одной стороны, будут гибнуть патогенные микроорганизмы, а с другой — развиваться микроорганизмы, ответственные за деградацию биополимеров. Для этой цели рекомендуемой температурой является 55 °С.

Разложение органических отходов в процессе компостирования представляет собой динамический и сложный экологический процесс, в котором постоянно происходит изменение температуры и состава питательных веществ, меняется численность и видовой состав микроорганизмов. Скорость получения конечного продукта зависит от нескольких взаимосвязанных параметров. К ним относятся источники питания, дисперсность частиц, влажность, прочность структуры, аэрация, перемешивание, pH и размер кучи.

Желательно, чтобы сырье для компостирования содержало максимум органического материала и минимум неорганических остатков. Это особенно важно при переработке ряда отходов, например городского хозяйства, которые содержат существенные количества меди, никеля, свинца, цинка. Поэтому при работе с такими отходами желательно удалять стекло, металл, пластмассу и другие осколки в той степени, в какой это экономически выгодно. Если

для компостирования используют сырой активный ил, то во избежание загрязнения тяжелыми металлами, он должен быть получен в основном при переработке коммунальных, а не промышленных стоков.

Оптимизация процесса компостирования может быть обеспечена реализацией следующих параметров:

- *соотношение C : N в субстрате* — от 25 : 1 до 30 : 1;
- *размер частиц* — 12,5 мм для систем с перемешиванием принудительной аэрацией, 50 мм для компостных рядов в случае естественной аэрации;
- *влажность* — 50—60%;
- *свободный объем* — около 30%;
- *аэрация* — 0,6—0,8 $м^3$ воздуха в сутки на 1 кг летучей части твердых веществ или поддержание концентрации O_2 в пределах 10—18%;
- *температура* — 55 °С;
- *перемешивание* — без перемешивания, при периодическом переворачивании в простых системах и короткие периоды энергичного перемешивания в механизированных системах;
- *размеры кучи* — длина любая, высота 1,5 м и ширина 2,5 м для куч и компостных рядов с естественной аэрацией. В случае принудительной аэрации размеры кучи должны препятствовать перегреву.

Задача состоит в том, чтобы реализовать набор этих параметров в виде недорогих, но надежных систем для компостирования. Сложность оборудования и степень приближения к рекомендуемым значениям основных параметров сильно меняются от простых куч до сложных механических установок.

В простых системах (кучах) подготовленный материал складывают в виде длинных куч, называемых *компостными рядами,* вручную или с помощью самосвалов, погрузчиков.

Эти кучи имеют приблизительно треугольную форму в сечении, их высота и ширина могут быть различны, но рекомендуется, чтобы при естественной аэрации высота не превышала 1,5 м, а ширина — 2,5 м. Компостные ряды могут быть любой длины. Переворачивание материала в кучах осуществляется для его аэрации, уменьшения размера частиц и для того, чтобы весь материал подвергся действию высоких температур в термофильной стадии. Последнее достигается перемещением наружных частей кучи в ее середину при переворачивании. Переворачивание можно производить разными способами и с разной эффективностью.

Для того чтобы увеличить скорость биодеградации и исключить необходимость в переворачивании материала, в некоторых процессах осуществляется принудительная аэрация компостных рядов с помощью специальных воздуходувных каналов или труб, проложенных под компостным материалом. Аэрация куч может осуществляться либо за счет отсасывания воздуха из этих каналов, либо вдуванием в них воздуха.

Современные крупномасштабные системы по переработке городских отходов включают, как правило, стадии накопления твердых отходов, их предобработки, биодеградации и переработки конечного продукта. Собранные твердые отходы выгружают с грузовиков в глубокие бункеры или на специально подготовленные площадки, откуда их перемещают с помощью специальных транспортеров, ковшей или погрузчиков. Затем материал подвергается обработке, которая заключается в измельчении, отделении неже-

дательных или негодных к переработке примесей и регулировании влажности. Стадия биодеградации осуществляется с помощью компостных рядов или более сложных механизированных систем. Полностью механизированные системы по переработке городских отходов отличаются от компостных рядов с непрерывно перемешивающими устройствами и представляют собой закрытые силосы (башни), в которых за несколько дней осуществляется процесс активной биодеградации. Степень механизации и автоматизации силосов различна для разных проектов. Время пребывания компостируемого материала в силосах колеблется в пределах 4—20 дней, наиболее обычен срок 8 дней.

Биодеградация органического материала при компостировании приводит к потере примерно 30—40% органического вещества в виде CO_2 и H_2O. Биодеградации подвергается только часть органического вещества, неразложенная фракция попадает в конечный продукт. Состав конечного продукта (компоста) варьирует в широких пределах и в основном отражает состав использованного органического сырья. Компост, сырьем для которого послужили городские отходы, содержит меньше органических веществ и питательных веществ для растений, чем компост, полученный из сельскохозяйственных отходов. Компост из городских отходов содержит также определенное количество тяжелых металлов, уровень которых следует контролировать, чтобы предупредить накопление токсичных веществ в почве.

Каковы преимущества компостирования? Известно, что внесение сырых органических отходов в любую экосистему может создать серьезные проблемы либо из-за их высокой потребности в O_2, либо из-за выделения NH_3. Компостирование позволяет с помощью биологического окисления получать стабильные продукты. В отличие от сырых отходов гумифицированные продукты при внесении их в экосистему не вызывают больших нарушений экологического равновесия. При компостировании достигаются температуры, при которых погибают патогенные микроорганизмы (в том числе вредители растений), гельминты, сорняки и их семена. Компост представляет собой в первую очередь средство для улучшения структуры почвы и в определенной степени органическое удобрение. При внесении компоста в почву он минерализуется, выделяя основные питательные вещества для растений, источники N, P, K, микроэлементы. Питательные вещества выделяются из компоста медленнее, чем из легкорастворимых минеральных удобрений, следовательно, действие компоста может длиться в течение нескольких лет. Установлено, что количество основных питательных веществ, которые становятся доступными в год внесения компоста, составляет по азоту — 25%, по фосфору — 100%, по калию — 30%. И наконец, следует отметить здравоохранительный аспект процесса компостирования. Известно, что большинство органических отходов человека и животных (нечистоты, сырой и даже сброженный

активный ил, отходы боен, навоз и подстилка сельскохозяйственных животных, твердые отходы) содержат патогенные микроорганизмы. При компостировании выживанию патогенных микроорганизмов препятствует в первую очередь воздействие высокой температуры. Температуры порядка 55—60 °С, действующие от нескольких минут до нескольких дней, в основном эффективны — при этом большинство возбудителей болезней и паразитов погибает.

Таким образом, компостирование отходов является способом гигиенического удаления органических отходов, снижения их патогенности и получения полезного продукта, внесение которого в почву обеспечивает ее питательными веществами, снижает ее засоление, повышает стабильность почвы и способность к удержанию влаги.

Освещая вопросы компостирования органических отходов, нельзя не упомянуть о таком органическом материале, как солома. Известно, что интенсивное производство зерна приводит к образованию огромных количеств соломы, требующей удаления. Во многих странах для ликвидации избытка соломы применяют сжигание соломы и стерни на поле. Однако специалисты в области охраны окружающей среды все в большей степени обеспокоены сопутствующим сжиганию риском загрязнением атмосферы газом, вредом, наносимым фауне и флоре, потерей почвой питательных веществ. В то же время запахивание соломы в почву приводит к значительному снижению урожайности сельскохозяйственных культур. Последнее связано с тем, что запаханная в почву солома подвергается анаэробной биодеградации с образованием ряда фитотоксических соединений, таких как уксусная, пропионовая и масляная кислоты. Эти кислоты образуются при разложении целлюлозы, содержащейся в соломе. Вредное влияние фитотоксинов проявляется только тогда, когда прорастающие корни приходят в тесный контакт с соломой. При этом оказалось, что основным ингибитором роста растений является уксусная кислота, которая даже в минимальном количестве может отрицательно влиять на рост корней. Следует, однако, подчеркнуть, что снижение урожайности зерновых культур при внесении соломы в почву объясняется не только образованием фитотоксических соединений, но и иммобилизацией азота почвы микроорганизмами. В настоящее время предложен ряд способов, позволяющих снизить фитотоксичность соломы. Одним из них является внесение в пашню целлюлозолитических грибов для ускорения процесса биодеградации соломы в почве путем их разбрызгивания (рассева) в момент запахивания соломы. В этом случае токсичный уровень уксусной кислоты будет достигнут скорее и, следовательно, она будет раньше потреблена почвенными микроорганизмами, так что к моменту осеннего сева зерновых влияние фитотоксинов будет сниже-

но. Следовательно, необходимо получение активного штамма целлюлозолитического гриба, обладающего наибольшей скоростью биодеградации соломы. Грибной препарат должен сохранять целлюлозолитическую активность при высушивании и длительном хранении. Его нужно вносить в солому в больших количествах для обеспечения максимально возможной степени биодеградации, чтобы в почве к моменту сева присутствовало как можно меньше фитотоксинов.

15.3. Минеральные удобрения

Влияние минеральных удобрений на микроорганизмы почвы и ее плодородие. Внесение в почву удобрений не только улучшает питание растений, но и изменяет условия существования почвенных микроорганизмов, также нуждающихся в минеральных элементах.

При благоприятных климатических условиях количество микроорганизмов и их активность после внесения в почву удобрений значительно возрастают. Усиливается распад гумуса, увеличивается мобилизация азота, фосфора и других элементов.

Ранее считали, что длительное применение минеральных удобрений приводит к катастрофической потере гумуса и ухудшению физических свойств почвы. Однако экспериментальные материалы, полученные в МСХА, этого не подтвердили. Так, на дерново-подзолистой почве был заложен многолетний опыт с разной системой удобрения. На делянки, где применяли минеральные удобрения (NPK), в среднем за год вносили 36,9 кг азота, 43,6 кг P_2O_5 и 50,1 кг K_2O на 1 га. В почву, удобряемую навозом, его вносили ежегодно по 15,7 т/га. Через 60 лет был проведен микробиологический анализ опытных делянок.

В таблице 14 приведены данные исследования почвы этих делянок, которая все время находилась под паром, чтобы исключить влияние поступающих в нее растительных остатков. Такая почва оказывается бедной сапротрофными микроорганизмами, так как в нее поступает ограниченное количество органических веществ, незначительно развиваются сорняки и цианобактерии.

После применения минеральных удобрений активизируется деятельность бактерий. При наличии минерального азота легче разлагается и используется микроорганизмами гумус. Внесение минеральных удобрений вызывает некоторое снижение численности актиномицетов и увеличение грибного населения, что может быть следствием сдвига реакции среды в кислую сторону в результате внесения физиологически кислых солей: актиномицеты плохо переносят подкисление, а размножение многих грибов ускоряется в более кислой среде.

Таблица 14

Влияние удобрений на микроорганизмы парующей дерново-подзолистой почвы (средние данные за лето)

Удобрение	Гумус[1], %	$pH_{сол}$	Общее число микроорганизмов	Актиномицеты	Грибы
			тыс. на 1 г почвы		
—	1,08	3,8	594	117	15,0
NPK	1,35	3,6	1246	61	23,6
Навоз	1,81	4,5	2297	250	30,0

[1] В исходной почве содержалось 2,2% гумуса.

Как видно из таблицы, минеральные удобрения хотя и активизируют деятельность микроорганизмов, уменьшают потери гумуса. Навоз, как и следовало ожидать, оказывает благоприятное действие на все группы сапротрофного микронаселения почвы.

Таким образом, за 60 лет в паровавшей почве содержание гумуса уменьшилось, но в удобрявшейся почве его потери меньше, чем в неудобренной. Это можно объяснить тем, что минеральные удобрения способствуют развитию в почве автотрофных микроорганизмов (преимущественно водорослей) и, как следствие, некоторому накоплению в парующей почве органических веществ и в конечном счете гумуса. Навоз служит прямым источником образования гумуса, накопление которого в этих условиях вполне понятно.

На делянках с такой же системой удобрения, но занятых сельскохозяйственными культурами, положение еще более благоприятное. Пожнивные и корневые остатки здесь активизируют деятельность микроорганизмов и компенсируют расход гумуса. Так, контрольная почва в севообороте содержала 1,38% гумуса, получавшая NPK — 1,46, а унавоженная — 1,96%.

Следует отметить, что в удобряемых почвах после внесения навоза уменьшается количество фульвокислот и относительно увеличивается содержание менее подвижных фракций. В общем минеральные удобрения в большей или меньшей степени стабилизируют уровень гумуса в зависимости от количества оставляемых пожнивных и корневых остатков. Навоз процесс стабилизации еще более усиливает. Если его вносят в больших количествах, то содержание гумуса в почве возрастает.

Внесение в почву минеральных и органических удобрений усиливает интенсивность микробиологических процессов, в результате чего сопряженно увеличивается трансформация органических и минеральных веществ.

Характерным показателем активизации микробной деятельности под влиянием удобрений служит усиление «дыхания» почвы, т. е. выделения ею CO_2. Это результат ускоренного разложения органических соединений почвы, в том числе гумуса.

Внесение в почву фосфорно-калийных удобрений мало способствует использованию растениями почвенного азота, но усиливает деятельность азотфиксирующих микроорганизмов.

Иногда внесение в почву минеральных удобрений, особенно в высоких дозах, неблагоприятно сказывается на ее плодородии. Обычно это наблюдается на малобуферных почвах при использовании физиологически кислых удобрений. При подкислении почвы в раствор переходят соединения алюминия, токсичные для микроорганизмов почвы и растений.

Так, неблагоприятное действие минеральных удобрений было отмечено на легких малоплодородных песчаных и супесчаных подзолистых почвах Соликамской сельскохозяйственной опытной станции. В почву здесь ежегодно вносили N_{90}, P_{90}, K_{120}, навоз (два раза в три года, 25 т/га). Из расчета на полную гидролитическую кислотность была добавлена известь (4,8 т/га). По результатам опыта отмечено, что применение в течение ряда лет NPK существенно снижает численность микроорганизмов в почве. Не страдают лишь микроскопические грибы.

Внесение извести, особенно вместе с навозом, благотворно сказывается на сапротрофной микрофлоре. Изменяя pH почвы в благоприятную сторону, известь нейтрализует вредное действие физиологически кислых минеральных удобрений.

Влияние минеральных удобрений на урожай связано с зональным положением почв. Как уже отмечалось, в почвах северной зоны микробиологические мобилизационные процессы протекают замедленно. Поэтому на севере сильнее ощущается дефицит для растений основных элементов питания, и минеральные удобрения даже в малых дозах действуют более эффективно, чем в южной зоне. Это не противоречит известному положению о лучшем действии минеральных удобрений на фоне высокой окультуренности почвы.

Кратко остановимся на использовании **микроудобрений.** Некоторые из них, например **молибден,** входят в ферментную систему азотфиксирующих микроорганизмов. Для симбиотической азотфиксации необходим также **бор,** важный для формирования нормальной сосудистой системы растений, а следовательно, и успешного азотоусвоения. Большинство других микроэлементов (Cu, Mn, Zn и т. д.) в небольших дозах также усиливают интенсивность микробиологических процессов в почве.

Минеральные удобрения, внесенные в почву, подвергаются различным микробиологическим трансформациям. Рассмотрим трансформацию азотных, фосфорных и калийных удобрений почвенными микроорганизмами.

Трансформация соединений азота. Общий запас азота в почве довольно велик. В пахотном слое дерново-подзолистых почв он достигает 4 т, в черноземах — 6—15 т/га. Основная часть азотного фонда находится в составе гумуса. Небольшое количество азота входит в другие органические соединения почвы (аминокислоты, аминосахара, нуклеиновые кислоты и т. д.), а также в минеральные соединения, преимущественно соли аммония и азотной кислоты. До 50—60 кг азота на 1 га заключено в клетках микроорганизмов, населяющих пахотный слой почвы.

Указанных запасов могло бы хватить для получения очень высоких урожаев на многие десятки лет. Однако поскольку основная часть азота почвы входит в состав гумусовых соединений, трудно разлагаемых микроорганизмами, сельскохозяйственные культуры обычно испытывают недостаток данного элемента. Кроме того, допускать уменьшение содержания гумуса в почве нецелесообразно, так как это снижает плодородие почвы.

Потребности сельскохозяйственных культур в азоте приходится удовлетворять минеральными и органическими удобрениями. Минеральные соединения вносят в основном в форме аммонийных и нитратных соединений, а также мочевины.

Некоторое количество аммонийных удобрений, а также аммония, накапливающегося при минерализации органических соединений, закрепляется почвенными минералами (иллитом, монтмориллонитом, вермикулитом и др.). Ион аммония входит в кристаллическую решетку глинистых минералов. Частично аммонийные соединения закрепляются необратимо. Обычно в почвах необменно фиксированного аммонийного азота бывает в два—четыре раза больше, чем обменных и водорастворимых его форм.

Растения и гетеротрофные микроорганизмы могут использовать до половины поглощенного аммонийного азота в процессах биосинтеза. Как образующийся в процессе аммонификации, так и внесенный с удобрениями, этот азот не переходит в почве в стабильные соединения. Под влиянием нитрифицирующих бактерий аммиачный азот окисляется до азотной кислоты. Часть его (4 — 18%) при нитрификации превращается в закись азота (N_2O). В виде газообразного аммиака азот может теряться в значительных количествах лишь в щелочных почвах.

Процесс нитрификации особенно наглядно проявляется в парующей почве, где летом накапливаются нитраты. Под посевами сельскохозяйственных культур соли азотной кислоты практически отсутствуют, так как они потребляются растениями и микроорганизмами ризосферы. Ранней весной и осенью нитратов мало даже в парующих почвах. Это связано с тем, что в холодную погоду соли азотной кислоты довольно энергично потребляются психрофильными микроорганизмами, а жизнедеятельность нитрифицирующих бактерий при температуре ниже 8—10 °С проявляется очень слабо.

Следовательно, весной, когда в почве содержится мало минерального азота, целесообразно использовать азотные подкормки.

Д. Н. Прянишников показал, что нитраты и аммиак — равноценные источники азотного питания растений. Однако превращение солей аммония в азотную кислоту приводит к ряду нежелательных последствий. Так, нитраты не поглощаются почвенными коллоидами и могут вымываться из почвы, что особенно сильно проявляется в зонах повышенного количества осадков и на орошаемых почвах. Нитраты и нитриты могут также восстанавливаться бактериями и в виде газообразных продуктов теряться из почвы.

В почве возможна и «косвенная» денитрификация, когда потери азота происходят в результате некоторых химических реакций. Так, в кислой среде HNO_2, реагируя с аминокислотами, образует молекулярный азот. Этот процесс может быть представлен следующей схемой:

$$RCHNH_2COOH + HNO_2 \longrightarrow RCH_2COOH + H_2O + N_2$$

В кислой среде идет также саморазложение нитритов с образованием газообразных продуктов:

$$2HNO_2 \longrightarrow NO + NO_2 + H_2O$$
$$3HNO_2 \longrightarrow 2NO + HNO3 + H_2O$$

Возможно восстановление нитритов в почве при взаимодействии с органическими веществами, содержащими фенольные группы (в присутствии Fe^{+} или Mn^{2+}), с образованием N0 и N_20. При разнообразных микробиологических процессах в почве образуются оксимы (соединения с группой $=N-OH$). Они реагируют с нитритами, причем образуется N_20:

$$R_2C=N-OH + HNO_2 \longrightarrow R_2C=O + N_2O + H_2O$$

Таким образом, при восстановительных процессах, а также в некоторых химических реакциях из нитратов и нитритов могут образоваться N_2, N_2O, NO и NO_2. Некоторые из этих соединений, например NO_2, весьма реактивны. Поэтому газообразные потери азота из почвы происходят преимущественно в форме N_2 и N_2O. В почвенном воздухе всегда присутствует N_2O.

Вследствие отмеченных потерь, а также частичного биологического закрепления азотные удобрения используются сельскохозяйственными растениями не более чем на 40—50%.

Азот, закрепленный в микробных клетках, после их отмирания минерализуется и используется растениями. В общем убыль азота из почвы может быть весьма значительной. Так, в Великобритании на Ротамстедской опытной станции отмечено, что при ежегодном унавоживании (около 36 т/га) пахотной почвы в результате вымывания и денитрификации в условиях влажного климата теряется в среднем около 60% внесенного с навозом азота.

Денитрификация, вызываемая микроорганизмами, обусловливает ббльшие потери азота, чем вымывание его соединений из почвы. Потери от этого процесса возрастают по мере увеличения в почве содержания нитратов. Повышенная влажность почвы усиливает восстановительные процессы и потери азота.

Свидетельством тому, что денитрификация связана с наличием в почве солей азотной кислоты, служит один из опытов *П. М Смирнова,* в котором в пойменную почву вносили аммонийную $[(NH_4)_2SO_4]$ и нитратную $[Ca(NO_3)_2]$ соли. Одну партию почвы сохраняли в аэробных условиях, периодически аэрируя до нормального уровня (19—22% O_2), другую помещали в анаэробные условия, что достигалось заменой ее газовой фазы на гелий. В аэрируемую почву вносили 27 мг азотных солей на 1 кг почвы, в анаэробно хранящуюся — 40 мг.

Анализ, проведенный через два месяца, показал, что потери азота из почв, удобренных нитратами, были значительно больше, чем в случае аммонийных удобрений (табл. 15).

На состав выделяющихся газов влияет форма азотного удобрения. Так, при внесении в почву $(NH_4)_2SO_4$ и нитрификации этой соли выделяется больше NO_2 и меньше N_2, чем при восстановлении $Ca(NO_3)_2$. В анаэробных условиях часть NO_2 редуцируется до N_2.

Таблица 15

Потери азота (%) при удобрении почв различными азотными удобрениями в зависимости от аэрации

Условия	$NH_4)_2SO_4$	$Ca(NO_3)_2$
Анаэробные	14,0	79,8
Аэробные	8,9	39,6

Потери азота из удобрений существенно уменьшаются при использовании гранулированных и медленно растворяющихся удобрений. К ним относятся уреаформ (конденсат мочевины с формальдегидом), гранулированная мочевина с оболочкой из элементарной серы, уреа-зет (конденсат мочевины с ацетальдегидом), изобутилен-диуреа и т. д.

Гранулированные удобрения имеют меньший контакт с почвенной микрофлорой, деятельность которой подавляется дополнительно вносимыми с такими удобрениями веществами (формальдегид, сера и т. д.). Однако указанная форма удобрений ограничивает их использование из-за высокой цены и замедленного действия на растения. Хороших результатов можно достигнуть приближенным к посеву или дробным внесением удобрений и т. д.

Большое внимание сейчас уделяют применению веществ, задерживающих процесс нитрификации. Их использование особенно целесообразно при внесении в почву больших доз удобрений (аммонийных и мочевины). К подобным соединениям относят ряд цианидов, нитро- и галла-анилиды, производные фенолов, хинолинов, хлорпиридины, пиримидины и др. Применение небольших доз этих соединений селективно подавляет нитрификацию, не угнетая в то же время другие микробиологические процессы в почве.

Азотные соединения в форме нитратов частично вымываются в грунтовые воды, которые используются для водоснабжения. В нашей стране установлена предельно допустимая концентрация нитратов (ПДК) в питьевой воде, равная 10 мг/л. В странах Западной Европы и США эта норма значительно выше (45—50 мг/л).

Следует отметить опасность накопления нитратов в пище и кормах. В зерне нитраты, как правило, не аккумулируются, за исключением зерна ячменя. В овощах и фруктах, как и в зеленых кормах, концентрация нитратов иногда бывает весьма высокой. Пища и корма с высоким содержанием нитратов вызывают отравления. В связи с этим следует воздерживаться от неоправданно высоких доз азотных удобрений.

Рассмотрим **баланс азота в земледелии.** Минеральные азотные удобрения позволяют быстро повышать урожаи, действуя практически в год внесения в почву. Под зерновые культуры в среднем вносят около 30 кг/га минеральных азотных удобрений в год. На 1 га пашни приходится также 14 кг азота в форме органических удобрений. Как было отмечено выше, действие навоза растягивается обычно на три года. В первый год минерализуется не более 25% органических азотсодержащих соединений. Примерно аналогичным образом используются корневые и пожнивные остатки бобовых культур.

Из общего фонда азота зерновые на площади в 1 га получают 6 кг азота. Свободноживущие азотфиксаторы связывают на 1 га пашни около 20 кг азота. Допустим, что биологически закрепленный азот в первый год используется на 15%. В небольших количествах в почву поступает азот с высеваемыми семенами и осадками. Изложенные соображения позволяют сделать примерный расчет использования посевом зерновых культур азота из всех поступлений (табл. 16).

Таким образом, из внесенных на 1 га под зерновые культуры 80 кг азота растения усваивают около 30 кг. Примерно такое же количество азота остается в почве — это азот органических удобрений и корневых остатков, а также азот, ассимилированный микроорганизмами. Остальные 20 кг теряются в процессе денитрификации (около 15 кг) и вымываются из почвы (около 5 кг).

Таблица 16

Количество азота, поступающего в почву под зерновые культуры и усваиваемого ими, кг/га

Форма азота	Внесено азота, кг/га	Используется посевом		Остается и закрепляется в почве	
		%	кг/га	%	кг/га
Минеральные удобрения	30	45	13,5	20	6,0
Органические удобрения	14	25	3,5	45	6,3
Биологический азот бобовых растений	6	25	1,5	50	3,0
Биологический азот свободноживущих микроорганизмов	20	15	3,0	60	12,0
Азот семян	6	80	4,8	10	0,6
Азот осадков	5	40	2,0	—	—
Итого	*81*		*28,3*		*27,9*

Для среднего урожая зерновых культур требуется около 70 кг доступного азота. Его поступления, как отмечалось, дают лишь 30 кг, остальные 40 кг берутся из почвы, в основном из минеральных форм азота, образующихся при распаде гумуса.

Большое число опытов свидетельствует, что наши пахотные почвы потеряли существенное количество гумуса — иногда до 30% и более. Это снизило потенциальное плодородие окультуренных почв. Часть минерализованного из гумуса азота вымывается из почвы и теряется в виде газообразных веществ в результате химических и микробиологических процессов. Такие потери предположительно достигают 15 кг/га. Следовательно, из поступающих в почву источников азота и в результате распада гумуса потери достигают 35 кг азота на 1 га.

Чтобы восполнить или хотя бы не терять имеющиеся запасы гумуса, необходимо использовать повышенные дозы минеральных и органических удобрений, а также большое внимание уделять культурам бобовых растений, которые не только обогащают почву азотом, но и дают корм, богатый белком.

Трансформация соединений фосфора и калия. Запас **фосфора** в почве зависит от материнской горной породы, на которой данная почва формировалась. Обычно в материнских породах фос-

фор содержится в форме фторапатита $Ca_5F(PO_4)_3$ и гидроапатита $Ca_5OH(PO_4)_3$. При разрушении указанных минералов образуются соединения ортофосфорной кислоты.

В кислых почвах накапливаются фосфаты полуторных окислов ($AlPO_4$, $FePO_4$), а также основные соли железа и алюминия [$Fe_2(OH)_3PO_4$, $Al_2(OH)_3PO_4$], малодоступные растениям. В почвах, насыщенных основаниями, образуются фосфаты кальция $CaHPO_4$, $Ca_3(PO_4)_2$, постепенно растворяющиеся слабыми кислотами, что способствует более легкому усвоению фосфора растениями. При известковании кислых почв часть фосфатов полуторных окислов превращается в фосфаты кальция и магния, более доступные для растений.

Трансформация минеральных соединений горной породы микроорганизмами и растениями привела к превращению значительной их части в органические вещества. В подзолах, дерново-подзолистых, серых лесных почвах и черноземах 30,45% фосфора содержится в форме органических соединений. В каштановых почвах органических фосфатов меньше — около 25%, а в сероземных лишь около 14%.

Основная масса органических соединений фосфора входит в состав гумуса. Большая часть органического фосфора (до 60%) представлена фосфатами инозита. На долю нуклеиновых кислот приходится до 10% органических соединений фосфора, на глицерофосфаты и другие простые эфиры — 5—10, на фосфолипиды — 0,45—2,6 %. Из отмеченных соединений наиболее стабильны инозитфосфаты. Легче разлагаются микроорганизмами нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты, фосфаты, глицеро- и сахарофосфаты, а также полифосфаты.

Содержание фосфора (P_2O_5) в почвах колеблется от 0,03 до 0,2 %, а общий запас фосфора в пахотном слое составляет от 1 до 9 т/га. По примерным подсчетам, около 15 кг фосфора на 1 га может содержаться в клетках микроорганизмов.

Основная масса минеральных и органических соединений фосфора в почве недоступна высшим растениям, поэтому для получения высоких урожаев вносят минеральные фосфорные удобрения. Микробиологические процессы, происходящие в почве, способствуют переводу в доступное для растений состояние минеральных и органических соединений фосфора. Их разрушение — неспецифический процесс, который способны вызывать разнообразные формы микроорганизмов.

Некоторые минеральные соединения фосфора переходят в раствор под действием кислых продуктов метаболизма бактерий или водородных ионов кислых почв (например, подзолов). Даже диоксид углерода, выделяемый микроорганизмами при разложении органических соединений, переводит в растворе двух- и трехкальциевые фосфаты в водорастворимый монокальциевый фосфат:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 2H_2CO_3 = 2CaHPO_4 + Ca(HCO_3)_2$$

Поглощенная фосфорная кислота может быть вытеснена и другими анионами. Поэтому когда на парующих почвах при нитрификации повышается содержание азотной кислоты, то несколько увеличивается и количество подвижных фосфатов.

Микробиологическая деструкция отдельных минеральных соединений фосфора происходит неодинаково легко. По возрастающей трудности разложения может быть намечен следующий ряд:

$$FePO_4 < AlPO_4 < \text{Апатит} < \text{Фосфорит} < Ca_3(PO_4)_2$$

Растворяющее действие микроорганизмов на фосфаты не всегда связано с подкислением среды. *Г. С. Муромцев* и *В. Ф. Павлова* установили, что даже фосфаты алюминия и железа могут растворяться различными бактериями, грибами и актиномицетами, продукты метаболизма которых связывают катионы фосфатов в недиссоциирующие хелатные комплексы.

В анаэробных условиях на затопляемых рисовых полях снижается окислительно-восстановительный потенциал, поэтому окисное железо восстанавливается в закисное. При этом происходит освобождение фосфорного остатка:

$$3FePO_4 \longrightarrow Fe(PO_4)_2 + PO_4^{3-}$$

Для ускорения минерализации органических соединений фосфора предложен препарат фосфоробактерин, эффективность которого рассмотрена в главе 17.

Калий в почве находится в виде минеральных соединений, причем в основном в алюмосиликатных минералах. Из первичных минералов, содержащих калий, широко распространены калийные полевые шпаты (ортоклазы) и в меньшей степени калийные слюды (мусковит, биотит). Вторичные, или глинистые, минералы, образующиеся в процессах выветривания и почвообразования, относятся к гидроалюмосиликатам. В некотором количестве наряду с другими элементами в них содержится калий.

Общий запас калия довольно велик. В 1 га пахотного слоя песчаной дерново-подзолистой почвы содержится 15—20 т K_2O, в дерново-подзолистой суглинистой почве — 45—75, в черноземе — 60—75, сероземе — 75—90 т.

Калий, адсорбционно связанный на поверхности коллоидов (обменный), служит главным источником питания растений. Он составляет не более 0,5—1,5% общего содержания данного элемента в почве. Иногда доступного для растений калия не хватает.

Микроорганизмы играют существенную роль в повышении содержания в почве легкорастворимых соединений калия. Способ-

ность микроорганизмов разлагать алюмосиликаты была установлена в начале текущего века чешским ученым *И. Стоклазой* и польским микробиологом *К. Басаликом*. Позднее это явление было подтверждено другими исследователями.

Разлагать силикаты способны микроорганизмы разных групп. Многие из них продуцируют кислоты, обладающие большой деструктивной активностью. Особенно большая растворяющая способность у кислот, дающих комплексные и внутрикомплексные соединения с элементами, входящими в состав алюмосиликатов. Из этой группы отметим микроорганизмы — продуценты полигидроксиди-и-трикарбоновых кислот.

Большую роль в разрушении силикатов играют слизи, выделяемые микроорганизмами. Чаще всего это полисахариды, содержащие уроновые кислоты. Карбоксильные и фенольные группы указанных соединений реагируют с определенными элементами силикатов и образуют комплексные связи, что приводит к освобождению соответствующего вещества (в данном случае калия) из кристаллических решеток и переводу его в раствор.

При выветривании силикатов наблюдается биогенное содообразование. Показано, что нефелин и плагиоклаз сильно разрушаются под влиянием кислот, а кварц — под действием щелочей. Следовательно, распад минералов может идти под влиянием разных факторов.

Для усиления распада алюмосиликатов в почве предложен препарат «силикатных» бактерий.

Приведем некоторые данные, относящиеся к балансу фосфора и калия. С урожаем сельскохозяйственных культур выносится менее половины массы фосфора, внесенного с минеральными и органическими удобрениями. Доступность большинства соединений фосфора для растений ограничена. Даже хорошо растворимый в воде суперфосфат при применении вразброс усваивается на 15%, при рядковом внесении — в полтора-два раза больше. Фосфорные соединения к тому же неравномерно распределяются по территории пашни. Поэтому лишь около 22% пашни содержит повышенное количество P_2O_5, 36% характеризуется средней обеспеченностью фосфором, остальную площадь можно считать нуждающейся в фосфоре.

В отношении калия нужно иметь в виду, что некоторый дефицит этого элемента имеет лишь 10% пахотных земель. Около 22% среднеобеспечено калием и 68% содержит вполне достаточное его количество. Однако вклад в урожай калия, поступающего с удобрениями в пахотные почвы, весьма существен.

15.4. Химические средства защиты растений (пестициды)

Химические средства защиты урожая — ***пестициды*** — используются в сельском хозяйстве очень широко. В них входят **гербициды,** применяемые для борьбы с сорняками, **фунгициды,** защищающие растения от фитопатогенных грибов, **инсектициды** — средства защиты от вредных насекомых, **нематициды** — препараты против нематод и пр.

Широкое применение химических средств защиты урожая началось после 1939 г., когда швейцарский ученый *П. Мюллер* показал перспективность использования ДДТ [1,1-ди(4-хлорфенил)-2,2,2-трихлорэтана] при борьбе с вредными насекомыми. Открывались новые перспективы в борьбе с вредителями сельского хозяйства и с насекомыми — переносчиками болезней. Применение ДДТ в южных странах практически ликвидировало заболевание малярией, от которой гибли миллионы людей. Однако через некоторое время оказалось, что комары, переносящие заболевание, адаптировались к пестициду, и болезнь вновь приняла массовый характер. Тогда перешли на использование менее токсичного аналога ДДТ — метоксихлора ($C_{16}H_{15}C1_3O_2$).

В дальнейшем выяснилось, что ДДТ очень медленно разлагается в почве. Накапливаясь в почве и растениях, он оказывает вредное влияние на организм человека и животных. Помимо высокой стойкости, для ДДТ и ряда других пестицидов характерна способность концентрироваться в биологических цепях. В продуктах животного происхождения они накапливаются больше, чем в растительных тканях. Получены убедительные доказательства отрицательного воздействия даже малых количеств хлорорганических соединений на здоровье людей, и многие страны отказались от применения таких препаратов. В нашей стране проводят гигиеническую оценку новых пестицидов. Ежегодно публикуется также Список химических и биологических средств борьбы с вредителями, болезнями растений, сорняками и регуляторов роста растений, разрешенных для применения в сельском хозяйстве.

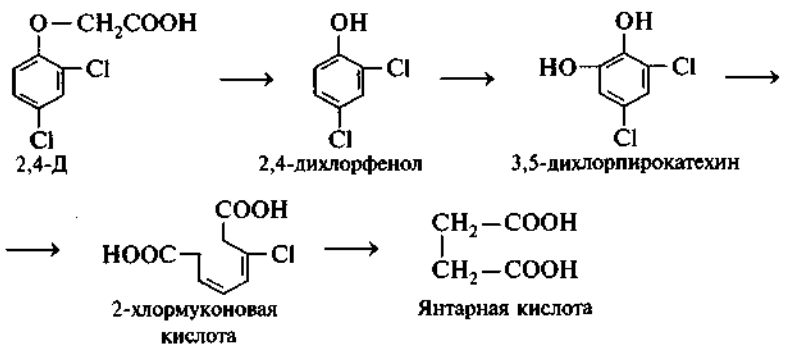
Неумеренное применение пестицидов загрязняет окружающую среду и приводит к гибели многих ценных представителей фауны и флоры. Попадая в водные бассейны, пестициды вызывают вымирание промысловых животных. Поэтому к применению пестицидов нужно относиться крайне осторожно и отбирать для практического использования в сельском хозяйстве наименее вредные и быстро разлагающиеся соединения.

Химическая природа пестицидов весьма разнообразна — они относятся более чем к 20 различным группам соединений. Наиболее широко используют феноксипроизводные, производные карбаминовой и тиокарбаминовой кислот, триазина, мочевины, урацила, аминов и т. д. Как инсектициды в больших количествах применяют фосфорорганические соединения, меньше — хлорорганические и производные карбаминовой кислоты. Находят применение и вещества, содержащие мышьяк и растительные яды, используют также соединения меди, ртути и т. д.

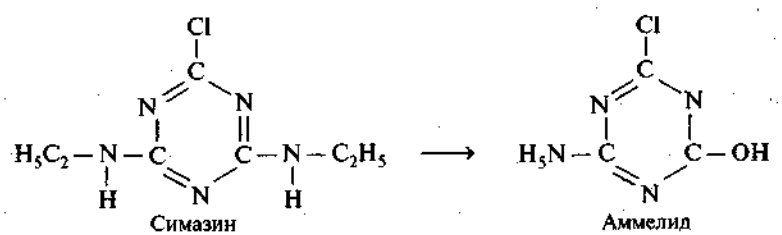
Трансформация пестицидов в почве. Рассматривая трансформацию пестицидов в почве, следует отметить, что на нее влияют химические и физические факторы, сорбция почвенными частицами и т. д. Однако главный фактор, вызывающий изменение пестицидов в почве, — микроорганизмы. Их жизнедеятельность заметно не угнетается дозами пестицидов, обычно используемыми в практике.

К химическим процессам, вызывающим превращения пестицидов, относится реакция гидролиза, которая часто катализуется глинистыми минералами. Быстрота микробиологического разрушения пестицидов в значительной степени зависит от их химического состава. Если в структуре пестицида присутствуют галогенные, нитро- или метальные группы, то замедляется процесс микробной деструкции. Важное значение имеет также положение галогена в феноксисоединениях. Наличие галогена в мета-положении замедляет распад пестицида; соединения, имеющие галоген в пара- и орто-положении, разрушаются легче.

Наиболее быстро разлагаются органические соединения фосфора, производные алифатических карбоновых кислот, карбаминовой и тиокарбаминовой кислот. Значительно медленнее подвергаются разрушению циклические соединения. Примером разрыва бензольного кольца может быть процесс деградации в последнее время запрещенного к применению гербицида 2,4-Д:



Гербицид симазин при отщеплении боковых группировок C_2H_5 превращается в аммелид, кольцо которого в дальнейшем разрывается:



Некоторые пестициды могут разлагаться лишь определенными видами микроорганизмов. Так, к микроорганизмам, использующим аллиловый спирт, относятся *Nocardia corallina, Azotobacter, Trichoderma vulgaris* и т. д.

Некоторые виды рода *Nocardia* способны ассимилировать в качестве источника углерода 4-феноксимасляную и 3,5-дихлорфеноксимасляную кислоты. Симазин может служить источником питания для ряда микроорганизмов. Так, к использованию симазина способны многие виды бактерий, например представители родов *Achromobacter, Mycobacterium* и т. д.

Пестициды и другие соединения неприродного происхождения (ксенобиотики), которые подвергаются полной минерализации (деградации) до CO_2 и H_2O, NH_3, сульфатов и фосфатов, обычно проходят весь метаболический путь и могут использоваться в качестве источника углерода и энергии членами микробного сообщества.

Трансформация соединений, разлагаемых в большей или меньшей степени, происходит обычно в результате кометаболизма. Иначе говоря, эти соединения не являются субстратом для роста микроорганизмов, но пока используются другие субстраты, организмы могут трансформировать их, хотя и медленно.

К соединениям, не поддающимся трансформации микроорганизмами, относятся синтетические полимеры и некоторые ароматические углеводороды. Каждый тип окружающей среды (почвы, водоемы и др.) обладает своей популяцией микроорганизмов. Даже в самых экстремальных условиях, при высокой температуре и низком pH, существуют определенные микроорганизмы. Однако именно благодаря разнообразию микробных сообществ, существующих в разнообразных, в том числе в экстремальных, условиях, а также вследствие гетерогенности природных популяций многие устойчивые ксенобиотики могут подвергнуться деградации.

Отдельный вид микроорганизмов может обладать катаболитной способностью катализировать трансформацию одного соединения в другое, но не иметь ферментативной системы для дальнейшей деградации. Это может быть восполнено вторым (и так далее) микроорганизмом с комплементарным катаболическим свойством, и тогда соединение будет полностью разложено. Синергическая деградация ксенобиотиков может также предотвратить появление токсичных интермедиатов, поскольку в ряде случаев частичное разложение приводит к возникновению более токсичных соединений, чем исходное вещество.

Благодаря существующим в микробных сообществах природным путям разрушения токсинов становится возможным использовать микроорганизмы для борьбы с загрязнением окружающей среды, особенно органическими соединениями. Далее будут рассмотрены различные способы, которыми можно воздействовать на микроорганизмы или их сообщества, чтобы катализировать необхо-

димые реакции, а также возможности генно-инженерных методов, позволяющих расширить круг применения таких биокатализаторов.

Огромный потенциал природных микробных сообществ в отношении деградации новых соединений стал очевиден уже в первых исследованиях по биодеградации. Так, было обнаружено, что при повторном попадании нового соединения в окружающую среду индукционный период, предшествующий биодеградации, уменьшается по сравнению с индукционным периодом при первом попадании. В течение времени, предшествующего деградации, популяция микроорганизмов адаптируется к данному соединению или в ней происходит отбор к его деградации. Это приводит к распространению популяции, которая может разлагать внесенное вещество, а затем достаточно долго (по меньшей мере три месяца) сохраняться после его исчерпания. Поэтому к моменту поступления следующих порций этого соединения микроорганизмы, способные к его деградации, уже присутствуют в популяции, следовательно, деградация начинается много раньше.

Добавление нового субстрата в окружающую среду может запускать механизм отбора, т. е. имеет место природное генетическое конструирование. В ответ на присутствие нового субстрата микроорганизмы, изначально не обладавшие способностью эффективно использовать данное соединение, «реконструируются» путем переноса генетической информации, что приводит к появлению необходимых каталитических функций и способности утилизировать новое соединение. Согласно исследованиям, проведенным на кафедре микробиологии МСХА, фунгицид *амистар (дезоксистробин)* интенсивно разлагается начиная с 60-го дня после его внесения в почву. По-видимому, только через 2 месяца в почве появились генетически «реконструированные» микроорганизмы, обладающие катаболической функцией деградировать фунгицид. Интересно отметить, что разлагающие амистар микроорганизмы, выделенные из почвы с этим фунгицидом, относились к родам *Nocardia, Arthrobacter* и *Mycobacterium*. Эти бактерии использовали его в качестве единственного источника углерода и энергии. Вероятно, в генетическом потоке между микроорганизмами происходит случайный обмен генетическим материалом. Однако как только происходит удачная перестановка, «новый» микроорганизм получает селективное преимущество. Это позволяет предполагать, что наблюдаемые в лаборатории обмены генетическим материалом между микроорганизмами, даже через межвидовые и межродовые барьеры, встречаются и в естественных условиях.

С тех пор как были опубликованы доказательства трансмиссибельности устойчивости к лекарственным препаратам среди энтеробактерий, стала очевидной возможность внехромосомных генетических элементов, или плазмид, в переносе генетической информации от одного микроорганизма к другому. Термин «катаболитическая плазмида» (деградативная, или метаболическая, плазмида) относится к тем репликонам, которые кодируют одну реакцию или многоэтапную последовательность реакций, приводящую к трансформации или минерализации субстрата. Присутствие катаболических плазмид в бактериальных сообществах придает микроорганизмам способность перераспределять между собой пул деградативных генов. Таким образом, плазмиды увеличивают биохимическую изменчивость популяции.

Генетическая информация, которую несут катаболические плазмиды, сможет расширить круг субстратов микроорганизма либо полным кодированием нового биохимического пути, либо дополнением и продолжением уже существующих путей, кодируемых генами хромосомы, либо объединением двух метаболических путей. Комплементация, таким образом, особенно важна, если существующие механизмы приводят только к частичной деградации соединения, в результате которой накапливаются потенциально токсичные метаболиты. Такие плазмиды могут также обеспечивать существование ферментов, катализирующих с большей субстратной специфичностью реакции ферментных систем, закодированных в хромосомах. Из почвенных бактерий были выделены плазмиды с молекулярной массой от 1,5 до более чем 900 тыс. п. н. (пар нуклеотидов). Плазмиды, используемые для конструирования векторов, обычно малы (2—10 000 п. н.), в то время как катаболические плазмиды относятся к наиболее крупным.

Хотя катаболические плазмиды были выделены из разнообразных бактерий, наиболее часто они идентифицируются у бактерий рода *Pseudomonas*. Значительная изменчивость катаболических плазмид в этом роде объясняет широкие катаболитические возможности, которыми обладают его представители. Физический размер этих плазмид позволяет им кодировать большое количество генов. Плазмида длиной 150 тыс. п. н. содержит ДНК в количестве, достаточном для кодирования приблизительно 150 генов.

Макроэволюционные события (воздействие факторов среды) приводят к инсерциям, делециям или перераспределению последовательности ДНК в плазмидах. Такие рекомбинационные события изменяют структурную целостность плазмиды и тем самым могут влиять на экспрессию ее генов путем их переориентации относительно промотора или удаления инерционно инактивированнных последовательностей. Рекомбинация между двумя фенотипически разными плазмидами может привести к сосуществованию обеих в интегрированном виде в одном организме. Этот процесс может преодолеть природный механизм исключения или несовместимости, которые обычно препятствуют сосуществованию в одном микроорганизме плазмид, принадлежащих к одной группе несовместимости. Таким образом, рекомбинационные события увеличивают метаболические возможности микроорганизма.

В настоящее время вполне определенно доказано, что имеет место перетекание генетического материала в плазмидные геномы и

обратно. Молекулярная природа плазмидной эволюции может служить объяснением разнообразия катаболитических фенотипов, связанных с одной группой плазмид. Известно, однако, что эти плазмиды обладают изменчивой структурой и существуют в стабильной форме только тогда, когда условия среды подавляют перенос генетического материала. Когда катаболическая функция связана с определенной плазмидой, дальнейшие структурные изменения плазмиды подавляются давлением отбора, в данном случае постоянным поступлением субстрата.

Пластичность катаболических плазмид обеспечивает механизм, с помощью которого обмен генетическим материалом может привести к «созданию» организма, способного к эффективной утилизации нового субстрата в фазе обогащения (т. е. в накопительной культуре), как это описано для микроорганизмов, использующих галогензамещенные жирные кислоты. В этих исследованиях шесть изолированных штаммов микроорганизмов, способных расти на хлоруксусной кислоте или пропионовой кислоте, обладали одной из плазмид размером от 150 до 290 тыс. п. н. Потеря плазмиды тремя из этих штаммов сопровождалась потерей способности к дегалогенированию, а также к росту на этом субстрате.

Из окружающей среды выделены микроорганизмы, способные разлагать ряд ксенобиотиков. Описаны генетические механизмы, которые способствуют перегруппировке координированно функционирующих генов и тем самым получению новых комбинаций катаболических функций, приспособленных к деградации молекул ксенобиотиков.

Общепринятые методы работы с рекомбинантной ДНК позволяют переносить генетическую информацию от одного микроорганизма к другому. Однако клонированная чужеродная ДНК содержит небольшое число генов, часто только один структурный ген, кодирующий белок, который катализирует определенную реакцию.

Учитывая генетические методы получения штаммов микроорганизмов, способных к детоксикации окружающей среды, значение общепринятых методов конструирования рекомбинантной ДНК ограничено. С этой целью более широко используется конструирование необходимых микроорганизмов при помощи природных генетических механизмов обмена. Очевидно, однако, что конструирование рекомбинантной ДНК может быть использовано для усовершенствования этих деградативных способностей.

Как указывалось, природная генетическая селекция может обеспечить способность микроорганизма к разложению специфического вещества. Однако подобные методики нуждаются в длительном периоде селекции (8—10 мес.) и основываются на случайном наборе генетического материала для получения желаемой катаболитной системы. Использование же методов рекомбинантной ДНК дает экспериментатору возможность соединять вместе определенные катаболические последовательности и контролировать экспрессию специфических генов. Применение методов клонирования для манипуляции подобными генами не может рассматриваться как панацея, обеспечивающая при всех обстоятельствах получение микроорганизмов для борьбы с любыми загрязнениями. Имеется ряд ограничений для использования методологии клонирования для получения «суперштамма»: 1) многоэтапность путей деградации; 2) ограниченные знания об индивидуальных катаболических путях; 3) опасность попадания сконструированных микроорганизмов в окружающую среду. Первое из перечисленных ограничений — сложная структура ксенобиотиков — требует многоэтапных путей для достижения полной их минерализации. Клонирование одного или двух генов в микроорганизме дает ему возможность разлагать вещество только в том случае, если новые генные продукты дополняют существующие катаболические системы. Лишь в этом случае клонирование расширит метаболические возможности микроорганизма. Применение этих методов, следовательно, позволит более направленно конструировать микроорганизмы. Однако следует подчеркнуть, что даже новейшая методология может использоваться только для получения микроорганизмов, способных расти на одном или двух субстратах. Часто эта способность зависит также от вредных мутационных событий, происходящих вследствие манипуляций in vitro, так как нашего понимания генетических механизмов еще недостаточно для направленного получения желаемых генетических форм. Это отражает недостаток генетических знаний об этих микроорганизмах, столь важных для процессов биологической очистки. Пока хорошо разработаны методы клонирования генов для *E. coli* и некоторых видов *Bacillus* и *Streptomyces,* а клонирование генов для *Pseudomonas* в настоящее время в основном состоит из манипуляций с катаболическими плазмидами или их частями.

Отсутствие знаний о метаболических путях также ограничивает применение методов рекомбинантной ДНК для ускорения прогресса в этой области. Без таких знаний невозможно идентифицировать гены, которые наиболее выгодно клонировать, особенно те, которые лимитируют набор субстратов или скорость их использования.

Предпосылкой использования методов рекомбинантной ДНК является существование векторных систем для предполагаемого микроорганизма-хозяина. Для ряда микроорганизмов, используемых для борьбы с загрязнениями, не существует хорошо охарактеризованных векторов. Один из возможных способов разрешения этой проблемы — это использование векторов с широким кругом хозяев, например вектора-плазмиды R 300B. Круг хозяев этой плазмиды включает *E. coli, Pseudomonas aeruginosa* и виды родов *Alcaligenes, Methylotropus, Salmonella, Serratia, Klebsiella, Proteus, Rhizobium* и др. Использование таких плазмид, однако, находится на ранней стадии, и одна из основных проблем этих систем — стабильность.

Стабильность системы микроорганизм — вектор особенно важна, если организм планируют вносить в окружающую среду.

Возможность использования сконструированных микроорганизмов для борьбы с загрязнениями окружающей среды еще недостаточно проверена вне лаборатории. Предложения по манипулированию природными изолятами с последующим возвращением их в окружающую среду важны, но не всегда осуществимы. Простое перемещение микроорганизма из окружающей среды и культивирование его в лаборатории, часто на относительно обогащенной питательной среде, проявится в селекции мутаций, которые приспосабливают микроорганизм к новым условиям. Возвращение микроорганизмов в исходную среду снабженным новой катаболической функцией, которая дает ему возможность использовать субстрат, недоступный остальному микробному сообществу, теоретически дает этому организму селективное преимущество. Однако окружающая среда будет содержать и другие источники углерода; свалки токсических отходов обычно содержат много химических веществ, включая и более легкоусвояемые. В таких условиях сконструированные микроорганизмы должны обладать высокой стабильностью, чтобы обеспечить более эффективное использование целевого вещества. Мало или ничего не известно о стабильности рекомбинантных штаммов в природной среде. Кроме того, исходная природная популяция, хорошо адаптированная к окружающей среде, подобна по своей конкурентноспособности генетически усовершенствованному штамму. Применение методов рекомбинантной ДНК для получения биологических агентов для борьбы с загрязнениями пока еще только начинается.

Не меньшее значение имеют биотехнологические методы и для борьбы с загрязнением окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. В настоящее время в связи со значительной интенсификацией добычи нефти и производства нефтепродуктов большие масштабы приобретает процесс отторжения земель из сельскохозяйственного использования. Согласно имеющимся данным, в настоящее время в России нуждается в рекультивации 1,2 млн га земель, пострадавших от различных типов загрязнений, включая и нефтяные. Нефть и нефтепродукты в эпоху научно-технического прогресса оказывают непрерывно возрастающее влияние на биосферу, они признаны приоритетными загрязнителями окружающей среды. Естественное самоочищение почв, вод и других природных объектов от нефтяного загрязнения является длительным процессом, продолжающимся от одного до нескольких десятилетий, в зависимости от природных условий региона, где произошел аварийный разлив нефти и осуществляется путем сложных процессов в биоценозах, содержащих ассоциации микроорганизмов, простейших и червей.

В процессах превращения углеводородов нефти в природе важную роль играют многие группы микроорганизмов, обладающих способностью использовать эти вещества в качестве единственного источника питания. Интенсивно разрабатываются методы рекультивации нефтезагрязненных почв, основанные на внедрении в естественные микробные ассоциации чистых или смешанных культур микроорганизмов-деструкторов в сочетании с приемами, повышающими их активность. С этой целью в последние годы рядом научно-исследовательских институтов и лабораторий осуществлялся поиск микроорганизмов-деструкторов нефти и проводилась разработка микробных биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных почвы и воды. В настоящее время проходят испытания ряд микробных биопрепаратов, предназначенных для деструкции углеводородов нефти на нефтезагрязненных почвах: деворойл 1, деворойл 2, деворойл (паста), инипол, фаерзайм, биоприн, деградойлас 81, ремедиаст, биопрепарат 670, нафтокс, нафтокс (жидкий), псевдомин и др. Последний препарат был разработан на кафедре микробиологии МСХА. Он обладает способностью к деградации растворенных и высокоэмульгированных нефтепродуктов, освобождение от которых можно считать пределом возможности механических способов очистки. За два месяца содержание нефти в почве снижается на 98%. Кроме того, бактерии рода *Pseudomonas,* на основе которых был создан препарат, хорошо приживаются в почве, загрязненной нефтепродуктами, размножаются и доминируют в биоценозе углеводородокисляющих микроорганизмов. Это указывает на возможность их пролонгированного деградационного последействия на нефтепродукты, остающиеся, хотя и в небольших количествах, в почве. Испытание *«Псевдомина»* в сравнении с названными выше биопрепаратами показало, что он является весьма перспективным деструктором нефтепродуктов в почве, значительно ускоряя разложение загрязнителя. Поэтому биопрепарат «Псевдомин» может быть рекомендован для крупномасштабного промышленного производства в целях его широкого применения для очистки почв, загрязненных нефтепродуктами.

Следовательно, в интенсификации биодеградации нефти и нефтепродуктов микробные биопрепараты, созданные на основе углеводородокисляющих микроорганизмов, должны играть все возрастающую роль. Это объясняется в первую очередь тем, что микроорганизмы, используемые в подобных биопрепаратах, обладают значительно большей активностью, чем природные формы, благодаря природной генетической селекции. Направленное регулирование жизнедеятельности углеводородокисляющих микроорганизмов в природных субстратах с помощью соответствующих биопрепаратов, построенное на углубленном познании их биологии, призвано сыграть большую роль в решении ряда актуальных проблем современности, связанных с многочисленными случаями нефтяного загрязнения почв.

Влияние пестицидов на почвенные микроорганизмы и обеззараживание почвы. Гербициды вносят в почву в небольших количествах — несколько килограммов на 1 га. Водорастворимые препа-

раты не создают в местах внесения токсичных для большинства микроорганизмов концентраций. При распылении порошков и эмульсий образуются микрозоны, в которых селекционируется микрофлора, разлагающая пестицид, но основное микронаселение почвы остается незатронутым. В то же время использование гербицидов несколько снижает количество гумуса по сравнению с необработанными почвами. Это объясняется тем, что гербициды уменьшают поступление в почву растительных остатков сорняков.

Обычно применяемые в практике дозировки пестицидов, как правило, не влияют на жизнь почвы. Однако иногда происходит задержка процесса нитрификации, так как нитрификаторы очень чувствительны к различного рода сильным воздействиям. Некоторые исследователи отмечают большую чувствительность по сравнению с другими сапротрофными микроорганизмами азотобактера и клубеньковых бактерий. Малоустойчивы к гербицидам микроскопические грибы и водоросли.

Отмеченная чувствительность к пестицидам относится в основном к повышенным их дозам. На основную же массу микроорганизмов дозы, даже в 50—100 раз превышающие применяемые на практике, не оказывают существенного влияния.

Несомненно, что не все микроорганизмы одинаково чувствительны к определенным препаратам. Каждое химическое соединение больше всего поражает какую-то свою «мишень». Разработка этого вопроса может способствовать выявлению микробиологических показателей наличия и детоксикации определенных гербицидов в почве.

Отмеченное можно проиллюстрировать примерами. *Э. А. Штиной* было установлено, что *Phormidium tenue* погибает при незначительных концентрациях 2,4-Д, а другие организмы *(Chlorella vulgaris, Nostoc punctiforme* и т. д.) весьма устойчивы к действию этого гербицида. *Ю. В. Круглое* показал, что чувствительность водоросли *Chlorella vulgaris* к некоторым гербицидам приближается к чувствительности растений овса. Очевидно, *Chlorella* может быть использована как тест-организм при выяснении токсичности гербицидов для растений.

Некоторые исследователи пытались определить суммарный эффект действия гербицидов на микрофлору почвы по изменению ее дыхания. В опытах, проводимых по методике Варбурга, тормозящее действие на «дыхание» почвы оказывали лишь дозы гербицидов, в десятки раз превосходящие используемые на практике. Однако, если энергию дыхания почвы определяют в течение длительного срока (за 28 и 56 дней), то даже небольшая доза симазина снижает выделение CO_2 почвой.

Возникает весьма важный вопрос: за какой срок обезвреживаются в почве применяемые обычно в практике дозы гербицидов. На это влияет целый ряд факторов — биологические и химические свойства почвы, ее температура, влажность и т. д. На быстроту распада гербицидов в почве большое влияние может оказывать присутствие легкодоступных микроорганизмам органических и минеральных соединений. Следовательно, без учета комплекса факторов трудно определить быстроту распада гербицида в почве. Известны случаи, когда в европейских странах ориентировались на американские данные по освобождению почв от симазина. Так, в результате недоучета особенностей климата резко снижался урожай пшеницы, высеянной после кукурузы, обработанной симазином.

Несмотря на условность сроков распада различных гербицидов, приведенные в таблице 17 данные свидетельствуют о стабильности в почве подобных соединений. Например, одни гербициды распадаются в почве через несколько недель, другие сохраняются больше года, существуют и еще более устойчивые вещества.

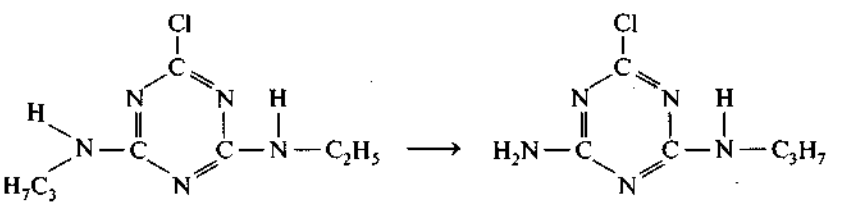
Таблица 17

Примерные сроки разрушения в почве практически используемых[1] дозировок гербицидов, мес.

До 1	1-3	4-6	7-12	Более 12
Пропанид Ялан	2,4-Д Бетанал Далапон Пирамин Ронит Эптам	Диурон Которан Вензар	Прометрин Трихлорацетат натрия	Атразин Симазин

В связи с тем что скорость детоксикации пестицидов в почвах и окружающей среде (грунтовые воды, водные бассейны и т. д.) зависит от географических, почвенных, гидрологических и других условий, составлена карта, дающая представление о способности отдельных регионов самоочищаться от вносимых в почву токсических соединений.

Следует отметить, что при частичном разрушении гербицида могут образоваться сильнотоксичные вещества. Например, когда из атразина отщепляется группировка C_2H_5, образуется хлораминоизопропиламинотриазин:



[1] Большинство приведенных в таблице гербицидов в настоящее время запрещено для применения; таблица оставлена лишь как пример.

Иногда происходит конденсация веществ, образующихся из гербицидов, в трудноразлагаемые сложные соединения. Некоторые гербициды (симазин и др.), а также продукты их распада образуют с гумусовыми соединениями прочные комплексы. Это задерживает процесс их детоксикации.

В отношении инсектицидов имеются данные, свидетельствующие о довольно быстром распаде в почве фосфорорганических соединений (полтора—четыре месяца); хлорорганические соединения устойчивее.

Рассмотрим влияние пестицидов на взаимоотношения бобовых растений с клубеньковыми бактериями. Здесь наблюдаются значительные различия. Так, гербициды, ингибирующие фотосинтез (симазин, атразин), не действуют на образование клубеньков, но процесс азотфиксации подавляется ими вследствие недостатка ассимилятов для клубеньковых бактерий. Другие гербициды депрессируют активность находящихся в клубеньках бактерий и снижают азотфиксацию.

Таким образом, для бобовых культур следует особенно тщательно подбирать гербициды и желательно употреблять их в сниженных дозах. Предпочтительнее вообще использовать для этих культур почвы, очищенные от сорняков при выращивании предшественников.

Протравливать семена бобовых растений целесообразно не позднее чем за две недели до посева. Заражение же посевного материала клубеньковыми бактериями надо проводить в день посева.

Обработка почвы в защищенном грунте пестицидами в последнее время запрещена. Частично стерилизовать почву для парников и теплиц можно высокой температурой (пастеризация). В таких случаях горячий пар вводят в почву при помощи специальных приспособлений. Многие фитопаразиты погибают при температуре 55—60 °С, в связи с чем почву пастеризуют нагреванием до 70 °С в течение 1 ч. За это время погибают грибы родов *Sclerotinia* и *Phytophtora*. Другие патогенные организмы гибнут еще быстрее. Если температура прогрева ниже 70 °С, то время прогревания увеличивают.

Контрольные вопросы и задания

1. Как изменились взгляды ученых на воздействие обработки почвы на почвенное микронаселение со времен формирования теории обработки почвы В. Р. Вильямса? 2. Какое влияние оказывает внесение извести на отдельные группы микроорганизмов? 3. Расскажите о воздействии гипсования на микроорганизмы почвы. 4. Как сказывается превращение микроорганизмами в почве солей аммония в азотную кислоту на азотном питании растений? 5. Приведите схему использования азота минеральных удобрений посевами сельскохозяйственных культур. 6. Какие приемы позволяют снизить потери азота удобрений? 7. В каких доступных для растений формах присутствует

в почве фосфор? 8. Какие процессы распада минералов, содержащих калий, идут с участием микроорганизмов? 9. Чем определяется быстрота разрушения пестицидов в почве? 10. Как влияют пестициды на формирование микробных ценозов в почве? 11. Приведите примеры условий, в которых задерживается процесс деструкции гербицидов.

Взаимодействие микроорганизмов и растений

16.1. Микроорганизмы зоны корня и их влияние на растение

На поверхность корней и надземных частей растений выделяются органические соединения, синтезированные растительным организмом. Это явление называют *экзосмосом*. В зависимости от многих причин интенсивность экзосмоса может быть большей или меньшей. Количество соединений, выделяемых растениями в течение жизни, может составлять до 10% растительной массы и более.

При корневом экзосмосе образуются различные органические кислоты — яблочная, янтарная, винная, лимонная, щавелевая и др. Обнаружены и сахара представленные альдозами и кетозами, а также некоторые аминокислоты (аланин, лизин и др.). Состав продуктов экзосмоса отдельных растений в той или иной степени различается.

В выделениях корней присутствуют физиологически активные соединения — витамины, ростовые вещества, иногда алкалоиды и т. д. Многие из них в некоторых количествах выделяются и надземными органами растений. Поэтому на корнях и надземных органах растений обильно размножаются сапротрофные микроорганизмы. Подобное явление обусловливает образование биологических сообществ, основанных на взаимодействии растений с широким спектром почвенных микроорганизмов, которые поселяются на поверхности корней или проникают в растительные ткани. Получая от растений доступное органическое вещество (корневые выделения некоторых растений составляют до 30% синтезируемой ими биомассы), почвенные микроорганизмы поставляют своим партнерам легкоусвояемые соединения азота и фосфора, синтезируют стимулирующие развитие растений фитогормоны и витамины, снижают численность и подавляют активность почвенных фитопатогенов.

Рассмотрим состав микрофлоры зоны корня. Обычно выделяют «корневые» микроорганизмы, поселяющиеся на самой поверхности корня, — микроорганизмы **ризопланы.** Отдельно рассматри-

вают группу микробов, обитающих в слое почвы, прилегающем к корню, — микроорганизмы **ризосферы.** Количество микроорганизмов на поверхности корня и в ризосфере в сотни раз больше, чем в остальной массе почвы. В зоне молодого корня в основном размножаются неспорообразующие бактерии *(Pseudomonas, Mycobacterium* и т. д.). Здесь же встречаются микроскопические грибы, дрожжи, водоросли и другие микроорганизмы.

Способность специфичных групп микроорганизмов развиваться в ризосфере определенных видов растений и оказывать положительное или негативное воздействие определила необходимость чередования культур, т. е. **севооборота.**

Целесообразность и даже необходимость введения чередования культур (севооборота) возникла, когда было установлено неблагоприятное воздействие на плодородие почвы длительного возделывания на поле одной и той же культуры. Отмеченное явление, получившее название *«почвоутомление»,* известно давно. Еще в 1796 г. о нем писал *Н. М. Максимович-Амбодик* в работе «Первоначальные ботаники основания». Иллюстрацией этого служит опыт, заложенный Д. Н. Прянишниковым на дерново-подзолистых почвах. Средние урожаи сельскохозяйственных культур, полученные спустя 50 лет после начала опыта, приведены в таблице 18. Аналогичные данные получены в многолетнем опыте, проведенном на черноземе Мироновского института селекции и семеноводства пшеницы, где опыт также продолжался около 50 лет.

Таблица 18

Влияние удобрения и шестипольного севооборота с клевером на урожайность ржи и овса, т/га

Удобрение	Рожь		Овес	
	бессменная	в севообороте	бессменный	всевообороте
—	0,67	1,34	0,71	1,32
NPK	1,06	2,05	1,01	1,78
Навоз	1,37	—	1,11	—

Некоторые растения, например кукуруза и картофель, менее чувствительны к монокультуре. Иногда предшественник улучшает рост последующей культуры, что в значительной степени относится и к бобовым.

Как же предшественник может влиять на последующую культуру и какова роль в таком случае микробиологического фактора? Здесь мы встречаемся с комплексом явлений. Некоторые растения односторонне обедняют почву на отдельные элементы питания. Под пропашными культурами почва не только истощается, но и существенно ухудшается ее структура. Не рекомендуется возделывать друг за другом сельскохозяйственные растения, имеющие общих вредителей и болезни.

О том, что утомление почвы может быть вызвано микроорганизмами, свидетельствует опыт *Н. А. Красильникова.* В колбы с агаризованной минеральной питательной средой вносят семена клевера. В часть колб помещают небольшое количество «утомленной» почвы. Это вызывает быструю гибель проростков под влиянием микроорганизмов. Та же почва, но стерилизованная, неблагоприятного эффекта не дает.

Токсичные для растений вещества могут накапливать в почве многие микроорганизмы, развивающиеся в ризосфере растений и на растительных остатках. Так, в результате жизнедеятельности бактерии рода *Pseudomonas* образуются феназинкарбоновая кислота, диацетилфлороглюцин и другие соединения, вредные для растений. Фитотоксины продуцируют многие почвенные грибы: *Aspergillus fumigatus* — гельволевую кислоту, грибы рода *Penicillium* — патулин, *Trichoderma* — виридин и т. д. Поскольку каждому растению в почве сопутствует определенный ценоз микроорганизмов, это сказывается на накоплении определенных фитотоксичных соединений.

Существуют и другие причины, обусловливающие влияние одного растения на другое, в частности химического характера. Это так называемое *аллелопатическое действие растений.* Термин «аллелопатия» предложен немецким ученым Г. *Молишем* для определения химического воздействия одного растения на другое. Многие покрытосеменные растения способны вырабатывать те или иные токсичные вещества, в том числе алкалоиды. Указанные соединения не только аккумулируются в растительных тканях, но и частично выделяются в почву.

Отмеченное свойство присуще большинству культурных растений. Так, корневая система овса выделяет скополетин (вещество, близкое к кумарину), лен — ряд ароматических соединений (феруловую, гидроксибензойную кислоты и т. д.), люцерна — алкалоиды, сахарная свекла — также ароматические соединения (гидроксибензойную, кумаровую, феруловую, ванилиновую кислоты) и т. д. Н. Г. Холодный, а затем другие исследователи установили, что аллелопатическое действие оказывают многие летучие соединения растений, среди них альдегиды, терпены, этилен, эфирные масла и т. д.

В пожнивных остатках культурных растений обнаружены некоторые вещества, токсически действующие на растения. Так, в соломе злаковых растений присутствуют кумариновая, гидроксибензойная, феруловая, сиреневая кислоты и др. Сильное аллелопатическое действие оказывают хиноны.

Вещества растительных организмов, оказывающие химическое воздействие на другие растения, *Г. Грюммер* предложил называть «колины». В высоких концентрациях такие вещества угнетают рост растений, в малых стимулируют.

Очевидно, научно обоснованное чередование культур должно строиться на учете аллелопатического фактора. Известно, что после сахарной свеклы плохо растет кукуруза, после овса резко падает всхожесть семян пшеницы, при вторичном посеве ячменя резко снижается его урожайность. Острое «утомление» почвы наблюдается при монокультуре сахарной свеклы, льна, гороха, клевера, люцерны, многих плодовых растений. Однако кукуруза, картофель, рожь, табак, виноград и некоторые овощи не испытывают угнетения при монокультуре.

Как правило, благоприятно действуют на последующие культуры бобовые растения (особенно многолетние) в связи с тем, что в симбиозе с клубеньковыми бактериями обогащают почву азотом. По данным Д. Н. Прянишникова, после того как в Европе были введены плодосменные севообороты с клевером, средняя урожайность зерновых культур поднялась с 0,7 до 1,6 т с 1 га.

На черноземе Воронежской области в четырехпольном севообороте без бобовых растений и удобрения озимая пшеница давала около 2 т/га. При использовании в севообороте однолетнего клевера урожайность повышалась до 2,5, а двулетнего клевера — до 2,8 т/га. Такие урожаи устойчиво держались на протяжении 17 лет.

Общеизвестна высокая эффективность таких предшественников хлопчатника, как люцерна и рапс. В значительной мере их действие связано с тем, что корневая система указанных растений выделяет в почву соединения (алкалоиды и другие вещества), угнетающие возбудителей вилта хлопчатника. Помимо того, люцерна обогащает почву азотом. Большая эффективность бобовых культур как предшественников сельскохозяйственных растений показана и зарубежными экспериментами.

Состав микрофлоры ризосферы меняется с возрастом растений (табл. 19). Например, бациллы, актиномицеты и целлюлозоразлагающие микроорганизмы, практически отсутствующие в ризосфере молодых растений, появляются на более поздних стадиях их развития. Очевидно, отмеченная группа микроорганизмов живет не за счет экзосмоса растений, а принимает активное участие в разложении отмирающих корней.

Микрофлора поверхности корня несколько отличается по составу от микробного ценоза ризосферы. Так, в ризоплане богаче представлен род *Pseudomonas,* слабо размножаются *Azotobacter,* целлюлозоразлагающие и некоторые другие микроорганизмы, которых много в ризосфере.

Таблица 19

Групповой состав микрофлоры пшеницы, тыс. на 1 г почвы

Фаза развития растения	Бактерии	Из них		Актиномицеты	Грибы	Целлюлозораэлагающие микроорганизмы
		неспорообразующие	бациллы			
Кущение	300 000	295 000	5 000	20	40	100
Колошение	420 000	417 000	3 000	80	55	100
Цветение	560 000	546 000	14 000	100	70	1000
Созревание	280 000	205 000	75 000	300	45	10 000

Сделаны попытки доказать, что зоне корня каждого вида растений свойственны строго специфичные группы микроорганизмов, практически не размножающиеся в ризосфере других растительных организмов. Действительно, можно отметить определенную перегруппировку отдельных микроорганизмов в зоне корня различных растений. Это определяется составом корневых выделений и органических остатков, которые у растений имеют некоторые особенности. Например, известно, что клубеньковые бактерии обильнее размножаются в ризосфере бобовых растений. В прикорневой зоне некоторых растений *Azotobacter* развивается лучше. В зоне корня растений размножаются некоторые специфичные виды грибов и т. д.

Особый интерес представляет воздействие генетических модификаций растений на численность, состав и активность микроорганизмов ризосферы. Так, английским ученым *Дж. Линчем* (1982) было установлено, что введение пары 513 хромосом в клетки пшеницы существенно изменило активность и численность ее ризосферной микрофлоры — появились грибы, вызывающие корневую гниль, увеличилась численность целлюлозоразрушающих, пектинолитических, амилолитических и аммонифицирующих бактерий, изменилось общее количество микроорганизмов. В результате ризосфера растения-реципиента стала похожа на тип ризосферы, устанавливающейся в тетраплоидных, а не в диплоидных пшеницах.

Микрофлора зоны корня представляет собой определенный биологический барьер, влияющий на взаимодействие высших растений и паразитов.

В последнее время установлено, что среди различных представителей ризосферных микроорганизмов имеются отдельные виды, обладающие способностью не только находиться и размножаться на корнях растений, но и проникать в корни, а затем мигрировать в стебли и листья. Такие микроорганизмы отнесены к *эндофитным ризобактериям,* т. е. организмам, способным жить и размножаться в

тканях высших растений (корнях, стеблях, листьях). На кафедре микробиологии МСХА (В. Т. Емцев, О. В. Селицкая и др.) была получена эндофитная ризобактерия *Klebsiella planticola,* обладающая способностью к инвазивности и персистентности, т. е. способная проникать во внутренние органы растений, активно размножаться и длительное время там находиться, мигрируя от корней к листьям и от листьев к корням. Подобные особенности *Klebsiella planticola* позволили использовать этот микроорганизм в качестве микробного биопрепарата биоплант-К для ускорения роста сельскохозяйственных растений и борьбы с корневыми фитопатогенами, поскольку данная бактерия, размножаясь в тканях растений, синтезирует ростовые вещества и антибиотики, оказывающие положительное влияние на продуктивность растений.

16.2. Симбиоз микроорганизмов с растениями

Некоторые растения вступают в тесные симбиотические отношения с микроорганизмами почвы. Внедряясь в корневую систему или наземные ткани растений, они питаются в них органическими соединениями, синтезированными растением-хозяином. В свою очередь, растения получают от микроорганизмов-симбионтов ряд необходимых им веществ различного характера.

Выше был рассмотрен симбиоз бобовых растений с азотфиксирующими бактериями рода *Rhizobium* и растений других семейств с актиномицетами рода *Frankia.* Установлено также, что корневая система подавляющего большинства наземных растений образует с грибами так называемую микоризу, которая, несомненно, имеет симбиотический характер.

Крупной вехой в развитии учения об отношениях почвенных грибов и высших растений стала работа русского ученого *Ф. М. Каменского,* изучавшего в конце XIX в. анатомическое строение корней подъельника *(Monotropa hypopitys).* Он установил, что корни этого растения, особенно их окончания, покрыты толстым слоем грибного мицелия. Ученый сделал заключение о возможности симбиотических взаимоотношений между грибом и корневой системой подъельника.

В конце XIX в. русский ученый *В. К. Варлих* нашел, что корни орхидей также пронизаны мицелием гриба. Причем растения орхидей вообще без гриба-симбионта не растут.

Последующие работы, особенно немецкого исследователя *Б. Франка,* позволили установить наличие грибного мицелия на активной части корней многих лиственных и хвойных древесных пород. Сложный комплекс, образуемый корнями растений и грибом, Франк назвал *микоризой,* что в буквальном переводе означает *«грибной корень».*

Наличие и отсутствие микориз, а также особенности их строения зависят преимущественно от систематического положения растения-хозяина. У высших споровых растений не имеют микориз спорофиты плаунов и хвощей. Голосеменные все микотрофны. Среди покрытосеменных не имеют микориз осоковые, ситниковые, капустные (крестоцветные), маковые, гвоздичные, большинство гречишных и маревые. Бобовые растения, находящиеся в симбиозе с бактериями, имеют и микоризу. В целом микоризы широко распространены среди самых разнообразных групп растений, как семенных, так и архегониальных. Водные растения не имеют микоризы.

Внешний вид и внутренняя структура микориз могут сильно варьировать. Различают эктотрофную, эндотрофную и переходную (эктоэндотрофную) микоризы. Между указанными типами микориз могут быть всевозможные варианты. Подробно типы микориз описал *И. А. Селиванов.*

Эндотрофная микориза. Наиболее распространен **эндотрофный тип микоризы.** Он свойствен травянистой растительности, многим деревьям и кустарникам. При формировании эндотрофной микоризы мицелий гриба распространяется не только между клетками коровой паренхимы, но и внедряется в них (рис. *67, Б).* Клетки коровой паренхимы остаются жизнеспособными и переваривают внедрившийся в них мицелий.

Особенно заметен описанный процесс в клетках, расположенных глубоко в паренхиме, он напоминает явление фагоцитоза. Под

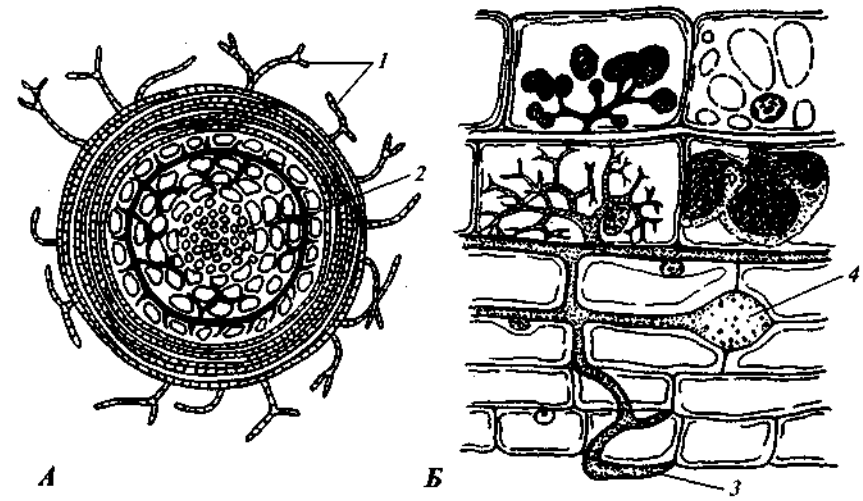


Рис. 67. Эктотрофная *(А)* и эндотрофная *(Б)* микоризы:
1 — гифы, замещающие корневые волоски; *2* — сеть Гартига;
3 — проникающая в корень гифа; *4* — везикул

влиянием содержимого клетки внутриклеточный мицелий иногда образует клубки *(пелотоны),* а нередко — древовидные разветвления *(арбускулы)* или вздутые окончания *(спорангиолы* и *везикулы).* Не исключено, что спорангиолы в некоторых случаях представляют собой лизирующиеся арбускулы.

У корней с эндотрофной микоризой часть мицелиальных окончаний выходит в почву. Такие гифы называют *эмиссионными.* Они не так густы и не образуют грибного чехла, как при эктотрофной микоризе. Поэтому корневые волоски у растений с эндотрофной микоризой обычно сохраняются.

Эктотрофная микориза. Довольно распространена **эктотрофная микоризы.** Она свойственна главным образом хвойным и «сережкоцветным покрытосеменным», реже встречается в других систематических группах растений. Корень с микоризой указанного типа окутывается достаточно плотным грибным чехлом, от которого во все стороны распространяется густая сеть гиф (рис. 67, *А).* Эктотрофная микориза может различаться по цвету мицелиального чехла, она бывает беловатой, серой, розовой, бурой и других тонов. Различают микоризу с войлочной поверхностью, волосистую, или щетинистую, и гладкую (рис. 68).

При эктотрофной микоризе грибные гифы проникают в корень на небольшую глубину, ограничиваясь преимущественно межклетниками эктодермы. Здесь гифы, переплетаясь, образуют густую сеть, названную *гартиговской* (по имени обнаружившего ее ученого *Р. Гартига).* Причем плотный грибной чехол часто окутывает корни так, что корневые волоски исчезают, а вода и питательные вещества из почвы поглощаются мицелием гриба.

Наружный слой клеток коры корня подвергается более или менее полному разрушению. Под грибным чехлом находится слой клеток с большим количеством дубильных веществ. Главные окончания корней (ростовые) иммунны к грибу и не образуют микоризы. Рост их в длину продолжается все лето, что дает возможность охватывать корнями больший объем почвы.

Эктотрофная микориза — однолетнее образование, каждый год она возобновляется. Формирование микоризы, показанное на рисунке 69, следует рассматривать как схему; структура микоризы может довольно сильно различаться даже у одного и того же растения.

Другие виды микориз. Микориза переходного типа совмещает черты, свойственные эктотрофной и эндотрофной микоризам. Иногда наблюдается **перитрофная микориза.** В таком случае грибы не вступают с растениями в тесную связь. Они поселяются в ризосфере, окутывая корень.

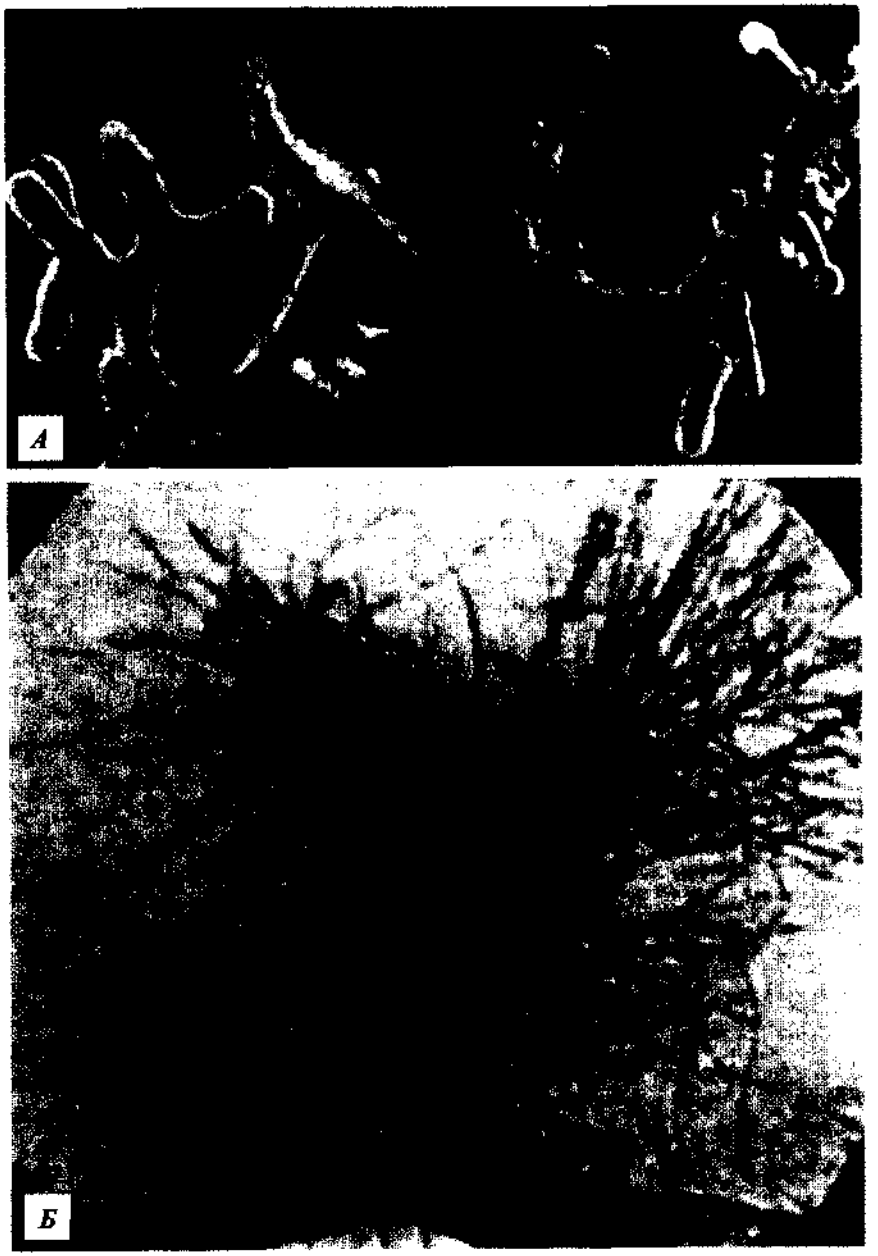


Рис. 68. Микориза на корнях древесных растений: *А — гладкая* на корнях сосны (по: Б. Бьеркман); *Б — щетинистая* на корнях дуба (по: А. Хатч)

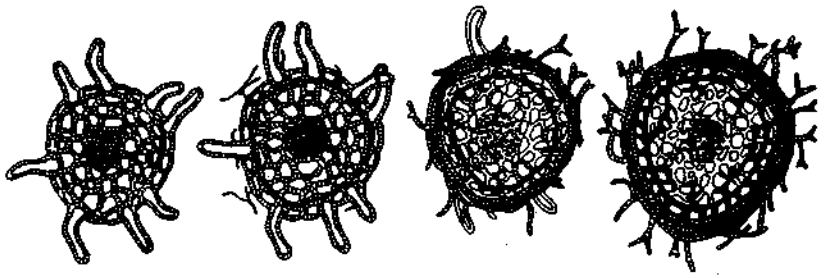


Рис. 69. Формирование эктотрофной микоризы у рябины: наблюдается постепенное образование грибом сети Гартига и микоризного чехла, что приводит к редукции корневых волосков

От истинных микориз следует отличать **псевдомикоризы,** образуемые паразитными грибами. Псевдомикоризы лишь внешне напоминают истинные, но поражают все ткани корня и имеют иную физиологическую основу. Кроме вреда, они ничего растению не приносят. Грибы же микоризообразователи значительно усиливают и улучшают развитие корневой и надземной частей растения.

Значение грибов-микоризообразователей для растений. По отношению к грибам-микоризообразователям высшие растения могут быть разделены на следующие три группы:

- облигатно-микотрофные растения, не развивающиеся без гриба (подъельник, орхидея);
- растения, рост и развитие которых улучшаются при наличии микоризы; к данной группе относят многочисленные древесные и кустарниковые породы (дуб, граб, хвойные и т. д.), в нее входят и травянистые растения, в том числе сельскохозяйственные культуры;
- растения, развивающиеся без микоризы, — водные и небольшая группа наземных.

Грибы-микоризообразователи древесной и особенно травянистой растительности изучены еще недостаточно. Установлено, однако, что эндомикоризные грибы относятся к семейству *Endagonaceae* (роды *Glomus* и *Sclerocystis).*

Микоризу у одного и того же растения могут образовать разные виды грибов, способные к симбиозу с ним. С другой стороны, один и тот же гриб способен создавать микоризу с различными растениями. Впрочем, у ряда грибов проявляется известная специфичность. Этим объясняется очень характерный состав шляпочных грибов в различных лесах.

Условия, способствующие хорошему росту растений, как правило, улучшают и формирование на них микоризы. Благоприятное влияние на образование микоризы оказывают органические и большинство минеральных удобрений. Однако внесение азотных удобрений подавляет микоризообразование. Вероятно, это объясняется тем, что при значительных количествах азота углеводы в растении перерабатываются в белки, вследствие чего ухудшается питание гриба-симбионта.

Исследование распространения микориз в различных ландшафтно-географических зонах показывает, что в тундровых и пустынных фитоценозах симбиотические связи высших растений с грибами заметно ослабевают. В лесной и степной зонах микотрофные виды растений преобладают над немикотрофными.

Грибной мицелий, окружающий корень, увеличивает рабочую поверхность последнего. В результате растения получают возможность активнее поглощать из почвы питательные вещества. Так, фосфор в основном в форме полифосфатов, со значительной скоростью транспортируется гифами грибов в ткани растений. Гифы микоризных грибов способны поглощать этот элемент из почвы за пределами обедненной ими прикорневой зоны. Также они способны использовать значительно более низкие концентрации фосфора из почвенного раствора, чем корни растений. Очевидно, микоризные грибы ассимилируют труднодоступные растениям фосфаты алюминия и железа.

Растения с микоризой легче поглощают влагу при ее дефиците в почве и поэтому легче переносят засуху. Грибы-микоризообразователи минерализуют многие органические соединения, в результате чего улучшается питание растения.

Кроме того, грибы микоризы продуцируют биологически активные вещества и благодаря этому содействуют росту растений. Некоторые грибы-симбионты разрушают гумус.

Образование микориз возможно, если в почве имеются соответствующие грибы. Обычно в микробном ценозе почвы они присутствуют. Однако в некоторых случаях, например при степном лесоразведении и рекультивации земель, когда в почве нет грибов-микоризообразователей древесных растений, целесообразно их внесение в почву.

16.3. Эпифитные микроорганизмы и хранение урожая

Часть микроорганизмов, развивающихся в зоне корней растений, во время вегетации последних переходит на надземные органы и продолжает здесь размножаться. Некоторое число микроорганизмов заносится на поверхность растений с пылью и насекомыми.

Микроорганизмы, развивающиеся на поверхности растений, получили название **эпифитов,** или **микробов филлосферы.** Эти микроорганизмы не паразитируют на растении, а растут за счет нормальных выделений его тканей и имеющихся на поверхности орга-

нов небольших количеств загрязнений органического происхождения (пыль и т. д.).

Довольствоваться скудными запасами питательных материалов на поверхности растений могут далеко не все микроорганизмы. Поэтому состав эпифитной микрофлоры растений весьма специфичен. До 80% общего количества эпифитов составляют клетки *Erwinia herbicola*. Эта грамотрицательная неспорообразующая бактерия на мясо-пептонном агаре формирует золотисто-желтые колонии. В некотором количестве обнаруживаются на поверхности растений и другие бактерии, в частности фиксирующие молекулярный азот. Бацилл и актиномицетов среди эпифитных микроорганизмов мало, чаще встречаются споры разных видов грибов *(Penicillium, Fusarium, Mucor* и т. д.).

Существование эпифитных микроорганизмов на здоровом растении в значительной мере связано с климатом. Во влажную погоду их численность возрастает, в сухую, наоборот, уменьшается. У тех растений, которые интенсивнее выделяют продукты обмена на поверхность тканей, эпифитная микрофлора богаче и разнообразнее.

Микроорганизмы обитают не только на стеблях, листьях и других надземных органах растений, но и на семенах. Исключение составляют семена, плотно закрытые плодовыми или семенными оболочками, например плоды бобовых культур. В таких случаях до момента раскрытия оболочек семена практически лишены микрофлоры. Во время уборки и обмолота такое зерно сильно загрязняется микроорганизмами. Большое значение при этом имеют пыль и почва.

Степень обсеменения различного зерна микроорганизмами неодинакова. Сказываются индивидуальные особенности растения, условия созревания зерна и его морфологические признаки. Так, бороздка, шероховатая поверхность эпидермиса или цветковые пленки способствуют скоплению на поверхности зерна большого количества пыли и микрофлоры. Поэтому на зерне злаковых больше микроорганизмов, чем на семенах некоторых масличных или бобовых с гладкой поверхностью.

Воздействие эпифитных микроорганизмов на растительный организм очень разнообразно и зависит от окружающих условий. В первые этапы прорастания зерна эпифитные микроорганизмы начинают размножаться и переходят на корни и проросток. При пониженной температуре интенсивнее развиваются холодоустойчивые микроскопические грибы, среди которых есть и факультативные, и облигатные паразиты. В результате резко понижается полевая всхожесть зерна. Предварительное протравливание семян значительно снижает вред, причиняемый эпифитными грибами.

Интересно, что протравливание семян кукурузы наиболее эффективно в условиях холодного климата. Это вполне понятно, так как при низкой температуре почвы грибы более агрессивны, а иммунитет растений снижен.

В северной зоне России кукурузу можно без ущерба высевать, не ожидая прогрева почвы, если применять так называемую гидрофобизацию семян. Суть метода заключается в покрытии семян водонерастворимой, но проницаемой для воды и воздуха пленкой, содержащей пестициды, предохраняющие семена и всходы от грибных и бактериальных болезней и вредителей.

Эпифитные микроорганизмы, размножаясь на поверхности растений, создают биологический барьер, препятствующий проникновению паразитов в растительные ткани. Усиливая размножение эпифитной микрофлоры опрыскиванием растений питательными для микроорганизмов растворами, удается увеличить антагонистическое воздействие эпифитов на фитопатогенные микроорганизмы. В принципе с некоторыми болезнями растений можно бороться, воздействуя на их эпифиты.

Большую роль эпифитные микроорганизмы играют при хранении зерна и семян. От чего зависит развитие на зерне и семенах микроорганизмов, а следовательно, порча этой продукции? Прежде всего от влажности зерна и температуры окружающей среды. Так, во время созревания зерна влажность его сильно снижается и достигает уровня, когда размножение микроорганизмов становится невозможным. В спелом зерне вся влага находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам.

Различные группы микроорганизмов начинают развиваться на зерне при разных уровнях влажности. Так, при температуре около 15—20 °С некоторые грибы могут размножаться на зерне пшеницы и кукурузы с влажностью 14,5—15%, а бактерии — при увлажнении зерна пшеницы до 17,5—18%.

Зерну каждой группы культур присуща своя критическая влажность, при которой на нем возможно размножение микроорганизмов. На семенах бобовых при указанной выше температуре грибы развиваются при влажности 16%, подсолнечника — при 7—9%. Это зависит от количества связанной воды в тканях различных семян, что определяется их структурой и химическим составом. Микроорганизмы начинают развиваться на зерне, лишь когда в нем появляется свободная вода, т. е. степень увлажнения превышает уровень связанной воды.

Степень увлажнения хранящегося зерна зависит от влажности окружающего воздуха. Установлены значения равновесной влажности семян и зерна растений при различной влажности воздуха. Руководствуясь приведенными показателями, можно создавать благоприятные условия для хранения зерна и семян.

Развитие микроорганизмов на зерне и семенах определяется также температурой. Это отмечается только для несколько увлажненного материала, так как на сухом зерне микроорганизмы не развиваются. При повышенной влажности зерна микроорганизмы размножаются тем быстрее, чем выше температура.

В зависимости от влажности зерна пшеницы и температуры среды на нем развиваются различные группы микроорганизмов. При температуре 10 °С даже довольно влажное зерно (18—19% влаги) может хорошо храниться, а при 15—20 °С оно начинает быстро плесневеть и портиться. Для успешного хранения зерна при более высокой температуре его влажность необходимо снизить.

Активное развитие микроорганизмов в зерновой массе различных культур при одной и той же степени увлажнения начинается в разные сроки. Пшеница, рожь, ячмень, горох, бобы и гречиха довольно устойчивы. В просе, кукурузе и подсолнечнике микроорганизмы развиваются быстрее и интенсивнее.

При подмокании любого зерна свойственная ему эпифитная микрофлора быстро исчезает. Начинают развиваться разные мицелиальные грибы (плесени), преимущественно представители родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Последний род преобладает при повышенной температуре (выше 25 °С). Из бактерий на зерне сначала обильно размножаются микрококки, полностью вытесняющие *Erwinia herbicola,* позднее появляются разнообразные неспорообразующие палочки, а при повышенной температуре — бациллы *(Bacillus mesentericus, B. subtilis* и др.). Следовательно, по составу микрофлоры зерна можно судить об условиях его хранения.

При более или менее длительном развитии микроорганизмов в результате их жизнедеятельности масса зерна может разогреться. Зерновые массы имеют низкую теплопроводность, поэтому хорошо аккумулируют тепло. Наряду с микроорганизмами тепло выделяется вследствие дыхания зерна, развития насекомых и т. п.

Глубоко зашедший процесс разогревания зерна приводит к повышению его температуры до 60 °С. Зерно при этом нередко приобретает темную окраску — «обугливается», так как в нем образуются темноокрашенные соединения меланоидной природы.

Сохранность урожая овощей и плодов, имеющих большую влажность, определяется их иммунитетом и созданием внешней среды, предупреждающей развитие микроорганизмов на их поверхности.

16.4. Развитие на растениях токсигенных грибов

К биологически активным веществам, вырабатываемым некоторыми группами микроорганизмов, следует отнести токсины — вещества, вызывающие заболевания высших организмов. Указанные соединения вырабатываются как патогенными микроорганизмами, так

и некоторыми сапротрофами. Существуют токсины, локализованные в клетках микроорганизмов *(эндотоксины),* другие выделяются микробами во внешнюю среду *(экзотоксины).*

При развитии на злаках или кормах некоторых грибов накапливаются ядовитые продукты, иногда вызывающие тяжелые отравления — *микотоксикозы.* В ряде случаев виновниками пищевых и кормовых отравлений могут быть бактерии.

Примером микотоксикоза служит эрготизм — болезнь человека и животных, возникающая при потреблении зерна, зараженного спорыньей (сумчатый гриб *Claviceps purpurea).* Гриб заражает растения в поле. При этом в колосках злаков образуются склероции гриба, обычно называемые рожками. Ядовитыми свойствами обладают собственно рожки. Перед размолом зерна их следует удалять из зерновой массы.

Токсичные свойства рожков объясняются присутствием в них ряда алкалоидов — эргокристина и его изомеров, эргобазина и других близких по структуре соединений. Основа строения перечисленных алкалоидов — лизергиновая кислота, которая относится к производным индола. Она связана с одной или несколькими аминокислотами.

Из рожков спорыньи получают ценные фармацевтические препараты, но примесь ее к зерну вредна. Заболевание эрготизмом протекает различно. В основном поражается пищеварительный тракт, что сочетается с расстройством нервной системы.

Другой гриб из того же рода — *Claviceps paspali* — поселяется на травах рода *Paspalum* (двурядная гречиха и др.), образуя на колосках шаровидные склероции, содержащие токсичные вещества. Отравление, вызываемое грибом у скота, получило название клавицепстоксикоза. Наиболее характерный симптом этого заболевания — расстройство координации движений. Для профилактики клавицепстоксикоза нельзя допускать использование корма, если в нем обнаружены склероции. Специфичные средства лечения токсикоза не разработаны.

Тяжелые заболевания людей могут вызвать грибы рода *Fusarium,* развивающиеся на вегетирующих или скошенных злаках. Во влажном климате на злаках может паразитировать *Fusarium graminearum.* Токсин, накапливаемый этим грибом в зерне, вреден для людей и животных. Хлеб, выпеченный из муки фузариозного зерна, вызывает симптомы, близкие к опьянению. Это заболевание получило название «пьяный» хлеб. Токсин гриба содержит глюкозиды и алкалоиды.

Отравления людей наблюдаются при употреблении в пищу несвоевременно убранных, перезимовавших под снегом зерновых культур. На них развивается гриб *Fusarium sporotrichiella,* выделяющий сильный токсин, к которому чувствительны не только люди,

но и многие животные. Отравление больным зерном людей сначала называли септической ангиной, так как оно начиналось с признаков, близких по симптомам к ангине. Позднее данный микотоксикоз стали называть алиментарно-токсической алейкией. Болезнь сопровождается склонностью к кровоточивости, резким уменьшением числа лейкоцитов за счет гранулоцитов и другими симптомами алейкии.

Из токсина *Fusarium sporotrichiella* выделен сапонин, который, очевидно, связан с холестерином. В токсине имеются и соединения, относящиеся к стеролам циклопентафенантренового ряда. Поскольку детально токсин пока не изучен, меры специальной профилактики и лечения фузариотоксикозов не разработаны.

Корм, пораженный токсичным грибом *Stachybotris alternans,* служит причиной тяжелого заболевания животных. К токсину чувствителен и человек. Данное заболевание называется стахиботритоксикозом. При болезни возникают некрозы слизистой оболочки ротовой полости и последующих отделов пищеварительного тракта животных. Из пищеварительного тракта токсины проникают в центральную нервную систему, вызывая тяжелые поражения мозга. У людей, работающих с таким кормом, также может наблюдаться поражение слизистых оболочек, вызванное этой болезнью. Специфичные средства профилактики и лечения стахиботритоксикоза не разработаны.

При потреблении грубых кормов, на которых развился гриб *Dendrodochium toxicum,* наблюдается молниеносная гибель лошадей при симптомах расстройства сердечно-сосудистой системы и подавления кровообразования. При слабом отравлении развивается затяжная болезнь с поражением слизистых оболочек рта и кишечника. Попадание спор гриба на слизистые оболочки человека вызывает их воспаление. Описанная болезнь носит название дендродохиотоксикоза. Химическая природа токсина не установлена.

Отравления животных кормами могут также вызвать грибы родов *Aspergillus* (аспергиллотоксикоз), *Penicillium* (пенициллотоксикоз) и *Mucor* (мукоромикоз). Токсины образуют и другие виды грибов, развивающиеся на кормах, поэтому скармливание заплесневевших кормов недопустимо. Работа с ними также опасна, так как споры грибов, содержащие токсичные вещества, попадают в полость рта, дыхательные пути и служат причиной остро протекающих заболеваний человека (зерновая лихорадка и т. д.).

Контрольные вопросы и задания

1. От чего зависит формирование эпифитной микрофлоры? 2. Какие виды микроорганизмов могут обитать на поверхности растений? 3. Расскажите об условиях формирования микоризы.

Микробные землеудобрительные биопрепараты и их использование в сельском хозяйстве

Биологической альтернативой минеральным азотным удобрениям в сельском хозяйстве является биологическая фиксация молекулярного азота атмосферы. Как известно, азотные минеральные удобрения стали очень дорогими из-за сокращения добычи ископаемого топлива, а кроме того, в последнее время повышается общественно-политическая озабоченность возможностью химических загрязнений, в частности минеральным азотом, окружающей среды. Следовательно, внимание в настоящее время концентрируется на азотфиксации как альтернативе удобрениям.

Широкие исследования по изучению механизмов азотфиксации и взаимодействия микроорганизмов и растений показали необходимость разработки и использования методов генной инженерии для создания новых азотфиксирующих систем, которые являлись бы основой высокоэффективных биопрепаратов нового поколения. Это биопрепараты комплексного действия — они улучшают питание растений (как за счет фиксации атмосферного азота, так и за счет более эффективного использования питательных элементов удобрений и почвы), стимулируют рост растений, подавляют развитие фитопатогенной микрофлоры. Эти достоинства ярко проявляются при сравнении с химическими препаратами — пестицидами. В целом ряде случаев обработка препаратами полностью заменяет химическое протравливание семян. Применение биопрепаратов повышает продуктивность растений, улучшает их качество за счет повышения содержания белка, крахмала, витаминов и других соединений, позволяет получить более раннюю продукцию, улучшает ее сохранность. Биопрепараты обладают широким спектром действия, но наибольшую эффективность они проявили на овощных и кормовых культурах. Кроме того, их использование позволяет снизить норму минеральных азотных удобрений, что положительно сказывается на уровне нитратов и нитритов в продукции.

17.1. Биопрепараты ризоторфин на основе клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*

Вскоре после того как М. Бейеринк (1888) изолировал клубеньковые бактерии бобовых растений, возникла идея использовать эти бактерии для улучшения образования клубеньков и усиления фиксации атмосферного азота.

Впервые препарат клубеньковых бактерий под названием «нитрагин» был приготовлен в 1896 г. в Германии *Ф. Ноббе* и *Л. Гильтнером*. Позднее под различными наименованиями культуры клубеньковых бактерий появились в других странах. В 1906 г. в Великобритании началось производство «нитрагина», в 1907 г. в США *Ф. Гаррисон* и *Б. Барлоу* предложили соответствующий препарат «нитрокультура». В том же году в России *Л. Т. Будинов* применил препарат *Rhizobium,* именовавшийся также «нитрагином».

Препараты клубеньковых бактерий сейчас широко используют во многих странах под различными названиями. Так, во Франции их называют N-germ, в Чехии и Словакии — нитразон, в России — нитрагин, ризоторфин и т. д.

Использование препаратов клубеньковых бактерий для заражения семян бобовых растений совершенно необходимо, когда в данной местности вводят новые культуры бобовых и в составе флоры нет перекрестно заражающихся с ними растений. Такая потребность возникла в нашей стране при возделывании соевых бобов в новых зонах. При этом клубеньков на корнях бобовых растений практически не было. Инокуляция обеспечивала образование клубеньков, а следовательно, осуществление азотфиксации. В результате увеличивались урожай и содержание белка в растительной массе и зерне.

В целесообразности применения инокуляции для новых культур бобовых растений, а также на вновь осваиваемых сельскохозяйственных угодьях нет сомнения. Значительно труднее решить вопрос о старопахотных, хорошо окультуренных почвах, на которых уже давно возделывают определенные виды бобовых растений. Можно предположить, что в таких почвах уже сложились достаточно стабильные микробные ценозы, в составе которых имеются и клубеньковые бактерии культурных бобовых растений. Нужна ли здесь инокуляция и будет ли она себя оправдывать?

Для ответа на этот вопрос были поставлены многочисленные опыты. В европейской части России массовые опыты с инокуляцией разных бобовых культур были проведены *Е. Н. Мишустиным* и *В. В. Бернардом*. В большинстве случаев инокуляция дала заметное увеличение урожая. Наилучший эффект отмечался на кислых почвах.

Объяснить такое действие заражения бобовых растений культурой *Rhizobium* или *Bradyrhizobium* на давно освоенных почвах, имеющих в составе микрофлоры клубеньковые бактерии, можно следующим образом. Во-первых, в природных условиях может происходить перекрестное заражение, т. е. высеваемые бобовые растения заражаются клубеньковыми бактериями близких групп растений. В таких случаях клубеньки хотя и образуются, но функционируют неполноценно. В то же время при искусственной инокуляции в корень бобового растения проникает активная раса *Rhizobium* или *Bradyrhizobium,* нанесенная на высеваемые семена.

Во-вторых, клубеньковые бактерии, имеющиеся в почве, не занятой бобовыми растениями, существуют как обычные сапротрофы. Нередко вследствие ряда причин почва оказывается неблагоприятной средой для клубеньковых бактерий. Их количество существенно уменьшается, а активность снижается. Кислые почвы, например, отрицательно влияют на азотфиксирующую способность клубеньковых бактерий, и при сапротрофном существовании происходит существенное снижение их ценных свойств. В таких случаях естественное заражение не дает эффективного симбиоза.

Массовые опыты с нитрагинизацией показали целесообразность и эффективность рассматриваемого агроприема (табл. 20). Довольно широко искусственная инокуляция бобовых культур клубеньковыми бактериями проводится в Чехии, Словакии, Болгарии, Польше, США, Канаде, Франции, Швеции и др.

Таблица 20

Эффективность нитрагинизации основных бобовых культур

Культура	Количество опытов с достоверной прибавкой, %	Урожай в контроле	Достоверная прибавка урожая	Прибавка урожая к контролю, %
		т/га		
Горох:				
зерно	40	2,14	0,11	5,1
зеленая масса	64	14,75	1,55	11,8
Соя	84	1,79	0,4	22,3
Люпин:				
зерно	42	1,90	0,18	9,5
зеленая масса	81	26,90	4,05	15,1
Люцерна (зеленая масса)	92	36,00	5,60	15,5
Клевер (сено)	75	6,05	0,50	8,3
Фасоль	45	2,53	0,25	9,9
Чина	75	2,58	0,20	7,7
Вика (зеленая масса)	75	18,00	1,40	7,8
Эспарцет	60	11,80	1,60	13,6

Со временем появилась потребность экспериментально установить территориальные зоны, где инокуляция дает хороший результат. Такая работа была проведена во Франции с люцерной — распространенной здесь бобовой культурой. Выявлена необходимость инокуляции на кислых почвах. Кроме того, этот прием часто приносит пользу на декальцированных почвах, почвах побережья Атлантического океана и в ряде других мест. На богатых кальцием и известкованных почвах заметного эффекта от заражения не наблюдается.

Бактеризация не только увеличивает урожай бобовых растений, но и улучшает его качество. В растениях, зараженных активными расами клубеньковых бактерий, значительно повышается количество белка и витаминов группы В. Поскольку положительное влияние инокуляции распространяется и на корни растений, то после сбора урожая пожнивные остатки более эффективно действуют на последующую культуру севооборота.

Препарат, содержащий клубеньковые бактерии, готовят разными методами. Чаще всего используют торфяной нитрагин — ризоторфин. Он представляет собой стерилизованный *у*-облучением низинный торф, к которому добавлены необходимые для клубеньковых бактерий питательные вещества. Расфасованную массу выдерживают в термостате для размножения внесенных в нее бактерий. Иногда готовят торфяной препарат, не стерилизуя торф, но вносят в него большое количество клубеньковых бактерий.

При изготовлении препарата на почве пользуются нейтральной, богатой органическим веществом стерильной почвой, расфасованной в ту или иную тару. Перед посевом семена бобовых растений обрызгивают водной суспензией того или иного препарата. Препараты для заражения бобовых растений можно применять ограниченное время, так как клубеньковые бактерии постепенно отмирают. Для каждой бобовой культуры или узкой группы растений готовят специальный препарат.

В связи с широким использованием приемов химического протравливания семян, применением гербицидов, инсектицидов и т. д. возникает вопрос о совместимости химических мер защиты урожая с инокуляцией семян бобовых клубеньковыми бактериями. Выяснено, что протравливание семян не исключает применения культур клубеньковых бактерий. Однако необходимо подбирать соответствующие протравители и разделять указанные приемы во времени (см. главу 15).

Для эффективного симбиоза клубеньковых бактерий и бобовых растений необходима систематическая работа по селекции активных и вирулентных культур клубеньковых бактерий, а также бобовых растений, обеспечивающих интенсивную деятельность их симбионтов.

В последние годы под бобовые растения применяется около 1,5 млн га порций ризоторфина в год. Ризоторфин позволяет уменьшить объемы применения азотных удобрений; препарат разработан практически для всех бобовых, возделываемых в настоящий момент. Особенно ярко полезность ризоторфина проявляется при введении в культуру новых видов бобовых, многие из которых (например, козлятник) вообще не могут возделываться без наличия в почве соответствующих микроорганизмов. Агрономическая эффективность ризоторфина для бобовых культур в среднем составляет 10—30%, дополнительный сбор белка — 2—5 ц/га. При интродукции новых бобовых культур (люпин, люцерна, козлятник) эффективность бактеризации может составлять 50—100%, а сбор белка увеличивается в 2—3 раза.

17.2. Биопрепарат азотобактерин на основе *Azotobacter* chroococcum

Способность *Azotobacter chroococcum* размножаться при соответствующих условиях в ризосфере сельскохозяйственных культур дала основание предполагать, что указанный микроорганизм может улучшить азотное питание растений. По предложению академика *С. П. Костычева* и его сотрудников с тридцатых годов двадцатого столетия в нашей стране начали применять землеудобрительный препарат, содержащий культуру *Azotobacter chroococcum,* — **азотобактерин.**

Позднее, когда выяснилась способность микроорганизма продуцировать биологически активные вещества, его действие на растения стали связывать не только с фиксацией азота и улучшением азотного питания, но и с поступлением в растения вырабатываемых микроорганизмом биологически активных соединений (витаминов и стимуляторов роста).

Весьма важное свойство азотобактера заключается и в том, что он вырабатывает фунгистическое вещество, которое представляет собой метиловый эфир алифатической тетраеновой кислоты, содержащей гидроксильную и *В*-метильную группы. Обнаруженный антибиотик, по данным *Н. И. Придачиной,* активен против значительного числа фитопатогенных грибов. Благодаря этому при бактеризации азотобактером в ризосфере угнетается развитие микроскопических грибов, многие из которых задерживают рост растений. Так, культура азотобактера снимает угнетающее действие фитотоксичного гриба *Altenaria* на кукурузу, а рост незараженного растения стимулирует. Отдельные культуры *Azotobacter* различаются по своим антагонистическим свойствам.

Работа с различными штаммами *Azotobacter chroococcum* подтвердила хорошее действие на растения лишь тех культур, которые

вырабатывают биологически активные вещества. Поэтому при селекции для производственных целей отбирают культуры азотобактера, продуцирующие биологически активные соединения, стимулирующие рост растений и угнетающие развитие фитопатогенных грибов родов *Verticillium, Helmintosporium, Pythium, Fusarium* и т. д.

Однако для полевых культур азотобактерин малоэффективен. Это связано с его способностью развиваться лишь в хорошо окультуренных почвах. На унавоженных почвах положительное действие азотобактерина возрастает. Препарат хорошо влияет, например, на овощные культуры, которые обычно выращивают на сильно удобренных навозом почвах. Здесь бактеризация семян может повысить урожай на 20—30% и, что особенно важно, ускорить его созревание.

Для объяснения эффективности азотобактера прежде всего следует выяснить, может ли этот микроорганизм, используя корневые выделения, накопить достаточно азота для развития растения. Опыты с монобактериальными культурами, в которых высшее растение, выращенное из стерильных семян, инокулировали культурой азотобактера, дают на этот вопрос отрицательный ответ. За счет корневых выделений бактерия не может усвоить такое количество азота, которое обеспечивало бы высокий урожай растений.

Вместе с тем при определенных условиях азотобактер улучшает рост растений. В этом можно убедиться, если в условиях монобактериальной культуры обработать им семена растений. Объясняется это тем, что азотобактер синтезирует много биологически активных соединений — никотиновую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гиббереллин и, возможно, ряд других соединений. Комплекс указанных веществ способен стимулировать прорастание семян, ускорять развитие растений в благоприятных условиях среды.

Положительное действие азотобактера легко понять, учитывая физиологические особенности данной бактерии. Она активно размножается лишь в плодородных почвах, обеспеченных органическим веществом, фосфором и влагой. Дефицит увлажнения азотобактер переносит хуже, чем другие бактерии.

Известно, что в плодородных почвах присутствует спонтанная культура *Azotobacter.* Как же в таком случае объяснить положительный эффект дополнительного заражения? Вероятно, это связано с небольшой численностью клеток азотобактера даже в плодородной почве. При бактеризации количество бактерий сильно возрастает, особенно в ризосфере, что и создает благоприятные условия для развития корневой системы. Проявляется как стимулирующее влияние ростовых веществ, так и подавление вредной грибной флоры, а также некоторое накопление в почве доступного растениям азота.

Препарат азотобактерин используют в основном для оранжерейной и парниковой культуры растений. Обычно его готовят, размножая микроорганизм в стерильной почве или низовом торфе, имеющих нейтральную реакцию и высокое содержание гумуса. К почве добавляют источник углерода, доступный азотобактеру. Высеваемые семена смачивают водной суспензией препарата. У рассады можно смачивать суспензией корневую систему. Препарат азотобактера нестабилен и годен для использования ограниченное время.

17.3. Биопрепараты на основе культур цианобактерий

Возможность использования цианобактерий, или синезеленных водорослей, для обогащения почвы азотом изучают в ряде стран. Альголизацию, т. е. внесение в почву культуры данных микроорганизмов, широко изучали в зоне субтропиков, преимущественно на рисовых полях. Водоросли влаголюбивы и плохо размножаются на недостаточно влажной почве. В воде рисовых полей цианобактерий могут активно размножаться в течение длительного времени.

Известно до 130 видов синезеленых водорослей, фиксирующих N_2. Они различаются по некоторым свойствам. Например, для *Cylindrospermum* предпочтительно более слабое освещение, *Aulosira* лучше развивается при интенсивном освещении. В связи с этим необходимо подбирать подходящие для местных условий культуры. Наиболее часто используют для альголизации *Tolypothrix tenuis, Anabaena cylindrica* и *Nostoc linckia.*

Обычно внесение цианобактерий в почву или воду рисовых полей дает хороший эффект. Указанные микроорганизмы накапливают довольно большое количество азота, фиксируя N_2, продуцируют биологически активные вещества и обогащают почву органическим веществом. За вегетационный период цианобактерии связывают до 50 кг азота на 1 га и более. Половина этого количества азота усваивается посевами. Фиксированный азот частично выделяется из клеток при их жизни в виде аминокислот, частично после их отмирания.

В Индии, Китае и других странах тропической зоны альголизацию применяют довольно широко. В значительной мере она заменяет азотные удобрения, покупка которых обременительна для крестьян. Научно-исследовательские учреждения названных стран имеют производственные установки, на которых готовят маточные культуры. Основную массу цианобактерий получают на местах в специальных бассейнах, куда вносят культуру, полученную из научно-исследовательского учреждения. Благодаря быстрому размножению за три недели с 1 га бассейна можно получить до 15 т массы цианобактерий. Из указанных водоемов ее поставляют на рисовые поля.

Альголизацию рисовых полей на территории бывшего СССР не применяли по ряду причин. Так, рис здесь удобряют высокими

дозами азотных удобрений, обеспечивающих больший эффект, чем цианобактерии. Азотные удобрения к тому же подавляют нитрогеназу микроорганизмов. Кроме того, эти бактерии чувствительны к гербицидам, применяемым в крупных хозяйствах, да и сама альголизация связана с трудоемкими работами.

Для условий южного климата существенный интерес представляет водный папоротник рода *Azolla.* Виды этого растения *(A. caroliniana, A. rubra, A.filiculoides, A. imbricata)* отличаются друг от друга некоторыми свойствами. Обычно представители рода *Azolla* живут в симбиозе с цианобактерией *Anabaena azollae,* фиксирующей атмосферный азот. Эти бактерии быстро размножаются и обогащают рисовые поля азотом.

Впервые водный папоротник использовала вьетнамская крестьянка Ба-Хен. Эффект от применения азоллы был так велик, что после смерти крестьянку обожествили в деревне, где она жила, и построили пагоду в честь «богини Азоллы». Сейчас азоллу используют в некоторых странах Азии.

Для практического применения водный папоротник размножают в небольших водоемах, откуда переносят на залитые водой рисовые поля. С наступлением жаркой погоды, примерно в фазу кущения риса, зеленый ковер размножившегося папоротника отмирает и растительная масса минерализуется. Азолла накапливает за вегетационный период на 1 га около 120 кг азота, часть которого используется в текущем году.

Помимо того, растение образует большое количество органического вещества, удобряющего почву. Иногда азоллу культивируют перед посевом риса в течение трех недель в чеках, залитых на 3—5 см водой. За этот период масса водоросли достигает 10 т/га и в ней содержится около 20—25 кг азота. Папоротник запахивают, затем сеют рис.

17.4. Биопрепараты на основе ассоциативных азотфиксирующих бактерий

Открытие способности ряда азотфиксирующих бактерий к ассоциативному симбиозу с небобовыми растениями обусловило возможность создания биопрепаратов для использования под овощные, технические и зерновые культуры. Впервые ассоциативные азотфиксирующие бактерии, относящиеся к семейству *Azotobacteriaceae — Azospirillum brasilense* и *Azospirillum lipoferum,* были выделены бразильским ученым *И. Доберейнер* из ризосферы травянистых растений тропической зоны, где они часто встречаются. У кукурузы, сорго, риса, сахарного тростника и кормовых растений это обычные компоненты микрофлоры ризосферы.

Бактерии рода *Azospirillum* имеют палочковидную изогнутую форму. *A. brasilense* отличается от близкого вида. *A. lipoferum* по некоторым физиологическим признакам.

Если азотобактер развивается в некотором отдалении от поверхности корня (в ризосфере), то азоспириллы находятся на самой его поверхности и могут даже проникать в ткани корня. Тесная связь азотфиксаторов рода *Azospirillum* с растениями проявляется в том, что эти микроорганизмы находятся даже на стеблях и листьях.

Была изучена возможность использования культур *Azospirillum* для усиления процесса азотфиксации в зоне корня сельскохозяйственных растений. Поставлены опыты с разными культурами, как в вегетационных, так и в полевых условиях. В подавляющем большинстве случаев внесение бактерий дает прибавку урожая в пределах 15—30%. При дозах минерального азота выше 60 кг/га, а также при недостаточном освещении положительного действия азоспирилл не наблюдается.

К настоящему времени выявлено более 200 видов бактерий, обладающих различными уровнями активности азотфиксации. Наиболее распространенные ассоциативные азотфиксирующие бактерии, живущие в ризосфере, ризоплане (на поверхности корня) и *гистосфере* (в тканях внутренней поверхности корня и между клеточными стенками), принадлежат к родам: *Agrobacterium, Arthrobacter, Azospirillum, Enterobacter, Bacillus, Flavobacterium, Pseudomonas, Klebsiella* и др.

На основе отобранных штаммов бактерий в НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН создан ряд биопрепаратов для инокуляции семян и другого посадочного материала многих небобовых растений.

Агрофил — создан на основе штамма, относящегося к роду *Agrobacterium (A. radiobacter,* штамм 10). Представляет собой порошковидный торфяной субстрат, обогащенный углеводами, витаминами, микроэлементами, с влажностью 50—55%; инокулированный бактериями. В 1 г препарата содержится не менее 10 млрд активных бактериальных клеток. Биопрепарат находит широкое применение при выращивании овощей в условиях закрытого грунта. Повышает устойчивость к инфекционным заболеваниям и увеличивает урожайность огурцов, томатов, перца, моркови, капусты, салата и других овощных культур. Препарат хорошо действует при обработке корневой системы клубники, крыжовника, малины, яблони, облепихи и других ягодных и плодовых культур. Улучшает всхожесть семян, стимулирует рост и развитие растений, повышает их устойчивость к корневым гнилям, ускоряет созревание урожая на 7—10 дней.

В условиях закрытого грунта прибавки урожая овощей составляют 2—4 кг/м². В открытом фунте он обеспечивает прибавку урожайности на 20—50 ц/га в зависимости от культуры, сорта, почвенно-климатических условий. Расход препарата для открытого грунта: салат, редис, морковь, укроп, петрушка, цикорий — 400 г на гектарную норму семян; капуста, свек-

ла, лук — 600 г на 1000 растений; картофель — 1200 г на гектарную норму; земляника, черенки плодовых — 200 г на 1 л воды.

Агрофор — создан на основе штамма, относящегося к роду *Agrobacterium (A. radiobacter,* штамм 57/136). Применяется для ускорения детоксикации пестицидов в тепличных грунтах и в почве. Одновременно стимулирует рост растений, особенно на ранних этапах развития. Улучшает качество и приживаемость рассады: кочанного салата, цветной и белокочанной капусты, томатов и других овощных культур. У обработанных растений увеличивается площадь листовой поверхности, возрастает мощность корневой системы и повышается продуктивность.

Азоризин (диазобактерин) и аналогичные им препараты созданы на основе штаммов, относящихся к роду *Azospirillum.* Азоспириллы эффективны при внесении в посевы пшеницы, ячменя, риса, сорго, кормовых злаков и других культур.

Биоплант-К — создан на кафедре микробиологии МСХА на основе штамма бактерий рода *Klebsiella (K. planticola,* штамм ТСХА-91). Рекомендован в качестве бактериального удобрения под овощные культуры. Бактерии обладают высокой азотфиксирующей активностью, способны к синтезу ростовых веществ и проявляют фунгистатическое действие по отношению к фитопатогенным грибам: *Penicillum, Aspergillus, Altemaria, Mucor* и др. Применение препарата позволяет увеличить урожайность огурцов на 21—23%, томатов и тыквы — на 31%, картофеля — на 21%.

Мизорин — создан на основе штамма, относящегося к роду *Arthrobacter (A. mysorens,* штамм 7). В 1 г торфяного препарата содержится 8—10 млрд клеток бактерий. Представляет собой порошковидный торфяной субстрат с влажностью 45—55%, обогащенный питательными веществами. Высокоэффективность препарата проявляется в посевах пшеницы, ячменя, риса, сорго, кормовых трав и овощных культур. При посевной обработке семян препаратом повышает урожайность кормового сорго на 2,5—3,0 т/га, кормовых трав на 1,0—1,5 т/га. Обработка препаратом увеличивает всхожесть семян, стимулирует рост и повышает устойчивость растений к корневым гнилям и грибным болезням. В последние годы выявлена эффективность препарата при выращивании картофеля. Прибавка урожая клубней составляет 20—30 ц/га. Перспективно применение мизорина для улучшения приживаемости безвирусного картофеля. При применении его в полевых опытах прибавка урожая клубней составляла 17—29%.

Миколин — создан на основе штамма, относящегося к роду *Bacillus, (B. cereus* var. *mycoides).* Бактерии хорошо приживаются в ризосфере капусты и картофеля, проявляя стимулирующее действие на их рост. Особенность используемых бактерий — устойчивость к высоким концентрациям аммиака в почве. Это позволяет получить высокую эффективность препарата при внесении высоких доз азотных удобрений в виде сульфата аммония и мочевины.

Ризоагрин — создан на основе штамма, относящегося к роду *Agrobacterium (A. radiobacter,* штамм 204). В 1 г торфяного препарата содержится 8—12 млрд клеток бактерий. Бактерии хорошо приживаются в ризосфере пшеницы, риса, ряда кормовых злаков и других сельскохозяйственных растений. При использовании этого бактериального препарата урожайность пшеницы повышается на 2—5 ц/га, при увеличении содержания белка на 0,5—1,0%. Расход препарата: зерновые, рис — 600 г. на гектарную норму семян.

Ризоэнтерин — создан на основе штамма, относящегося к роду *Enterobacter (E. aerogenes,* штамм 30). В 1 г торфяного препарата содержится около 6 млрд бактериальных клеток. Представляет собой порошковидный торфяной субстрат, обогащенный питательными веществами с влажностью 45—50%. Расход препарата 300 г на гектарную норму семян. Применяется для повышения урожайности риса, озимой пшеницы и ржи. Получены хорошие результаты при выращивании ячменя. Урожайность его повышается на 2—5 ц/га. В результате формирования активной азотфиксирующей ассоциации бактерий с растением улучшается снабжение последних биологическим азотом.

Флавобактерин создан на основе штамма, относящегося к роду *Flavobacterium sp.* штамм 130. В 1 г торфяного бактериального препарата содержится 5—10 млрд клеток бактерий. Представляет собой порошковидный торфяной субстрат, обогащенный питательными веществами с влажностью 45—50%. Отличительной особенностью препарата является его широкий спектр действия: положительные результаты получены в посевах пшеницы, ячменя, ржи, риса, сорго, кормовых трав, картофеля, капусты, свеклы, огурца, томатов и других. Положительное действие препарата определяет способность бактерий использовать молекулярный азот, стимулировать рост, продуцировать фитогормоны, улучшать минеральное питание, водный обмен и активизировать другие физиологические процессы растений. Использование препарата позволяет получить дополнительно 3—5 ц/га зерна, 20—60 ц/га овощей, 60—70 ц/га сахарной свеклы. При получении безвирусного посадочного материала картофеля и выращивании его в рулонной культуре использование флавобактерина стимулировало приживаемость, увеличивало количество формирующихся микроклубней и снижало поражаемость растений фитофторой. Расход препарата: многолетние злаковые травы — 400 г на гектарную норму семян, зерновые, подсолнечник, кукуруза, сахарная и кормовая свекла — 600 г, для картофеля-1200 г.

На основе представителей рода *Pseudomonas* создан ряд перспективных препаратов, имеющих широкий спектр действия. К их числу относятся: псевдобактерин-2 (на основе штамма *P. aureofaciens* BS 1393) и псевдобактерин-3 (на основе штамма *P. putida* BS 1398). Эффект достигается за счет способности бактерий синтезировать некоторые антибиотические вещества и сидерофоры, связывающие железо и переводящие его в недоступное состояние. Выявлена эффективность против септориоза, бурой ржавчины, твердой головни пшеницы и других болезней. Штаммы продуцируют фитогормоны, которые стимулируют рост растений и переводят труднорастворимые неорганические соединения фосфора в доступные для поглощения корневой системой.

В опытах с картофелем и другими овощными культурами перспективным является применение бактериальных препаратов на основе штаммов рода *Serratia (S. marcescens,* штамм 218 Lg). В каждом грамме приготовленного на их основе торфяного препарата содержится не менее 6 млрд клеток, в жидком препарате — не менее 10 млрд клеток в 1 мл. Расход торфяного препарата на гектарную норму посадочных клубней составляет около 3 кг. Бактериальные препараты на основе серратии проявили эффективность на овощных культурах за счет хитинолитической способности отобранных штаммов по отношению к некоторым патогенам, в частности к фузариозной инфекции.

За последние годы во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХ была разработана новая группа биопрепаратов комплексного дейст-

вия — экстрасол, являющаяся частью устойчивого биоорганического земледелия. В состав биопрепаратов экстрасол входят следующие представители почвенных и ризосферных бактерий: *Arthrobacter mysorens* K, *Flavobacterium sp.,* L20, *Agrobacterium radiobacter* 204, *Azomonas agilis* 12, *Bacillus subtilis* 4—13, *Pseudamonas fluorescens* 2137, *Azospirillum lipoferum* 137. Для изготовления препаратов указанной серии используют индивидуальные штаммы или несколько видов (ассоциаций) применительно для данного вида или сорта растения. Выпускается экстрасол в трех модификациях: экстрасол-90 — фунгицидного действия, экстрасол-09 — стимулирующего действия и экстрасол-55 — фунгицидно-стимулирующего действия.

Указанные выше биопрепараты безвредны для человека, животных и насекомых, не оказывают какого-либо вредного воздействия на окружающую среду.

17.5. Другие микробные землеудобрительные биопрепараты

Для практического использования предложен бактериальный землеудобрительный препарат фосфоробактерин. Действующим началом в нем служит спороносная бактерия *Bacillus megaterium,* способная разрушать фосфорорганические соединения и переводить их в доступную для растений форму. *B. megaterium* легко образует споры, которые после размножения культуры смешивают с инертным наполнителем. В жизнеспособном состоянии споры могут сохраняться длительное время.

Фосфоробактерин наносят на семена перед посевом. Предполагается, что в почве бактерии переходят на развивающуюся корневую систему растений. Здесь их размножение и биохимическая деятельность вызывают разложение органических соединений фосфора, что улучшает питание растений.

Препарат оказывает положительное влияние на рост растений и увеличивает урожай примерно на 10%. Вместе с тем оказалось, что эффективность фосфоробактерина на почвах, удобренных суперфосфатом, не снижается, как это можно было ожидать, а, наоборот, часто возрастает.

Установлено, что фосфоробактерин усиливает рост корневой системы растений. Это можно объяснить тем, что *B. megaterium* вырабатывает биологически активные вещества, среди которых имеются тиамин, пиридоксин, биотин, пантотеновая и никотиновая кислоты, витамин B_{12} и другие соединения. Эти вещества несколько усиливают рост растений на первых этапах развития.

Для высвобождения калия из алюмосиликатов в целях улучшения питания растений *В. Г. Александров* предложил использовать препарат «силикатных» бактерий, который представляет собой спорообразующую культуру — *Bacillus mucilaginosus* var. *siliceus.*

Разрушение алюмосиликатов происходит под влиянием разных кислот и даже диоксида углерода, образуемого микроорганизмами. Это неспецифический процесс. Гидролиз силикатов под влиянием, например CO_2 (угольный кислоты), идет по следующей схеме:

$$K_2Si0_3 + H_2CO_3 = K_2CO_3 + H_2Si0_3 = K_2CO_3 + H_2O + SiO_2$$

Препарат «силикатных» бактерий применяют для бактеризации семян, так как предполагается, что при прорастании семян микроорганизм будет размножаться в ризосфере растений. Однако бациллы в зоне корней растений размножаются плохо, поэтому предложенную культуру нельзя признать удачной. В производственных опытах препарат «силикатных» бактерий дает небольшие и нестабильные прибавки урожая, поэтому он не получил широкого применения.

Препарат АМБ предложен *Н. М. Лазаревым* для активации биодинамики окультуриваемых почв северной зоны. Готовят препарат на месте использования из измельченного низинного торфа или торфяной почвы. На 1 т торфа прибавляют 100 кг мелко раздробленного известняка, 2 кг фосфоритной муки и 1 кг маточной культуры. Полученный компост увлажняют и выдерживают в теплом помещении при температуре около 20 °С в течение трех недель, периодически перелопачивая. На 1 га вносят 0,5 т компоста.

В состав маточной закваски препарата АМБ входит большой комплекс микроорганизмов (аммонификаторы, целлюлозоразлагающие микроорганизмы, автохтонная микрофлора и т. д.).

Препарат целесообразнее применять в защищенном грунте. Однако в связи со сложностью изготовления широко его не используют.

В настоящее время в сельском хозяйстве применяется целый ряд биопрепаратов, активизирующих почвенно-микробиологические процессы.

Бактогумин — отселекционированный биопрепарат микроорганизмов комплексного действия. Биопрепарат предназначен для изготовления биологически активных: грунтов, Используемых для выращивания овощных и цветочных культур в теплицах. Биологически активные грунты способствуют ускоренному разложению пестицидов, снижению их токсичности и оздоровлению грунтов за счет антагонизма микроорганизмов биопрепарата к фитопатогенам.

Бамил — биоудобрение из отходов животноводческих комплексов. Бамил содержит значительное количество органического азота, фосфора, широкий набор микроэлементов. Основным исходным компонентом бамила является высушенная микробная биомасса, полученная при переработке животноводческих отходов. Бамил наиболее эффективен на овощных культурах в закрытом грунте, где он повышает урожай на 40—60%. При этом значительно улучшается качество продукции.

Биотрон — комплексный биопрепарат почвенных микроорганизмов, применяемый под овощные и плодовые культуры (производство США).

Е-2001 — комплексный биопрепарат почвенных бактерий, применяемый под овощные культуры (производство Греции).

17.6. Микоризация растений

В некоторых случаях существенное значение имеет заражение растений грибами-микоризообразователями, или микоризация растений. На полевых сельскохозяйственных культурах нормальная микориза обычно формируется без специальной инокуляции. Это свидетельствует о широком распространении грибов-микоризообразователей и, по существу, снимает вопрос о дополнительном заражении высеваемых семян.

Сложнее обстоит дело с микоризацией сеянцев и саженцев древесных пород. В лесной зоне грибы-симбионты деревьев широко распространены в почве. Однако на юге, где лесная растительность встречается редко, ее нет.

Г. Н. Высоцкий, А. В. Бараней и другие пришли к заключению, что при посадке леса на черноземах, темно-каштановых и других южных почвах, где длительное время не было лесных насаждений, следует вносить почву, содержащую грибы-микоризообразователи. Для этого берут лесную почву из одноименного насаждения (на 1 га посадок 30—50 кг почвы). Еще лучше вносить лесную почву перед посевом под семена в лунки, по 25—50 г в каждую.

Одновременное внесение органических и минеральных удобрений, особенно фосфорных, значительно улучшает развитие микоризы и рост растений. Микоризация, несомненно, полезна при рекультивации земель, так как создаваемый поверхностный слой обычно беден микроорганизмами. В таких случаях микоризация нужна как древесной, так и травянистой растительности. В Великобритании хорошие результаты получены при микоризации посевов клевера ползучего (белого), высеваемого на бедных фосфором горных торфяных почвах.

Искусственное культивирование грибов-микоризообразователей не удается, поэтому из них нельзя готовить соответствующие препараты. В целом вопрос о микоризе растений, в том числе культурных, изучен пока недостаточно. В будущем, вероятно, будут выявлены наиболее продуктивные симбионты многих других культурных высших растений для использования в сельском хозяйстве.

Контрольные вопросы и задания

1. Где и когда применили препараты клубеньковых бактерий для заражения бобовых культур? 2. Объясните положительный результат заражения бобовых растений специфичными культурами *Rhizobium* на окультуренных почвах. 3. Бактерии каких родов используют при создании землеудобрительных препаратов? 4. В каких случаях проводят микоризацию растений?

Глава 18. Применение микроорганизмов и микробных биопрепаратов для борьбы с болезнями и вредителями сельскохозяйственных растений

18.1. Микробы-антагонисты и их применение для защиты растений

Известно, что болезни растений распространены широко и причиняют существенный вред сельскому хозяйству. Для борьбы с ними используют химические средства, а также более безопасные для окружающей среды биологические методы.

Освобождению почвы от фитопатогенных организмов способствует усиление размножения в ней микробов-антагонистов по отношению к возбудителям тех или иных заболеваний. Например, после посева люцерны почва очищается от возбудителя вертициллезного вилта хлопчатника (*Verticillium dahliae)*. Очевидно, это объясняется не только тем, что корневая система люцерны выделяет в почву алкалоиды, угнетающие многие микроорганизмы, но и тем, что она стимулирует размножение в почве антагонистов возбудителя вертициллеза. Подобными свойствами обладают и растения рапса, промежуточная культура которого может быть использована на юге между посевами других культур.

Возделывание некоторых растений, например клевера и вики, способствует освобождению почвы от возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis;* житняк, картофель, наоборот, благоприятствуют размножению этой бактерии. Таким образом, в принципе возможна борьба с болезнетворными микробами почвы путем введения в севооборот тех или иных растений. Однако для широкого практического применения этого приема необходима его экспериментальная доработка.

Внимание микробиологов привлекает использование микробов-антагонистов для лечения растений. На грибах-паразитах нередко паразитируют другие грибы, так называемые *грибы-паразиты второго порядка*. Так, на мучнисторосяных грибах паразитирует пикнидиальный гриб *Cicinnobolus cesati;* на возбудителе бурой ржавчины пшеницы *Puccinia triticina* — также пикнидиальный гриб *Darluca filum*. Эксперименты с грибами-паразитами второго порядка, которых наносили в виде водных суспензий на поверхность расте-

ний в профилактических целях или при борьбе с заболеваниями, дали обнадеживающие результаты. Однако для профилактических целей перечисленные микроорганизмы пока не применяют.

Хороший эффект дают культуры микробов-антагонистов при обработке семян, зараженных фитопатогенами, или при внесении на поверхность вегетирующих растений, а также в зараженную почву. Микроб-антагонист, уничтожая вредителя, не причиняет вреда растению-хозяину. Микробы-антагонисты угнетают фитопаразитов не только в зоне корня. Вырабатываемые ими антибиотики проникают в ткани растений, повышая их устойчивость к возбудителям болезней.

Я. П. Худяков (1935) выделил бактерии рода *Pseudomonas,* лизирующие мицелий фитопатогенных грибов *Sclerotinia* и *Botrytis.* Этих микробов-антагонистов успешно использовали в полевых опытах для борьбы с фузариозом пшеницы, льна и т. д. Культурой *Pseudomonas* бактеризовали семена растений. Оздоровлению сеянцев и саженцев сосны способствовало применение Н. А. Красильниковым миколитических бактерий для борьбы с фузариозом. Как уже было отмечено, культура *Azotobacter chroococcum* предупреждает заболевания сельскохозяйственных растений, вызываемые рядом грибов, например *Altemaria.*

Успешно бороться с мучнистой росой крыжовника, вызываемой грибом *Sphaerotheca morsuvae,* позволяет опрыскивание растений настоем навоза. Это стимулирует размножение микроорганизмов на поверхности растения. В составе эпифитной микрофлоры находятся бактерии-антагонисты, которые после такого опрыскивания начинают размножаться.

Микробов-антагонистов, вероятно, можно использовать не только против возбудителей болезней растений, но и против растений-паразитов культурных растений. Так, положительные результаты были получены при борьбе с заразихой арбуза (*Orobanche aegiptyaca)* с использованием патогенного для заразихи гриба *Fusarium orobanches.* Чистая культура указанного гриба, размноженная на питательном субстрате (кукурузная мука и т. д.), предложена для практического применения.

Не исключена возможность подбора микробных культур, действующих как гербициды на определенные группы сорных растений.

Культуры некоторых грибов-антагонистов применяют в борьбе с почвенной инфекцией. Установлено, что грибы рода *Trichoderma* выделяют токсичные вещества, поражающие микробов-фитопаразитов. При внесении в почву культуры *Trichoderma lignorum* существенно уменьшается увядание хлопчатника, пораженного *Verticillium albo-atrum,* снижаются грибные заболевания картофеля и других сельскохозяйственных культур. Вносят культуру указанного гриба

в почву при посеве растений. На основе культуры *Trichoderma lignorum* готовят препарат триходермин.

Кратко остановимся на технике использования микробов-антагонистов. Для обеззараживания семена опрыскивают культурой микроорганизмов, разведенной в воде. Стерилизуется не только поверхность семени, но и зона корня, куда переходят микроорганизмы и начинают там размножаться. При высадке рассады и саженцев их корни смачивают взвесью в воде соответствующих микробов-антагонистов. Водную взвесь микробов можно использовать и для опрыскивания надземных частей поврежденных растений, а также для профилактических целей.

Препараты для борьбы с почвенной инфекцией типа триходермина вносят в почву при посеве. Однако пока микробы-антагонисты систематического применения в сельском хозяйстве не получили.

Широко используют микробиологический метод борьбы с грызунами — домашними мышами, полевками, крысами. Известно несколько культур микроорганизмов, вызывающих у грызунов кишечные заболевания, напоминающие брюшной тиф. Для человека и домашних животных данные микроорганизмы безопасны.

Впервые бактерию мышиного тифа — *Bacterium typhimurium* — выделил в 1892 г. в Германии *Ф. Леффлер.* Позднее *С. С. Мережковский,* Б. Л. Исаченко и другие ученые обнаружили ряд близких форм микроорганизмов. Эти бактерии относятся к роду *Salmonella* (семейство *Enterobacteriaceae),* они патогенны для человека и животных.

18.2. Применение антибиотиков для защиты растений

Среди микроорганизмов-антагонистов выявлены виды, угнетающие рост других микроорганизмов при помощи вырабатываемых ими веществ, называемых антибиотиками. Каждый антибиотик имеет свой характерный спектр действия, т. е. подавляет развитие определенной группы микроорганизмов.

Антибиотики отличаются друг от друга характером воздействия на микроорганизмы. Одни из них приостанавливают рост микроорганизмов или оказывают бактериостатическое действие, другие убивают микробные клетки, т. е. действуют бактерицидно, третьи вызывают не только гибель, но и лизис микробных клеток. Часто воздействие антибиотика меняется в зависимости от его дозировок.

На практике антибиотики стали применять в 40-х гг. XX столетия. Однако явление антагонизма у микроорганизмов было известно давно. Еще Л. Пастер отметил угнетение сибиреязвенной бациллы *(Bacillus anthracis)* культурой синегнойной палочки *{Pseudomonas*

aeruginosa), И. И. Мечников изучал явление антагонизма у кишечной микрофлоры и т. д.

В последнее время внимание исследователей привлекает использование для борьбы с некоторыми болезнями растений антибиотических веществ, имеющих ряд преимуществ по сравнению с химическими. Химические препараты вредно действуют не только на фитопаразитов, но и на высшие растения и микрофлору почвы, в то время как антибиотики обладают селективным действием — убивают вредителя и не вредят растению, в некоторых случаях оказывая даже стимулирующее действие. Среди антибиотиков могут быть и вещества, токсичные для растений, их не следует использовать в защите растений.

Применение в сельском хозяйстве антибиотиков медицинского назначения также опасно. Это может содействовать появлению резистентных форм патогенных для человека и животных микроорганизмов. Поэтому микробиологи изыскивают антибиотики, которые могут быть использованы в растениеводстве.

Антибиотические препараты широко применяют в мире. В России готовят препарат трихотецин из культуры гриба *Trichothecium roseum*. Этот препарат хорошо действует против корневых гнилей пшеницы и ячменя, а в теплицах — против мучнистой росы огурца. Используют также фитобактериомицин (ФБМ), продуцентом которого является *Streptomyces lavandula*. Препарат применяют для обработки семян фасоли и сои в борьбе с бактериозами; семян пшеницы — против корневых гнилей. Препарат триходермин используют для борьбы с вилтом хлопчатника. Продуцент этого препарата — гриб *Trichoderma lignorum*.

Представляет интерес отечественный препарат гризин — продуцент *Streptomyces griseus,* — эффективный в борьбе с рядом грибных и бактериальных болезней растений (гоммоз хлопчатника, бактериальное увядание абрикоса и т. д.). Он обладает также стимулирующим действием на растения.

За рубежом используют валидомицин — (продуцент *S. hygroscopicus),* — специфично активный против фитопатогенных грибов рода *Rhizoctonia,* вызывающих увядание листового влагалища риса. Данный антибиотик применяют также при борьбе с черной паршой и коричневой гнилью картофеля.

В США и Японии выпускают несколько препаратов, содержащих антибиотик актидион (циклогексимид), который готовят на основе *S. griseus*. Упомянутые препараты активны против ржавчины сосны, вилта дуба, цитоспороза персика и сливы, мучнистой росы роз. Препараты на основе актидиона используют при заболеваниях пшеницы и кукурузы, вызываемых грибами родов *Fusarium, Helmintosporium,* против твердой и пыльной головни ячменя, стеблевой ржавчины пшеницы и т. д.

В Японии для предупреждения заболевания риса очень опасной грибной болезнью — пирикуляриозом и для лечения больных посевов широко используют антибиотик бластицидин S, продуцентом которого является актиномицет *Streptomyces griseochromogenes*. Однако этот антибиотик дает соединение, которое в 10—100 раз токсичнее ртутно-органических препаратов. При частой обработке посевов он вызывает некротичную пятнистость листьев риса и небезвреден для людей.

Поэтому сейчас для борьбы с пирикуляриозом чаще используют другие антибиотики, особенно касугомицин (касумин), который получают из культуры *S. casugoensis*. Упомянутый антибиотик убивает также ряд грибов, поражающих овощные, технические культуры и плодовые насаждения, он нефитотоксичен, безвреден для людей и животных.

Против увядания листового влагалища риса, альтернариоза груши и яблони в Японии применяют и антибиотик полиоксин. Помимо отмеченных для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами, за рубежом выпускают и другие антибиотики, продуцентами которых служат преимущественно актиномицеты и грибы.

18.3. Использование микробных биопрепаратов для борьбы с насекомыми-вредителями сельскохозяйственных культур

Насекомые тоже болеют — это известно давно. Еще *Аристотель* (IV в. до н. э.) описал болезнь пчел. Итальянский ученый *А. Басси* в 30-х гг. XIX в. обнаружил болезнь тутового шелкопряда, возбудителем которой был гриб, названный им *Botrytis paradossa*. Это была белая мускардина *Beauveria bassiana*. Басси выяснил способ переноса инфекции и условия, способствующие заражению шелкопряда, что позволило рекомендовать средства борьбы с данной болезнью. Таким образом, А. Басси следует признать первым патологом насекомых. В 60-х гг. XIX в. Л. Пастер установил, что ряд заболеваний шелковичного червя имеет инфекционный характер. Некоторые из них вызывают бактерии.

Несколько позднее И. И. Мечников, работая в Пастеровском институте, также столкнулся с бактериальными заболеваниями насекомых. Он считал возможным практическое использование паразитов насекомых и писал, что на них следует возлагать большие надежды для защиты растений. В интересах сельского хозяйства следует распространить эпизоотии среди вредителей и таким образом бороться с возможными потерями урожая. И. И. Мечников обнаружил у личинок хлебного жука *Anisoplia austriaca* — опасного вредителя зерновых культур — болезнь, вызываемую зеленой мускардиной *Metarrhizium anisopliae* и грибом *Entomophthora anisopliae.*

В 1892 г. сотрудник Пастеровского института *И. М. Красильщик* из больных личинок хлебного жука выделил две энтомопатогенные бактерии — *Bacillus tracheites sivegraphitosis* и *B. septicus insectorum*. Наблюдения других исследователей также показали, что насекомые могут страдать от инфекционных заболеваний, возбудителями которых служат бактерии, грибы и вирусы. Все это обусловило использование микроорганизмов для борьбы с насекомыми — вредителями сельскохозяйственных культур или для биологического контроля вредных насекомых.

Целесообразность микробиологического метода заключается в том, что энтомопаразиты вызывают заболевание какой-то узкой группы насекомых-вредителей. Для человека и прочих разнообразных представителей зооценоза используемый микроорганизм совершенно безопасен.

Кроме того, болезни насекомых принимают характер эпизоотий и широко распространяются. Химические же средства защиты растений действуют локально и нередко загрязняют окружающую среду.

В первой половине XX в. культуры патогенных для насекомых бактерий стали применять на практике и в ряде случаев получили хорошие результаты. Особенно больших успехов добился сотрудник Пастеровского института *С. Метальников* в борьбе с вредителями некоторых сельскохозяйственных культур, в том числе хлопчатника. Он испытывал смеси микроорганизмов против разных вредителей сельскохозяйственных культур. Высокая эффективность биопрепаратов Метальникова, очевидно, объясняется тем, что в их состав входит культура *Bacillus thuringiensis,* выделенная в 1915 г. немецким ученым *Е. Берлинером*. К токсину, образуемому данной бактерией, чувствительны многие чешуекрылые.

Работы по дальнейшему совершенствованию микробиологического метода борьбы с насекомыми-вредителями широко проводятся в настоящее время как в нашей стране, так и за рубежом.

Ряд бактерий, грибов и вирусов нашли распространение в качестве промышленных биоинсектицидов.

Бактерии. Описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая часть принадлежит к семействам *Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae* и *Bacillaceae*.

Большинство промышленных штаммов бактерий принадлежит к роду *Bacillus,* основная часть широко распространенных биопрепаратов изготовлена из *Bacillus thuringiensis.* Представители этого вида токсичны для бабочек, жуков и двукрылых. Штаммы *B. thuringiensis* используются также для борьбы с вредителями — гусеницами, комарами и мошкой. Второй промышленный вид — *Bacillus popilliae* — используется для борьбы с японским хрущиком. Третий микроорганизм, *Bacillus sphaericus,* характеризуется высокой патогенностью и применяется для борьбы с комарами.

В настоящее время в мире выпускается более 50 биопрепаратов, используемых для борьбы со 160 видами насекомых. При этом более 30 биопрепаратов производится на основе *B. thuringiensis.* Такое повышенное внимание к данному организму объясняется его высокой инсектицидностью.

Клетки *B. thuringiensis* образуют устойчивые споры и белковый кристалл. Кристалл, или параспоральное тело, содержащее эндотоксин, становится инсектицидным после переваривания благодаря воздействию щелочной среды и протеаз в средней кишке восприимчивых видов насекомых. Освобожденный эндотоксин атакует эпителиальную выстилку кишечника насекомых, разрушая мембрану, что приводит к разрушению стенки кишечника; его содержимое смешивается с гемоцелем, и вскоре наступает смерть насекомого.

Ниже приводятся краткие характеристики и назначения **основных инсектицидных биопрепаратов, разработанных в нашей стране** Для борьбы с вредными насекомыми в России выпускаются следующие биопрепараты:

- битоксибациллин, дендробациллин, лепидоцид, бацикон — для контроля численности вредных видов насекомых (колорадского жука, совок, белянок, шелкопрядов и др.), которые заменяют многие химические инсектициды;
- бактокулицид — для подавления численности личинок кровососущих комаров в водоемах;
- бактороденцид — бактериальный препарат для контроля численности мелких мышевидных грызунов — вредителей на посевах, складах, овощехранилищах;
- актинин — актиномицетный препарат, предназначенный для борьбы с паутинным клещом в закрытом грунте.

Применение препаратов позволяет сохранить нецелевые объекты (рыб, полезных насекомых, энтомофагов, опылителей). Они безопасны для человека и теплокровных животных, способствуют уменьшению пестицидной нагрузки на природу и человека, оберегают ландшафты, водные ресурсы, обеспечивают получение экологически чистой сельскохозяйственной продукции.

Битоксибациллин (БТБ). Микробный биопрепарат на основе *B. thuringiensis* (H-1) subsp. *thuringiensis* широко используется в СНГ в качестве биологического средства защиты растений от вредных насекомых и в первую очередь против колорадского жука *(Leptinotarsa decemlineata)* и совок *(Noctuidae)*. Препарат предназначен для борьбы с вредителями: на овощных культурах и картофеле (колорадский жук, белянки, моли, капустная совка, луговой мотылек); хлопчатнике (хлопковая, озимая совка, карадрина); плодово-ягодных культурах (ягодная и плодовая моли, боярышница, американская белая бабочка, листовертки, шелкопряды, пяденица, златогузки, крыжовниковая огневка, пилильщики, паутинный клещ); розе эфиромасличной (листовертки, пяденицы); хмеле (хмелевая тля, листогрызущие соки луговой и стеблевой мотыльки); лекарственных растениях, например — ревень тангузский, паслен дольчатый (озимая совка), шиповник (листовертки); ромашка аптечная (луговой мотылек).

Технология производства битоксибациллина разработана во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Производство препарата осуществляется промышленным способом на Бердском заводе биопрепаратов.

БТБ относится к веществам с малой токсичностью для теплокровных (ЛД 50 равен 6—9 г/кг). Препарат безвреден для человека, теплокровных животных, а также рыб и других гидробионтов.

При применении в сельском хозяйстве БТБ не накапливается в почве, воде и на растениях, не загрязняет окружающую среду. В применяемых дозах препарат является слаботоксичным для насекомых-энтомофагов, распространенных на картофеле, хлопчатнике, в производственных дозах не оказывает токсического действия на пчел.

Бацикол. Новое бактериальное средство борьбы с вредными жуками на основе *B. thuringiensis.* Выпускается в режиме опытного производства. Бацикол — высокоспецифическое средство, безопасное для нецелевых объектов (в том числе насекомых-энтомофагов). Эффективен против колорадского жука, крестоцветных блошек, пьявицы. Изучение спектра его действия продолжается. Перспективен в качестве защиты капусты от крестоцветных блошек.

Бактокулицид. Высокоэффективное бактериальное ларвицидное средство борьбы с кровососущими комарами, мошками, рисовым комариком непосредственно в водоемах. Основным достоинством препарата является избирательность инсектицидного действия. Бактокулицид специфически действует на личинок комаров, мошек, рисового комарика и не оказывает отрицательного действия на другие группы насекомых. Установлено его действие на личинок комаров более 70 видов из 12 родов. Бактокулицид — высокоселективное средство, абсолютно безопасное для человека, скота и других теплокровных животных, рыб, тутового шелкопряда, пчел и других полезных насекомых, нецелевых гидробионтов.

Бактокулицид вызывает полную гибель личинок комаров рода *Aedes* в дозе 0,5—1 кг/га, *Culex* — 0,5 кг/га, *Anopheles* — 1,5—2 кг/га водной поверхности через 48—72 часа после обработки. Хорошо себя зарекомендовал в различных эколого-географических регионах, естественных и искусственных водоемах различного типа, в том числе затопляемых подвалах жилых домов, метрополитене и т. д. Успешные результаты получены при испытании бактокулицида против личинок малярийных комаров в субтропической и тропической зонах (Индия, Шри-Ланка). Актуальность применения бактокулицида определяется широким распространением малярии в этих странах.

Актинин — экологически чистый акарицидный препарат. Он безвреден для акарифагов, энтомофагов, пчел. Безопасен для человека и теплокровных животных. Не фитотоксичен. Использование актинина позволит сократить масштабы химических обработок, щадя тем самым природу и здоровье человека. Отличительная черта актинина — очень высокая эффективность. Доза его применения — 30 граммов на 1 га.

Бактороденцид. Микробный препарат на основе *Salmonella enteriditis* var. *Issatschenko* широко используется для борьбы с мышевидными грызунами — домашними мышами, полевками, крысами. Человек и домашние животные невосприимчивы к данному микроорганизму. Для борьбы с грызунами размноженную культуру бактерий наносят на хлеб или на ней замешивают тесто. При изготовлении приманок используют и другие продукты. Продукты раскладывают в норах или других наиболее посещаемых

грызунами местах. Бактериальный способ борьбы с грызунами дешев и имеет преимущества перед химическим, так как он безвреден для человека, домашних животных, хищных птиц и мелких хищников (ласка, хорь и.т. д.). Эффективность метода высока.

За рубежом выпускается целый ряд микробных биопрепаратов инсектицидного действия, созданных главным образом на основе *B. thuringiensis*.

Следует подчеркнуть, что в целом применение биопрепаратов защитного действия не дороже химических, а зачастую и дешевле.

Грибы. Известно более 400 видов грибов, поражающих насекомых и клещей, в том числе вредителей сельского хозяйства. Больше всего полезных для человека видов имеется среди дейтеромицетов и фикомицетов. Грибы обычно заражают насекомых путем прямой инвазии и, следовательно, способны вредить своим хозяевам, не будучи ими съеденными. Кроме того, один из основных признаков грибов — их способность спорулировать в мертвом теле хозяина. Таким образом, они могут распространяться в популяции, вызывая эпизоотии. Они не только губят те особи, на которых поселяются, но и контролируют численность всей популяции хозяина в течение длительного периода. К сожалению, эффективность грибов в достаточной степени зависит от влажности и температуры. Если влажность или температура сильно отличаются от оптимального значения, угнетение вредителей будет слабым и желаемая эпизоотия вряд ли начнется.

По этой причине некоторые из ныне существующих промышленных биоинсектицидов на основе грибов нацелены против тепличных и оранжерейных вредителей, поражающих внесезонные овощи и цветы. Несмотря на указанные ограничения, грибы обещают быть экономически выгодными биопестицидами. Ряд грибов уже сейчас широко используется либо исследуется. В частности, применяется *Metarrhisium anisopliae*. Это наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный около 100 лет назад как зеленый мускатный гриб. Он был также первым грибом, который стали производить в промышленных масштабах. Используя отростки, проникающие через эпикутикулу, грибы образуют субэпикутикулярную бляшку, из которой прорастают гифы. Пораженное насекомое погибает, а гриб спорулирует на его останках. *M. anisopliae* поражает разные группы насекомых.

Уже много лет в нашей стране используется гриб ***Beauveria bassiana*** в виде промышленного биопрепарата боверина. Он был объектом интенсивных экспериментов в США и других странах и оказался почти таким же эффективным, как и лучшие из доступных биоинсектицидов. После заражения насекомого *B. bassiana* выделяет боверицин, токсин, вызывающий его гибель. По химической природе токсин является циклодепсипептидом.

Биопрепарат «Боверин» применяют против колорадского жука, также против других видов вредителей сельскохозяйственных растений (гусениц

бабочек соснового и тутового шелкопряда, яблонной плодожорки, стеблевого мотылька, репной белянки, свекловичного долгоносика, вредной черепашки и других).

Entomophthora thaxteriana. На основе этого гриба создан препарат энтомофторин. Этот препарат особенно эффективен против тлей в условиях теплиц и оранжерей.

Verticillium lecanii. На основе этого энтомопатогенного гриба успешно выпускаются промышленные биопрепараты. Эти препараты в условиях оранжерей могут контролировать численность тлей и алейродид. Успешные испытания были проведены во многих странах. Например, в Англии на основе *V. lecanii* выпускаются два биопрепарата: микотел и вартолек; препараты содержат споры гриба и могут храниться 6 месяцев.

Вирусы. Описано свыше 1200 вирусных болезней насекомых, причем три четверти из них приходится на болезни чешуекрылых. Основное внимание было обращено на одну группу вирусов—возбудителей болезней насекомых, это — бакуловирусы. В этой группе отсутствовали вирусы, патогенные для позвоночных.

Бакуловирусы — двухцепочечные ДНК-вирусы, среди которых биопестициды образуются в трех группах: вирусы ядерного полиэдроза (ВЯП), вирусы гранулеза (ВГ) и фильтрующиеся вирусы. Они заражают насекомых, будучи съеденными; восприимчивость многих видов насекомых варьирует на несколько порядков в зависимости от возраста насекомых. Эффективность вирусных препаратов определяется временем и частотой применения, дозой, методом и скоростью обработки. Наибольшее практическое значение имеют вирусы ядерного полиэдроза **(ВЯП)** и вирусы гранулеза (ВГ). В настоящее время на основе вирусов ядерного полиэдроза создано несколько вирусных биопрепаратов: Вирин-КШ, Вирин-ЭНШ, Вирин-ОС, Вирин-ХС и Вирин-ЭКС, рекомендованных для применения против капустной, озимой и хлопковой совок, непарного и кольчатого шелкопряда, американской белой бабочки, соснового пилильщика, яблонной плодожорки.

В США на основе вируса ядерного полиэдроза выпускают биопрепарат элькар, эффективный против шести видов совок. Вирусные препараты на основе вируса гранулеза широко используются в Англии, США, Канаде, Швейцарии и других странах. Узкое место вирусных биопрепаратов — технология их производства. Будучи облигатными патогенами, вирусы размножаются только в живом организме — в насекомых-вредителях и в меньшей степени в культуре клеток. Однако считается, что будущее в борьбе с вредными насекомыми принадлежит вирусным биопрепаратам.

В последние годы в биотехнологии биоинсектицидов стало развиваться новое направление — создание биопрепаратов на основе **протозойных** микроорганизмов. В США разработан биопрепарат на основе микроспоридий *Nosema locustae,* который эффективно используется против саранчовых. Разведение *N. locustae,* являющегося облигатным паразитом, осуществляется в промышленных масштабах на живых кузнечиках или в культуре клеток насекомых. В настоящее время исследователи работают над новой проблемой — созданием химических средств защиты растений путем микробного синтеза. Вещества с подобной активностью описаны среди продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, в частности это *B*-экзотоксин *B. thuringiensis,* действующий на представителей бабочек, жуков, перепончатокрылых, двукрылых, прямокрылых. На основе *B*-экзотоксина в США разработан препарат, который применяется против колорадского жука.

18.4. Стимуляция роста растений биологически активными веществами

В 1880 г. была опубликована книга *Ч. Дарвина* «Способность к движению у растений», в которой он впервые описал вещество, образующееся в верхушках проростков овса и канареечной травы и регулирующее рост указанных растений.

После работы Дарвина потребовалось еще полвека исследований, прежде чем сформировались теоретические и экспериментальные основы науки о биологически активных веществах растений.

Вещества, влияющие на рост растений, вырабатывают многие как сапротрофные, так и паразитические микроорганизмы. По химической природе эти соединения весьма разнообразны, но в основном представлены безазотными и сравнительно низкомолекулярными веществами. Вырабатываемые микроорганизмами регуляторы роста можно разделить на следующие четыре группы. Первая группа — **гиббереллины.** Они были выделены в 1926 г. *Е. Куросавой* из гриба *Gibberella fujikuroi,* поражающего рис и вызывающего его гигантский рост («баканое»). *Gibberella fujikuroi* представляет собой конидиальную стадию гриба *Fusarium moniliforme*. Гиббереллоподобные вещества найдены и у растений. Они стимулируют рост и цветение, выход из состояния покоя и т. д.

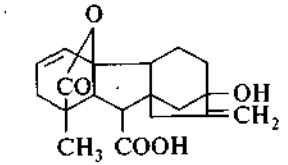
Вторая группа — **ауксины.** Открыты *Ф. Кеглем*. Они имеются у растений и микроорганизмов и влияют на рост клеток в фазе растяжения, на дифференцировку ксилемы и закладку корней, цветение и т. д.

Третья группа — **кинины.** Это вещества, стимулирующие клеточное деление и влияющие на другие ростовые процессы.

Четвертая группа — **биогенные ингибиторы.** Это сложные вещества, обладающие способностью подавлять активность ауксинов и тормозить рост растений. Они входят в систему, управляющую покоем семян и почек. В группу относят вещества, задерживающие прорастание картофеля и корнеплодов сахарной свеклы при хранении, а также этилен и абсцизовую кислоту.

Биологически активные вещества широко применяют в сельскохозяйственной практике. Большинство из них получают химическими методами, за исключением гиббереллина, который вырабатывается лишь микробиологическим путем.

Гиббереллины составляют большую группу родственных соединений. Насчитывается до 60 веществ этого типа. Наиболее характерное соединение группы имеет следующую структуру:

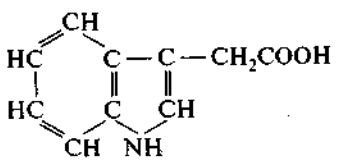


Гиббереллловая кислота
(гиббереллин А)

Гиббереллины обладают поразительно высокой физиологической активностью. Раствор, в котором на миллион частей воды приходится лишь одна часть данного вещества, оказывает сильное стимулирующее действие на рост растений. Гиббереллины наиболее сильно стимулируют рост стеблей, побегов, листьев, плодов, в меньшей степени — рост корней. Рост стеблей и побегов происходит вследствие удлинения междоузлий или увеличения их числа. Под влиянием гиббереллинов увеличивается урожай вегетативной массы растений, ускоряется цветение и плодоношение.

Применение гиббереллинов дает хороший результат на виноградниках. Опрыскивание соцветий бессемянных сортов приводит к значительному увеличению размеров ягод и гроздей. Влияние гиббереллина на эти сорта винограда столь велико, что основное количество выпускаемого препарата используют в виноградарстве.

Из фитогормонов, вырабатываемых почвенными микроорганизмами, в том числе находящимися в ризосфере, следует упомянуть ауксины, представителем которых может служить гетероауксин, или *B*-индолилуксусная кислота:



Гетероауксин применяют для улучшения образования корней у черенков плодовых и ягодных культур и более быстрого укоренения. Получают это соединение химическим путем.

Контрольные вопросы и задания

1. Расскажите о перспективах использования микробов-антагонистов против возбудителей болезней растений и растений-паразитов. 2. Каковы особенности применения антибиотиков в сельском хозяйстве? 3. Каковы преимущества использования энтомопаразитов в борьбе с вредителями растений?

Использование продуктов микробного синтеза для кормления животных

Корма, содержащие недостаточно протеина, незаменимых аминокислот и витаминов, неэффективны и невыгодны. В условиях интенсивного ведения хозяйства важно не только обеспечить достаточное производство кормов, но и получать корма с высоким содержанием белка и сбалансированные по аминокислотному составу.

19.1. Синтез кормового белка и аминокислот

Белковый и аминокислотный обмен различны у жвачных и нежвачных животных. У последних желудок однокамерный, и микроорганизмы желудочно-кишечного тракта проявляют активность в кишечнике. Существенные синтетические процессы микробиологического характера в желудке нежвачных животных не протекают. Под влиянием желудочного сока здесь из белков корма образуются аминокислоты и осуществляется реакция переаминирования. Однако такие незаменимые аминокислоты, как лизин, треонин, аргинин, в результате переаминирования не синтезируются вовсе или синтезируются в таком малом количестве, что не имеют практического значения. Поэтому для нежвачных животных перечисленные аминокислоты в необходимых количествах должны присутствовать в пищевом рационе.

Жвачные животные менее требовательны к полноценности белков корма, так как обитающая в их преджелудках богатая микрофлора синтезирует даже из простых, содержащих азот веществ все аминокислоты, в том числе и незаменимые. Микроорганизмы синтезируют белок в своих клетках, после отмирания которых аминокислоты освобождаются и становятся достоянием животного-хозяина.

Указанная особенность жвачных животных позволяет для частичного восполнения дефицита белков использовать в их рационе содержащие азот простые химические вещества — мочевину и соли аммония. В рубце жвачных животных микроорганизмы синтезируют в больших количествах глутамин, глутаминовую кислоту, глицин и валин. Последние транспортируются в печень для синтеза других аминокислот.

В существующих кормовых рационах далеко не всегда достаточно белка, необходимых аминокислот и витаминов. Поэтому необходимо вводить эти вещества в корм в виде тех или иных препаратов, в частности полученных с помощью микроорганизмов. Вни-

мание ученых привлекает вопрос получения кормового белка путем микробного синтеза.

Вследствие быстрого размножения продуктивность микроорганизмов по сравнению с высшими организмами несопоставимо велика. Например, сравнительно небольшой дрожжевой завод в сутки выпускает около 30 т массы, содержащей 15 т белка, т. е. 5500 т в год. Чтобы получить такую продукцию от крупного рогатого скота, надо иметь стадо в несколько десятков тысяч голов.

Освоено производство кормовых дрожжей на отходах спиртовой, сахарной промышленности, а также на целлюлозных гидролизатах. Использование в этих целях целлюлозных гидролизатов началось в нашей стране в 1935 г.

Позднее, в шестидесятых годах, французский ученый *А. Шампанья* с сотрудниками разработал метод выращивания дрожжей на средах, содержащих дизельное топливо. Однако получаемая масса нуждалась в очистке, что требовало больших затрат. В России в середине шестидесятых годов XX в. дрожжи начали выращивать на очищенных жидких углеводородах.

Ставится вопрос о получении кормового белка на материалах, более дешевых, чем жидкие парафины. Идет экспериментальная работа по получению бактериального белка из метана. Бактерии, размножающиеся на метане, весьма своеобразны, так как растут только на одноуглеродных соединениях, что облегчает их культивирование в связи с отсутствием конкурентов.

С экономической точки зрения выгоднее, однако, метан каталитически окислять в метанол. Метанол хорошо растворим в воде и легко усваивается многими микроорганизмами, как бактериями, так и некоторыми дрожжами. В Великобритании действует завод, вырабатывающий дрожжевой белок на метиловом спирте. Изучается возможность производства микробного белка на этиловом спирте, на котором развивается более высокая биомасса дрожжей.

Большое внимание в нашей стране и за рубежом уделяют получению белка с помощью автотрофных водородных бактерий. Используя окисление водорода как энергетический процесс, в качестве источников питания они довольствуются лишь минеральными соединениями. Следует отметить, что по некоторым химическим показателям дрожжевой белок имеет некоторые преимущества по сравнению с бактериальным. Разрабатываются методы получения кормового белка из различных отходов. Одни методы пригодны для промышленного получения белка, другие — в условиях небольших хозяйств.

Возможным сырьем для получения микробного белка представляются различные целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства. Для обогащения белком измельченных целлюлозных отходов целесообразнее использовать культуры микроскопических грибов, которые активно разрушают целлюлозу, одновременно накапливая белок. Успешно работают в этом направлении *В. И. Билай* (Украина), которая использует гриб *Trichoderma viride,* и *А. Г. Лобанок* (Белоруссия), применяющий гриб рода *Penicillium.* Таким путем можно получать корм, содержащий до 30% белка.

Работы по получению кормового белка на отходах лесной и целлюлозной промышленности проводят в Швеции и Финляндии, где для этого используют грибы. В Канаде в провинции Онтарио вступил в производство небольшой завод по переработке на корм древесных отходов с помощью микроскопического гриба *Chaetomium.*

Для выработки грибного мицелия можно использовать не только целлюлозу, но и другие вещества — крахмальные гидролизаты, отходы зерна и т. д. Так, в Институте микробиологии Белоруссии разработан метод глубинного культивирования мицелия базидиального трутового гриба *Daedaleopsis confragasa* на средах с молочной сывороткой. Из 1 т молочной сыворотки может быть выработано 20 кг высушенной измельченной массы, имеющей около 50% белка и содержащей ряд незаменимых аминокислот.

На молочной сыворотке с успехом размножается базидиальный съедобный гриб *Panus tigrinus* (пилолистник тигровый). Выращенный и измельченный мицелий гриба содержит около 45% сырого белка, близкого по составу к животным белкам.

Институт микробиологии и вирусологии Казахстана рекомендует в качестве белковой добавки к бедным кормам кормовые дрожжи *Candida,* выращенные на разваренной зерновой дерти, муке или других субстратах. Перед использованием дрожжевую массу прогревают для разрушения дрожжевых клеток, что повышает их усвояемость. Кормовые дрожжи следует готовить в местах их потребления, а не на заводах.

Перерабатывать на корм можно многие пищевые и промышленные отходы и даже навоз. Изучался вопрос об использовании в качестве корма микроводорослей. Проведенные работы не дали высокого эффекта и практически прекращены, что в значительной степени связано со слабой усвояемостью животными ценных компонентов клеток водорослей.

Тем не менее в некоторых случаях водорослевые препараты дают положительный эффект. Так, в Институте микробиологии Узбекистана использовали жидкие препараты водорослей рода *Chlorel-Iα.* В культуральной жидкости водоросли содержится небольшое количество белка, но присутствует ряд биологически активных соединений. Там же ведутся работы с цианобактерией рода *Spirulina,* которая обитает в водоемах Африки. Местные жители используют ее для кормления скота.

Многие микроорганизмы пригодны для получения на их основе незаменимых кормовых аминокислот и витаминов. Только

правильное сочетание всех компонентов корма дает наилучший результат, а недостаток хотя бы одного из них снижает эффективность остальных. В таблице 21 показано влияние добавок к корму на производство яиц.

Таблица 21

Влияние характера пищи на продуктивность кур-пеструшек (по: В. Н. Букин)

Показатель	Контроль	Полноценные комбикорма с добавкой	
		витаминов, аминокислот, микроэлементов, антибиотиков	только витаминов A и D_3
Ежегодная продуктивность несушки, яиц	80	200	160
Затраты корма на производство десяти яиц, кг	6,84	2,3	3,42

Сбалансированное питание в ряде случаев упрощает и удешевляет набор ингредиентов, входящих в комбикорм. Например, обогащение кормов витамином B_{12} позволяет заменять дефицитный и дорогой животный белок растительным. При этом продуктивность животных не снижается.

До Второй мировой войны производства аминокислот не было почти ни в одной стране. Сейчас уже доказана целесообразность использования аминокислот в животноводстве, где их применение обеспечивает огромный экономический эффект. Для кормления животных нет нужды в получении чистых препаратов, достаточно иметь концентраты, производство которых дешевле и проще.

Замечательное свойство многих микроорганизмов — накапливать в среде огромное количество некоторых ценных аминокислот. Объем такого «сверхсинтеза» может быть очень большим. Так, некоторые микроорганизмы на 1 л среды производят до 200 г аспарагиновой кислоты, до 100 — глутаминовой, до 16 г валина. Существуют микроорганизмы, синтезирующие значительные количества L-лизина, L-валина, L-метионина и триптофана.

В России микробиологическим способом получают лизин. Для синтеза L-лизина используют культуру *Brevibacterium sp.,* сырьем служат уксусная кислота, минеральные соли, меласса, кукурузный экстракт и некоторые отходы пищевой промышленности. Лизин выпускают в виде жидкого концентрата (ЖКЛ), сухого концентрата и кристаллического препарата.

За рубежом микробиологическим способом помимо L-лизиина получают L-глутаминовую кислоту, используя культуру *Micrococcus*

glutaminus и некоторые бактерии рода *Brevibacterium.* В небольших количествах готовят L-алании, продуцируют который некоторые актиномицеты, а также бактерии рода *Brevibacterium* и *Cotynebacterium.* Возможно получение триптофана с использованием культуры гриба *Candidautilis.*

19.2. Синтез витаминов и ферментов микроорганизмами

Витамины представляют собой низкомолекулярные органические соединения, необходимые для поддержания жизни животных, которые должны получать их с кормом. Отдельные витамины (например, витамин С) организм животного может синтезировать. Витамины комплекса В и витамин К синтезируются микрофлорой рубца взрослых жвачных животных в достаточном количестве. Животные-копрофаги, например кролики, получают витамины, поедая собственный кал, в котором бактерии накапливают значительное количество витаминов.

Однако в ряде витаминов животные нуждаются, так как в обычном корме их не хватает. Это относится прежде всего к витамину B_{12}, каротину и в некоторой степени к витаминам группы В. Последние особенно требуются для откорма свиней и птицы.

Производство витаминов в промышленном масштабе может быть осуществлено микробиологическим путем. В России производят витамин B_{12} (цианкобаламин). Синтез этого витамина ведут по методу, разработанному в Институте биохимии им. Баха РАН. В качестве субстрата используют ацетонбутиловую барду — отход бродильной промышленности. Процесс непрерывный, осуществляют его в анаэробных условиях при температуре 50 °С. В результате образуется ряд продуктов, в том числе витамин B_{12} и метан. Сброженная барда поступает в выпарной аппарат, где сгущается, а затем в сушку и расфасовку.

Предложены и другие методы получения витамина B_{12}, например с использованием пропионовокислых бактерий, которые при сбраживании спиртовой барды в анаэробных условиях образуют значительное количество витамина B_{12}. Существуют разработки, позволяющие в ближайшее время организовать крупномасштабное производство ряда других витаминов.

Так, используя гриб *Eremothecium ashbyi,* можно получать препарат витамина B_2 (рибофлавина). Как субстрат для производства рекомендуется питательная среда из соевой муки, кукурузного экстракта и мелассы. Ферментация идет около трех суток при 28 °С. Культуральная жидкость сгущается в вакуум-аппарате при температуре, не превышающей 80 °С, а затем высушивается на вальцовой сушилке. Идет работа по подбору более дешевой среды из непищевого сырья.

Гриб *Blakeslea trispora* продуцирует провитамин А (*В*-каротин). Процесс может проходить на гидролизате сои или на отходах пищевой промышленности. Брожение осуществляется в течение трех дней при 25 °С, после чего мицелий гриба сепарируют или отделяют фильтрацией. Затем мицелий сушат в вакууме и расфасовывают. Препарат представляет собой мелкопластинчатую или песчаную массу красного цвета.

Некоторые микроорганизмы *(Streptomyces aurantiacus),* культивируемые на отходах животноводческих ферм или гидролизате древесины, позволяют получить массу, содержащую не только р-каротин, но и витамины группы В и антибиотики.

Не представляет сложности получение витамина D (кальциферол), дефицит которого в кормах сельскохозяйственных животных наблюдается наиболее часто. Основным источником витамина D служат облученные кормовые дрожжи. Готовый препарат представляет собой мелкозернистый порошок светло-желтого цвета. За рубежом кроме отмеченных препаратов производят микробиологическим способом треонин, аланин, идет интенсивная работа по синтезу триптофана.

В России и за рубежом изучают влияние различных ферментных препаратов, добавляемых в корм, на продуктивность сельскохозяйственных животных. Как добавки в корм используют амилазу, глюкоамилазу, липазу, пектиназу, целлюлазу и т. д. Стремятся выяснить возможность производства мультиферментных препаратов для различных видов и возрастных групп животных с учетом особенностей их кормления.

Возможно, ферменты найдут широкое применение при производстве заменителей молока для кормления молодняка (телят, поросят, ягнят). Их можно использовать в ветеринарии при лечении желудочно-кишечных заболеваний и т. д.

19.3. Использование пробиотиков в сельском хозяйстве

Осуществляемое в последние десятилетия беспорядочное применение антибиотиков в животноводстве, которые используются в малых дозах как стимуляторы роста, а также в качестве превентивной меры против вызванных стрессом желудочно-кишечных расстройств у животных на фермах, приводят к все более широкому распространению в микробных популяциях факторов устойчивости к антибиотикам (R-факторов), передающихся от одной бактериальной клетки к другой при конъюгации. Передача происходит через плазмиду — кольцевую экстрахромосомную молекулу ДНК, способную к репликации.

Антибиотики, применяемые в малых дозах длительное время, приводят к заметному возрастанию числа устойчивых к лекарственным

препаратам микроорганизмов, в частности энтеробактерий *(E. coli, Salmonella* и др.). Передающаяся устойчивость к лекарствам, полученная сначала сельскохозяйственными животными, сейчас обнаружена у представителей кишечной микрофлоры человека. Попадая к человеку через зараженное мясо, сальмонеллы, содержащие R-фактор, могут передавать его бактериям, живущим в желудочно-кишечном тракте человека, которые, в свою очередь, передают фактор устойчивости патогенным энтеробактериям человека. Этот, кажущийся бесконечным, порочный круг может повториться со многими антибиотиками, в результате чего будут возникать более сложные R-факторы, несущие гены множественной устойчивости к антибиотикам. Благодаря этому механизму многие патогенные микроорганизмы теперь проявляют возросшую устойчивость к. антибиотикам. Все это вызвало ряд исследований, в которых препараты молочнокислых бактерий использовались как безопасная альтернатива низким дозам антибиотиков для предотвращения и, возможно, лечения желудочно-кишечных расстройств, вызванных стрессом у сельскохозяйственных животных. Считают, что антибактериальная роль молочнокислых бактерий обусловлена их способностью производить достаточное количество молочной кислоты, чтобы ингибировать развитие других организмов, а также способностью прикрепляться к кишечным ворсинкам, «оттесняя» других бактерий. Более того, некоторые представители молочнокислых бактерий не только обладают активностью против *E. coli,* но также производят метаболиты, которые способны нейтрализовать эффект энтеротоксинов, выделяемых многими живущими в желудке микроорганизмами. Среди многочисленных видов молочнокислых бактерий, обнаруживаемых в природных субстратах, указанными выше свойствами обладают палочковидные бактерии рода *Lactobacillus: L. acidophilus* и *L. bulgaricus,* а также бактерии рода *Bifidobacterium — B. bifidum.*

Изучение этих бактерий показало, что ингибирующее действие их на другие микроорганизмы обусловлено способностью лактобацилл вырабатывать молочную кислоту. Так, *L. acidophilus* при сбраживании глюкозы вырабатывает более 80% молочной кислоты. Именно молочная кислота поддерживает кислую реакцию среды в кишечнике большинства животных. Многие энтеропатогенные бактерии предпочитают нейтральную или слегка щелочную среду, так что сама по себе кислотность может их угнетать. Другой важной особенностью молочнокислых бактерий является их способность «прилипать» к эпителиальным поверхностям, выстилающим желудочно-кишечный тракт животных. Специальные исследования показали, что эта «приверженность» оказывается не только тканеселективной по различным отделам пищеварительного тракта, но и в некоторых случаях также видоспецифичной. Так было обнаружено, что лактобациллы прикрепляются к эпителиальной выстилке зоба цыпленка, а у свиней и телят молочнокислые бактерии способны прикрепляться к желудочному эпителию. Способность молочнокислых бактерий к прикреплению и размножению на эпителиальных поверхностях желудочно-кишечного тракта обуславливает их домини-

рование в составе кишечной микрофлоры, при этом содержание колиформных бактерий сохраняется на низком уровне (обычно, одним из доминирующих кишечных организмов у млекопитающих является кишечная палочка — *E. coli).*

Установлено также, что молочнокислые бактерии продуцируют различные антимикробные метаболиты. В частности, *L. acidophilus* выделяет такие антибиотикоподобные вещества, как лактоцидин, ацидолин, ацидофилин и бактериоцины, угнетающие развитие кишечных энтеропатогенных бактерий. А *L. bulgaricus,* как уже отмечалось, обладает внеклеточной антиэнтеротоксинной активностью, способной нейтрализовать энтеротоксины кишечной палочки — *E. coli.* Поэтому скармливание *L. bulgaricus* животным ведет к уменьшению поносов и снижению их смертности. Таким образом, нормальные условия жизнедеятельности кишечника сельскохозяйственных животных создаются и поддерживаются благодаря особым свойствам молочнокислых бактерий (образованию молочной кислоты, способностью прикрепляться к эпителию кишечника животных, антимикробной и антиэнтеротоксинной активностью, высокой устойчивостью к низким значениям pH). Именно эти свойства должны сохраняться в промышленных препаратах молочнокислых бактерий, предназначенных для употребления в качестве пробиотиков. Весьма важной является селекция штаммов молочнокислых бактерий и подбор условий ферментации для получения полноценной продукции *Lactobacillus.* Хотя биологическая активность препаратов имеет первостепенное значение для использования их в качестве пробиотиков, не менее важны жизнеспособность и стабильность молочнокислых бактерий в препаратах. В заключение необходимо подчеркнуть, что молочнокислые бактерии, широко распространенные в природе, становятся важным компонентом кишечной микрофлоры молодых теплокровных животных вскоре после их появления на свет. Уместно предположить, что лечение пробиотиками может быть чрезвычайно полезным для животных в стрессовых ситуациях, как альтернатива профилактике стресса низкими дозами антибиотиков. Кроме того, пробиотики, без сомнения, найдут свое место в качестве безопасной альтернативы антибиотикам для предотвращения и лечения стрессовых желудочно-кишечных расстройств у сельскохозяйственных животных.

В настоящее время во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН создано два вида биопрепаратов-пробиотиков — целлобактерин, предназначенный для использования в рационах при выращивании цыплят, молодняка крупного рогатого скота, поросят-отъемышей и гастробакт, который применяется при диспепсии, колитах, энтеритах, нарушениях ферментации у молодняка и взрослых животных.

Контрольные вопросы и задания

1. Для каких видов сельскохозяйственных животных особенно важны белковые кормовые добавки? 2. Расскажите об использовании жидких углеводородов для синтеза кормового белка. 3. Дайте характеристику микроорганизмам, используемым для получения кормового белка. 4. Какие микроорганизмы используют для получения незаменимых аминокислот, необходимых в животноводстве? 5. Что такое пробиотики?

Превращение микроорганизмами растительного сырья (биоконверсия)

Во второй половине XX в. в мировой экономике остро стал ощущаться дефицит энергии, пищи и сырья для промышленности. Возникла угроза загрязнения окружающей среды. Эти явления приняли характер глобальных проблем.

Все больше мысль человека стала обращаться к продуктам фотосинтеза как возобновляемому и практически неисчерпаемому источнику энергии, как перспективному сырью для получения продуктов питания и производства различных материальных ценностей. Одновременно внимание было обращено на микроорганизмы как мощную и многообразную каталитическую систему, способную трансформировать природные органические вещества растительного происхождения в любые нужные человеку формы в технически несложных сооружениях, в управляемых, независимых от климата условиях, при сравнительно небольших затратах энергии и труда. Следовательно, целью биоконверсии является получение из недефицитного возобновляемого сырья пищевых и кормовых продуктов, жидких и газообразных видов топлива, химических продуктов и медикаментов, а также защита окружающей среды.

Следовательно, человечество с каждым годом все больше убеждается в том, что основное наше богатство — растительная биомасса (возобновляемые ресурсы органического вещества), которая ежегодно образуется в реакциях фотосинтеза в количестве $2 \cdot 10^{11}$ т по углероду или $3 \cdot 10^{12}$ Гкал по запасенной энергии. При этом для питания человека требуется 0,5%, а для покрытия всех мировых энергетических нужд около 10% этой энергии.

Мощные фотосинтезирующие системы компенсированы столь же мощными гидролитическими системами, причем главным образом за счет ферментов микробного мира. Однако в природных условиях, например в почве, разрушение растительных остатков

идет медленно — неделями и месяцами. Другое дело — биоконверсия в реакторах в управляемых условиях.

Под **управляемой биоконверсией растительного сырья** необходимо понимать превращение компонентов растительной массы микробиологическим или ферментативным путем в различные полезные вещества и продукты в регулируемых условиях.

Для биоконверсии углеводов растительного сырья используют различные микроорганизмы — бактерии, актиномицеты, дрожжи, микромицеты. Продукты биоконверсии растительного мира широко применяются в питании человека (хлеб, квашеные продукты, алкогольные и др. напитки, кислоты и т. д.), в кормлении животных (силос, сенаж, дрожжи, продукты биосинтеза и др.), а также в производстве медикаментов, химикатов, жидких и газообразных видов топлива и др.

Растительное сырье делят на растворимое и нерастворимое. Процессы ферментации наиболее изучены при биоконверсии *растворимых субстратов.* Известно много вариантов ферментационных процессов: глубинная и поверхностная ферментация; аэробная и анаэробная; периодическая и непрерывная; монокультурная и поликультурная; спонтанная; мезофильная и термофильная ферментация и др.

Ферментация *нерастворимых субстратов* также существует в разных вариантах. Так, в сельском хозяйстве практикуют твердофазную ферментацию растительной массы в анаэробных условиях с целью консервирования кормов. Твердофазная ферментация представляет большой интерес при биоконверсии такого нерастворимого растительного сырья, каким является большинство крахмал- и целлюлозосодержащих сельскохозяйственных продуктов и отходов производства.

Важное значение в создании процессов получения нужных целевых продуктов методами биоконверсии имеет выбор растительного сырья. Прежде всего анализируются затраты энергии на получение этого сырья. Считают, что высоким выходом энергии отличаются травы (люцерна и др.), а поэтому получение различных продуктов из трав считается весьма перспективным направлением. Большой интерес представляет фракционирование зеленой массы с целью получения белковых концентратов кормового и особенно пищевого назначения.

Говоря о биоконверсии крахмалсодержащего сырья, необходимо отметить возможность получения белка из крахмала путем прямого культивирования на этих субстратах микробов с амилазной активностью, в том числе дрожжей.

В настоящее время интенсивно изучается энзимная биоконверсия целлюлозы. Это направление открывает перспективу получения из нее всех продуктов, которые сегодня производят из глюкозы.

20.1. Применение методов биоконверсии в сельском хозяйстве

Можно выделить ряд перспективных направлений применения микробной биоконверсии растительного сырья для нужд сельского хозяйства: получение белковых концентратов пищевого и кормового назначения из зеленой массы растений с использованием микробиологических процессов; микробная протеинизация крахмала и целлюлозосодержащего сырья; нетрадиционные пути биоконверсии растительных углеводов в этанол; получение биогаза из отходов ферм и растительных остатков; консервирование кормов продуктами брожения (силосование).

Биоконверсия местного сельскохозяйственного сырья — зеленой массы, зерновых, а также отходов их переработки и отходов ферм может оказать существенное влияние на рационализацию сельскохозяйственного производства. Комплексный подход при разработке биотехнических систем в сфере сельского хозяйства может дать ключ к созданию безотходной технологии, к полному использованию растительного сырья, а также способствовать решению таких проблем, как получение белка из местных ресурсов; использование новых видов энергии; защита окружающей среды.

Исключительно важное значение имеет микробиологическая обработка грубых кормов, например соломы.

Силосование и сенажирование зеленой массы трав являются в настоящее время широко используемыми на практике методами микробиологического консервирования кормов. Однако достижения современной микробиологии и энзимологии позволяют смотреть на силосование и сенажирование не только как на процессы консервирования. Показана целесообразность применения в качестве специальных заквасок микробов, обладающих гидролазной активностью в отношении полисахаридов. Развитие таких микроорганизмов на целлюлозосодержащих субстратах во время силосования корма приводит к деструкции полисахаридов с образованием усвояемых животным организмом форм органических веществ. Аналогичный эффект достигается, если при закладке силоса (сенажа) применяются соответствующие ферментные препараты. Экономически оправдана разработка технологии обработки соломы и других подобных субстратов. Известно, что при производстве каждой тонны зерна образуется тонна соломы, в которой заключено почти столько же энергии, сколько в зерне. Если мировое производство зерна составляет 1 млрд 600 млн т, из которых 1 млрд т используется в пищу человека, и 600 млн т — в корм животным, то это значит, что мировые ресурсы соломы также составляют около 1600 млн т. Отсюда девиз «Зерно — для человека, а конвертированная солома — для корма животных».

Большой интерес представляют работы по обогащению целлюлозо- и лигнинсодержащего сырья микробным белком.

Биологическим способом можно консервировать не только грубые корма. В мировой практике накоплен опыт консервирования влажного зерна как при помощи химических консервантов, так и путем хранения влажного (до 30%) зерна в герметичных емкостях, например траншеях в атмосфере CO_2.

Таким образом, в области сельского хозяйства биотехнология позволяет более полно использовать урожай, уменьшить количество побочных отходов и потери.

20.2. Нетрадиционные пути биоконверсии растительных углеводов в этанол

Один из путей решения глобальной проблемы биотрансформации продуктов фотосинтеза — получение этанола из растительной массы с помощью микроорганизмов. Можно указать несколько причин, обусловливающих огромный интерес к исследованиям в данном направлении.

Во-первых, этанол, получаемый из растительной массы, так называемый биоэтанол, может использоваться для восполнения энергетических ресурсов. В связи с тем что запасы природных ископаемых — нефти, угля и газа — истощаются, поиск других источников энергии весьма актуален.

Во-вторых, для получения этанола используется недефицитное сырье. Например, значительный сырьевой запас представляют сельскохозяйственные отходы.

В-третьих, спиртовое брожение — самая старая отрасль биотехнологии — имеет готовые технологические системы и развитую промышленную базу. Следует отметить, что конверсия растительной биомассы в этанол энергетически более выгодна, чем ее конверсия в микробную биомассу (белок).

Микроорганизмы — продуценты этанола. Микроорганизмы, уже используемые, и те, которые могут быть использованы для трансформации продуктов фотосинтеза в этанол, делят на три группы:

1) дрожжи, традиционно применяемые для конверсии углеводов в этанол. Однако за последние годы найдены и интенсивно изучаются новые продуценты этанола, которые по ряду свойств превосходят дрожжи;

2) мезофильные бактерии рода *Zymomonas* (оптимальная температура — 30—35°), обладающие в несколько раз более интенсивным метаболизмом, чем дрожжи;

3) термофильные этанолобразующие бактерии (оптимальная температура — 60—65°), привлекшие внимание главным образом тем, что в этой группе имеются микроорганизмы, способные трансформировать растительные углеводные полимеры непосредственно в этанол. В этом случае отпадает необходимость предварительной деполимеризации этих субстратов (что характерно для спиртового брожения, вызываемого дрожжами). Кроме того, бактерии по сравнению с дрожжами — более удобный объект для применения генно-инженерных методов улучшения их технологических свойств. Резервом повышения продуктивности технологических систем конверсии углеводов в этанол является возможность создания стабильных бактериальных ассоциаций.

Существенными преимуществами обладает процесс получения этанола с помощью термофильных анаэробных бактерий. Кроме общих технологических преимуществ, которые обеспечивают термофильный процесс, следует отметить, что в этой группе микроорганизмов находятся представители с целлюлозолитической активностью. С помощью этих бактерий представляется возможным трансформировать растительную биомассу прямо в этанол без ее предварительной обработки. Среди термофильных анаэробных бактерий также ведется поиск новых продуцентов этанола и работа по генетическому улучшению свойств имеющихся штаммов.

В таблице 22 приводятся физиологические и технологические характеристики продуцентов этанола.

Таблица 22

Группа	Продуценты	pH	Выход этанола, %	Температура, °С	Максимальная концентрация этанола, г/л
1-я группа	*Saccharomyces cerevisiae*	3-4	100	30	130
	Saccharomyces rosei	4,6	88	35	42,5
2-я группа	*Zymomonas mobilis*	5,5	95	30	130
	Zymomonas anaerobia	5-6	90-95	35	96
3-я группа	*Clostridium thermocellum*	7,0	50	62	1,5
	Clostridium thermosaccharolyticum	6,9-7,5	70	67-70	4,0
	Thermoanaerobacter ethanolicus	5,8-8,5	90	69	

Характерная черта бактерий рода *Zymomonas* состоит в том, что они способны почти полностью перерабатывать глюкозу или фруктозу в этанол и CO_2 (в отличие от *Zymomonas* дрожжи утилизируют большой набор гексоз — около 55% всей растительной массы). У *Zymomonas* выход этанола колеблется между 1,5—1,9 моль на одну молекулу глюкозы. Учитывая вышеупомянутые факты, можно считать *Zymomonas* одним из перспективных продуцентов спирта.

Очевидно, использование бактерий *Z. mobilis* с применением новых технологических процессов, таких как иммобилизация, рециклизация и флокуляция клеток, рециклизация с вакуумным устройством и др., селекционирование новых, толерантных к этанолу штаммов, использующих разные природные субстраты (крахмал, целлюлозу и др.), откроет новые перспективы в спиртовой промышленности.

Образование этанола термофильными бактериями. В настоящее время установлено, что термофильные анаэробные бактерии способны превращать целлюлозосодержащие субстраты прямо в этанол. Считают, что с помощью этой группы микроорганизмов есть возможность создать рентабельную технологию трансформации продуктов фотосинтеза в этанол. Наиболее изученный представитель этой группы бактерий, образующих этанол, — *Clostridium thermocellum*. Эти бактерии расщепляют целлюлозу и гемицеллюлозу, растут на целлобиозе, глюкозе, но не используют ксилозу. *C. thermocellum* — самый быстрорастущий микроорганизм, разлагающий целлюлозу, из известных на сегодняшний день.

Для этой группы бактерий характерен гетероферментативный тип брожения, конечными продуктами которого являются этанол, ацетат, лактат, CO_2, H_2. *C. thermocellum* и *Thermoanaerobacter ethanolicus* конвертируют в этанол до 95% субстрата, что близко к максимальному выходу этанола у дрожжей и *Zymomonas.*

Весьма перспективным представляется использование для получения этанола из растительных субстратов бактерий, обладающих как целлюлозолитической, так и этанолсинтезирующей активностью. Таковы бактерии *C. thermocellum.* Однако у них есть недостаток — сравнительно невысокий выход этанола и узкий спектр используемых субстратов. Оба эти недостатка могут быть преодолены в смешанных культурах бактерий, как, например, *C. thermocellum* + *T. ethanolicus* и *C. thermocellum* + *C. thermohydrosulfuricum*. Повышенный выход этанола в случае смешанной культуры объясняется тем обстоятельством, что *C. thermohydrosulfuricum* конвертирует примерно половину углеводов в этанол. Считается, что термофильная анаэробная ферментация целлюлозосодержащих субстратов станет рентабельной, если удастся поддержать высокую продуктивность при концентрации этанола выше 4,5%.

20.3. Получение гидролаз из полисахаридов и микробного белка на крахмалсодержащем сырье

Крахмалсодержащее сырье и возможности его биоконверсии. В настоящее время имеется достаточно много хорошо изученных непатогенных микроорганизмов с высокой амилазной активностью *(Aspergillus oryzae, A. niger, Rhizopus delemar, Endomycopsis fibuligera, Candida japonica, C albicans, Lypomyces starkeyi, Bacillus subtilis, B. mesentericus, B. cereus, B. mycoides,* а также термофильные бактерии и актиномицеты). Наиболее часто для получения амилолитических ферментов (амилаз и глюкоамилаз) используются мицелиальные грибы рода *Aspergillus* и дрожжи рода *Endomycopsis.*

Используя методы современной биотехнологии, представляется возможным осуществить биоконверсию крахмал'содержащих субстратов как с целью получения гидролаз полисахаридов, так и для обогащения крахмалсодержащего сырья микробным белком.

В качестве продуцента микробного белка используют главным образом дрожжи, а также бактерии и мицелиальные грибы. Последние по сравнению с дрожжами способны усваивать более широкий спектр углеводов, в том числе полисахариды и смеси Сахаров. Поэтому грибы целесообразно использовать для получения белка при переработке гетерогенных субстратов. Во многих случаях использование крахмалсодержащих отходов при получении белка важно и в экологическом плане. Так, после переработки картофеля остаются сточные воды, содержащие полисахариды. В Швеции применяется процесс под названием «Симба», сущность которого в том, что на отходах переработки картофеля последовательно выращивают две культуры дрожжей: сначала *Endomycopsis fibuligera,* продуцирующую амилолитические ферменты, которые гидролизуют крахмал до Сахаров, а затем *Candida utilis,* использующую сахара. Полученный препарат предназначен в качестве добавки к корму свиней и птиц.

Перспективным является получение микробного белка на крахмалсодержащих средах путем выращивания микромицетов. Последние имеют более тонкую, чем дрожжи, клеточную стенку и поэтому легко перевариваются без предварительной обработки. Кстати, следует отметить, что при переработке картофеля на картофелеперерабатывающих заводах общее количество потерь достигает 40—50% от массы картофеля. Эти отходы могут служить сырьем для получения белка.

Так, по данным ряда авторов, на 1 $м^3$ среды, приготовленной из отходов картофелеперерабатывающих заводов, можно получить до 30,4 кг кормовых дрожжей с содержанием сухих веществ около 25%. Это выше, чем при выращивании дрожжей на зерновой или зерномелассной барде.

Помимо получения белковых препаратов, выращивание микроорганизмов на крахмалсодержащем сырье может быть использовано как способ обогащения кормов белком.

Получение комплексных белково-ферментных препаратов. Многочисленными исследованиями показано, что добавление гидролитических ферментов в корма, комбикорма и премиксы позволяет увеличить прирост массы животных и птицы в среднем на 10—15% и снизить затраты корма на 1 кг прироста на 5—7%. Ферментные препараты могут использоваться для улучшения усвояемости грубых кормов, содержащих крахмал и целлюлозу, или могут быть непосредственно включены в кормовой рацион животных и птиц.

Для получения комплексных белково-ферментных препаратов с глюкоамилазной активностью применяют как совместное культивирование, так и выращивание монокультур. Преимущество смешанных культур показано во многих работах. Так, применение в качестве продуцента глюкоамилазы дрожжей *End. fibuligera,* а целлюлазы — *Trichoderma lignorum* на комплексной среде, содержащей солому, пшеничные отруби и муку, выявило, что дрожжевая культура *End. fibuligera* способна использовать для своей жизнедеятельности продукты гидролиза соломы, образовавшиеся под действием гриба. Показано также, что при совместном культивировании продуцента амилолитических ферментов *End. fibuligera* с грибными, дрожжевыми и бактериальными культурами удается повысить активность ферментной системы-продуцента.

В настоящее время разработан технологический процесс получения белково-ферментного препарата при культивировании *End. fibuligera* на твердых субстратах, в частности пшеничных отрубях и комбикорме. Прирост белка в этом процессе составлял 36 кг на 1000 кг субстрата, т. е. 27% от использованного крахмала.

Выгода применения белково-ферментных комплексов в рационах некоторых животных очевидна, если учесть их невысокую стоимость и экономию кормовых средств при достаточно большом приросте живой массы животных.

20.4. Биоконверсия целлюлозо-лигниновых материалов

Биоконверсия целлюлозо-лигниновых материалов в белок в настоящее время может быть осуществлена только путем выращивания микроорганизмов на этих материалах (или их гидролизатах) в качестве субстратов. Внутриклеточный белок ферментов микробов составляет основную долю целевого белка, но некоторое его количество представлено внеклеточными ферментами (экзоферментами). Эти ферменты микроорганизмы выделяют во внешнюю водную среду, и их функция состоит в гидролизе полимеров субстрата до мономерных соединений. Только такие соединения могут быть усвоены микроорганизмами, обладающими целлюлозолитической (или лигнингидролизующей) активностью, а также многими другими видами микроорганизмов (в первую очередь различными дрожжами).

Следовательно, биоконверсия с целью получения белка может быть осуществлена только в аэробных условиях, так как в анаэробных условиях весьма ограничены возможности роста клеточной биомассы. В то же время анаэробные условия дают возможность эффективного получения из целлюлозы (в результате жизнедеятельности определенных микроорганизмов) летучих низкомолекулярных восстановленных органических соединений — метанола, органических кислот, метана и т. д.

При осуществлении биоконверсии с целью получения белка задача состоит в многократной интенсификации процесса деструкции целлюлозолигниновых материалов и создании условий, в которых происходит эффективное увеличение биомассы микроорганизмов (и, следовательно, белка), а не расходование субстрата с выделением CO_2 и H_2O без роста клеток.

Биоконверсия целлюлозы сводится к двум основным группам биохимических процессов: гидролизу целлюлозы ферментами и росту клеток на продуктах гидролиза. Оба эти процесса могут быть выполнены одним целлюлозолитическим микроорганизмом, и процесс биоконверсии тогда является прямым, или одностадийным. То, что иногда в среду вводятся и другие микроорганизмы, ассимилирующие продукты гидролиза, не меняет сути процесса — такие способы относятся к процессам прямой биоконверсии.

Но возможна и непрямая (многостадийная) биоконверсия. В непрямой биоконверсии, как правило, стадия гидролиза выполняется отдельно от стадии выращивания микроорганизмов, образующих целевой компонент конечного продукта — белок. Гидролиз может быть выполнен кислотами, целлюлозным ферментным комплексом, микроорганизмами в анаэробных условиях.

Возможны и другие разновидности непрямой биоконверсии. В большинстве работ основное внимание уделяется соломе как исходному материалу биоконверсии для получения белка, поскольку в настоящее время данный субстрат, будучи побочным продуктом сельского хозяйства, все еще не находит полного и эффективного использования в пределах своей отрасли, а дефицит белка остается фактором, задерживающим быстрый рост продуктивности животноводства.

Биоконверсия лигнина. *Лигнины* — аморфные высокомолекулярные соединения ароматической природы, которые можно подразделить на три класса: лигнин древесины хвойных пород; лигнин древесины лиственных пород; лигнин травянистых растений.

Биологическая роль лигнина заключается в придании механической устойчивости стволам и стеблям растений. Предшественниками лигнина являются ароматические фенилпропановые спирты — кумаровый, конифериловый и синаповый. В растительных клетках лигнин связан с другими биополимерами — целлюлозой и гемицеллюлозой.

Микроорганизмы, разлагающие лигнин. До начала 70-х гг. XX в. основное внимание исследователей было уделено базидиальным грибам, вызывающим гниение древесины, которые условно

были разделены на 3 группы: возбудители мягкой гнили, возбудители бурой гнили и возбудители белой гнили.

За последние годы сравнительно много данных получено относительно бактериальной деградации лигнина. Показано, что представители родов *Corynebacterium, Agrobacterium, Pseudomonas, Klebsiella, Aerobacter* и *Enterobacter* могли использовать лигнин в качестве единственного источника углерода, при этом штамм *Aerobacter sp.* разлагал 98% лигнина в течение 5 суток.

Практика биоконверсии лигнина. В решении рассматриваемой проблемы биоконверсии целлюлозолигниновых материалов, в том числе соломы, биоконверсия и деструкция лигнина может обеспечить делигнификацию субстрата, тем самым интенсифицируя процесс биоконверсии всего материала. Хотя исключительная медленность биодеградации лигнина препятствует практическому использованию этого процесса, уже известны микроорганизмы, которые способны в первую очередь в соломе расщеплять лигнин, тем самым способствуя и биоконверсии целлюлозы. Как уже отмечалось выше, весьма активными лигнолитическими микроорганизмами являются грибы белой гнили (они продуцируют внеклеточные фенолоксидазы). Деградация лигнина может существенно ускоряться при внесении субстрата, легче поддающегося разложению — глюкозы, этанола, солодового экстракта. Данные субстраты могут быть использованы микробными культурами как доступный источник энергии, необходимой для деградации лигнина (явление кометаболизма).

Биоконверсия соломы. Микроорганизмы, применяемые для биоконверсии. В практике биологического разложения целлюлозы чаще всего используются различные микромицеты-сапротрофы, в изобилии встречающиеся в почве и на органических остатках. Это представители родов *Chaetomium, Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Trichoderma, Rhizoctonia* и др. Для разрушения целлюлозы и биосинтеза целлюлозолитических ферментов чаще всего используются микромицеты *Trichoderma viride, Aspergillus niger* и *A. terreus,* превращающие нерастворимую целлюлозу в растворимые сахара.

Характеристика твердофазной ферментации. Основное отличие твердофазной ферментации (ТФ) от глубинной (ГФ) — существенное уменьшение содержания воды и высокое содержание субстрата в среде ферментации.

Опыты по изучению получения белка микроорганизмов из целлюлозолигниновых материалов с использованием глубинной ферментации показали, что удовлетворительная степень превращения достигается только при низкой концентрации субстрата — не более 2%, а высокая вязкость среды осложняет перемешивание и аэрацию. Поэтому твердофазная ферментация рассматривается как

перспективный способ биоконверсии целлюлозолигниновых материалов, которые при переработке в корма могут использоваться без какой-либо дополнительной обработки.

В результате многочисленных исследований в настоящее время разработаны технические средства твердофазного культивирования, технологические режимы и отобранные культуры *(Trichoderma viride* и *Endomycopsis fibuligera)* способны конвертировать термоотработанную солому (с добавкой 10% отрубей) в препарат с содержанием не менее 12% белка в течение 5,0—5,5 суток при содержании сухих веществ в среде ферментации 20—31 % и биологических потерях сухой массы около 30%.

20.5. Получение биогаза из отходов ферм

Как известно, проблема отходов ферм состоит в том, что навоз как органическое удобрение расходуется только периодически и поэтому накапливается у ферм, где занимает большие площади, выделяет дурной запах, загрязняя атмосферу, а порой, находясь в сильно разбавленном виде, просачивается из хранилищ в почву и далее попадает в водоемы, вновь нанося вред окружающей среде. Навоз, кроме того, является источником возбудителей инфекционных болезней и паразитов.

Практика переработки промышленных, коммунальных и сельскохозяйственных отходов базируется на использовании как аэробных, так и анаэробных микробных процессов. При аэробном процессе разложения органического вещества можно получить микробную биомассу кормового назначения в виде ила (однако имеет место потеря азота до 40%).

В случае анаэробной переработки отходов из органических веществ в конечном счете образуется смесь газов — метан, CO_2, H_2 и др. В биогаз во время так называемого метанового брожения[1] превращается 30—50% органического вещества. Если процесс броже-

[1] *Метановое брожение* — устойчивое словосочетание, традиционно используемое в биотехнологии и ряде других отраслей, под которым подразумевается процесс анаэробной переработки органического вещества. Он представляет собой совокупность различных микробиологических процессов, в том числе ряда брожений. Однако конечная стадия этого процесса — образование метана, — строго говоря брожением не является.

Следует также отметить, что образующие метан прокариоты — метаногены — относятся к архебактериям, или по новой классификации — к археям (домен *Archaea),* в не к истинным бактериям (домен *Bacteria).* Поэтому сегодня микробиологи вынуждены избегать традиционного словосочетания «метанобразующие бактерии», заменяя его менее привычными терминами «метаногены», «метанобразующие организмы» и т. д. (При использовании же названий «архебактерии» и «эубактерии» термин «метанобразующие бактерии» имеет право на существование.) *(Прим. ред.)*

ния проводится в термофильных условиях (при 55—57 °С), то одновременно достигается обезвреживание субстрата (погибают патогены и паразиты животных).

Некоторыми исследователями предлагается метановое брожение сочетать с аэробной ферментацией, чтобы помимо биогаза получать большой выход богатой белком микробной биомассы. Обогащенная соломой бражка метанового брожения навоза подвергается аэробной ферментации при помощи микромицета *Chaetomium cellulolyticum.*

Микрофлора анаэробного метанового брожения. Метановое брожение является строго анаэробным процессом и осуществляется сложными микробными ассоциациями. На сегодняшний день известно более 20 видов метанобразующих микроорганизмов, или метаногенов, с различной морфологией: округлые, палочковидные, ланцетовидные, в виде спирали, образующие длинные нити и соединения клеток наподобие сарцин. Их относят к архебактериям (роды *Methanobacterium, Methanococcus, Methanospirillum, Methanosarcina* и др.).

Все известные метанобразующие организмы могут получать энергию в результате окисления H_2, используя в качестве акцептора электронов CO_2. В результате CO_2 восстанавливается до CH_4. Представители отдельных родов могут использовать еще два субстрата — метанол и ацетат. Поэтому для того чтобы метаногены могли осуществить терминальный этап анаэробного разложения субстрата, необходима его предварительная подготовка: сложные соединения нужно превратить в простые, которые являются непосредственными предшественниками метана в среде. Первая стадия метанового брожения — кислотная, осуществляемая представителями *Enterobacteriaceae, Clostridiaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae,* приводит к образованию летучих органических кислот, формиата, ацетата, пропионата, бутирата, молочной и янтарной кислот, низших спиртов, альдегидов и кетонов, а также H_2 и CO_2. Вторая стадия осуществляется *Synthrophobacter и Synthrophomonas.* Третья стадия — метаногенная — превращение H_2 и уксусной кислоты в метан:

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2$$
$$CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

Основным продуктом первичного брожения в метантенках является ацетат. Из ацетата в метантенках образуется в среднем до 73% CH_4. Водородный путь дает до 30% метана. Таким образом, при метановом брожении в данной экосистеме должны присутствовать микроорганизмы тех ассоциаций, которые превращают первичные продукты брожения в ацетат, CO_2 и H_2.

Биотехнология метанового брожения. В биотехнологии получения биогаза из отходов ферм должны учитываться особенности метанового брожения. Большое влияние на метановое брожение оказывают температура, pH, состав среды и наличие в ней ингибиторов (мономеры, кислоты), концентрация и размеры твердых частиц, гидродинамические условия в ферментационной среде и другие факторы.

Наиболее существенное влияние на газовыделение оказывает температура. Выявлено, что оптимальная температура для максимального метанообразования составляет 54—56 °С. Термофильный процесс к тому же обеспечивает исчезновение бактерий группы *E. coli,* что очень важно с точки зрения обезвреживания навоза.

Несмотря на сложность метанового брожения, существует еще ряд методов интенсификации процесса.

Аппараты и технологические схемы. Биогазовые реакторы можно условно разделить на однокорпусные («сельские») неинтенсивные, без дополнительного оборудования для подогрева и перемешивания, и на индустриальные с устройствами для перемешивания и системой управления процессом.

Однокорпусные («сельские») реакторы имеют объем в несколько кубометров и в основном работают в квазинепрерывном мезофильном (30—38°) режиме.

Вертикальные цилиндрические реакторы с верхней и нижней конусной частью широко применяются в коммунальном хозяйстве, изготавливаются из бетона или металла и достигают объема нескольких тысяч кубометров.

Более интенсивно метановое брожение идет в двухступенчатой системе, состоящей из двух реакторов. Чтобы увеличить концентрацию биомассы в первом аппарате, работающем в интенсивном режиме, во втором реакторе осуществляется разделение твердого вещества и активной микрофлоры, часть этой массы возвращается в первый реактор.

В ряде стран с теплым климатом широкое применение нашли малогабаритные биогазовые установки различных конструкций объемом от 1—2 до 50 м^3. В Китае, Индии, Корее, Индонезии действуют несколько миллионов таких установок. В них процесс метанового брожения одноступенчатый. Биогазовые установки применяются для трех основных целей: получение биогаза как источника энергии; получение высокоэффективных органических удобрений; охрана окружающей среды.

Большинство исследователей считают, что биогазовые установки при фермах решают проблему защиты окружающей среды, и это, наверное, самое главное.

20.6. Силосование кормов как метод анаэробной биоконверсии

Силосование, или **заквашивание,** — способ консервирования зеленого корма, при котором растительную массу хранят во влажном состоянии в ямах, траншеях или специальных сооружениях — *силосных башнях.* Корм, более или менее спрессованный и изолированный от доступа воздуха, подвергается брожению, приобретает кислый вкус, становится мягче, несколько изменяет цвет (бурая окраска), но остается сочным.

Способы силосования кормов. Силосование имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами консервирования корма. Известны два способа силосования: холодный и горячий. При холодном способе силосования созревание силоса идет при умеренном повышении температуры, доходящем в некоторых слоях корма до 40 °С; оптимальной температурой считается 25—30 °С. При таком силосовании скошенную растительную массу, если нужно, измельчают, укладывают до отказа в кормовместилище, утрамбовывают, сверху как можно плотнее укрывают для изоляции от воздуха.

При горячем способе силосное сооружение заполняют по частям. Зеленую массу на один-два дня рыхло укладывают слоем около 1—1,5 м. При большом количестве воздуха в ней активизируются микробиологические и ферментные процессы, в результате чего температура корма поднимается до 45—50 °С. Затем укладывают второй слой такой же толщины, как и первый, и он, в свою очередь, подвергается разогреванию.

Растения, находящиеся внизу и размягченные под влиянием высокой температуры, спрессовываются под тяжестью нового слоя корма. Это вызывает удаление воздуха из нижнего слоя силоса, отчего аэробные процессы в нем прекращаются и температура начинает снижаться.

Так слой за слоем заполняют все силосохранилище. Самый верхний слой корма утрамбовывают и плотно прикрывают для защиты от воздуха. В связи с тем что силосохранилище при горячем способе силосования обычно делают небольших размеров, на верхний слой силосуемого корма помещают груз.

Разогревание растительной массы связано с потерей иногда значительной части питательных веществ корма. В частности, резко уменьшается переваримость белков. Поэтому горячее силосование не может считаться рациональным способом сохранения растительной массы. Общие потери сухих веществ корма при холодном силосовании не должны превышать 10—15%, во втором достигают 30% и более.

Холодный способ силосования наиболее распространен, что объясняется как сравнительной его простотой, так и хорошим качеством получающегося корма. Горячий способ силосования допустим лишь для квашений грубостебельных, малоценных кормов, которые после разогревания лучше поедаются скотом.

Силосование связано с накоплением в корме кислот, образующихся в результате сбраживания микробами-кислотообразователями содержащихся в растениях сахаристых веществ. Основную роль в процессе силосования играют молочнокислые бактерии, продуцирующие из углеводов (в основном из моно- и дисахаридов) молочную и частично уксусную кислоты. Данные кислоты приятны на

вкус, хорошо усваиваются организмом животного и способствуют возбуждению аппетита. Молочнокислые бактерии снижают реакцию среды корма до pH 4,2—4,0 и ниже.

Накопление молочной и уксусной кислот в силосе обусловливает его сохранность, так как гнилостные и прочие нежелательные для силосования бактерии не способны размножаться в среде с кислой реакцией (ниже pH 4,5—4,7). Сами же молочнокислые бактерии относительно устойчивы к кислотам. Переносящие сильное подкисление плесневые грибы относятся к строгим аэробам и в хорошо укрытом заквашиваемом корме размножаться не могут.

Таким образом, герметизация и кислотность силоса — главнейшие факторы, определяющие его стойкость при хранении. Снижение по тем или иным причинам кислотности корма неминуемо ведет к его порче.

Для нормального силосования различных кормов требуется неодинаковое подкисление. Иногда при содержании молочной кислоты 0,5% корма снижается до 4,2, т. е. до показателя, свойственного хорошему силосу. В других случаях для этого требуется 2% той же кислоты. Такое колебание зависит от различного проявления буферных свойств некоторых составных частей растительного сока.

Механизм действия буферов заключается в том, что в их присутствии значительная часть ионов водорода нейтрализуется. Поэтому, несмотря на накопление кислоты, реакция среды почти не снижается до тех пор, пока не израсходован весь буфер. В силосе образуется запас так называемых связанных буферами кислот. Роль буферов могут играть различные соли и некоторые органические вещества (например, протеины), входящие в состав растительного сока.

Более буферный корм для получения хорошего силоса должен иметь больше Сахаров, чем менее буферный. Следовательно, силосуемость растений определяется не только богатством их сахарами, но и специфическими буферными свойствами. Основываясь на буферности сока растений, можно теоретически вычислить нормы сахара, необходимые для успешного силосования различного растительного сырья.

Буферность сока растений находится в прямой зависимости от количества в них белков. Поэтому большинство бобовых растений трудно силосуется, так как в них относительно мало сахара (3—6%) и много белка (20—40%). Прекрасная силосная культура — кукуруза. В стеблях и початках ее содержится 8—10% белка и около 12% сахара. Хорошо силосуется подсолнечник, в котором много белка (около 20%) и достаточно углеводов (более 20%). Приведенные показатели рассчитаны на сухое вещество.

Зная буферность корма и его химический состав, можно решить вопрос о силосуемости того или иного растения. В основном силосуемость связывают с запасом моно- и дисахаридов, дающих

необходимое подкисление. Минимальное их содержание для доведения значения реакции среды корма до pH 4,2 может быть названо *сахарным минимумом.* По данным *А. А. Зубрилина,* если корм содержит больше сахара, чем показывает вычисленный сахарный минимум, он будет хорошо силосоваться.

Технически определить сахарный минимум несложно. Титрованием устанавливают необходимое количество кислот для подкисления пробы исследуемого корма до pH 4,2. Затем определяют количество простых Сахаров в корме. Допуская, что около 60% Сахаров корма превращается в молочную кислоту, нетрудно рассчитать, хватает ли имеющегося сахара для должного подкисления корма.

Для улучшения силосуемости корма с низким содержанием углеродов его смешивают с кормами, содержащими много сахара. Можно улучшить состав силосуемого корма, добавив к нему по определенному расчету патоку-мелассу. В некоторых кормах слишком много углеводов. При силосовании в таком случае возникает избыточная кислотность (явление перекисления силоса). Слишком кислый корм животные поедают неохотно. Для борьбы с перекислением силоса корма, содержащие много сахара, смешивают с кормами, в которых мало углеводов. Кислый корм может быть нейтрализован добавкой $CaCO_3$.

В процессе квашения некоторая часть белка превращается в аминокислоты. Подобная трансформация в основном связана с деятельностью ферментов растительных тканей, а не бактерий. Поскольку аминокислоты животные усваивают хорошо, частичный перевод протеинов в аминокислоты не должен сказываться на уменьшении кормовых достоинств силосуемой массы. Глубокого распада белка с образованием аммиака в хорошем силосе не бывает. Во время силосования происходит частичная потеря витаминов в заквашиваемой массе, но, как правило, значительно меньшая, чем при сушке сена.

Микрофлора силоса. Среди молочнокислых бактерий силоса имеются кокки и неспорообразующие палочки: *Streptococcus lactis, S. thermophilus, Lactobacillus plantarum, L. brevis,* являющиеся анаэробами.

На характере продуктов, образуемых молочнокислыми бактериями, сказываются не только биохимические особенности той или иной культуры, но и вид углевода. Например, если сбраживается не гексоза, а пентоза, то один продукт брожения имеет три атома углерода, а другой только два (первое вещество — молочная кислота, второе — уксусная):

$$\underset{\text{Пентоза}}{6C_5H_{10}O_5} \longrightarrow \underset{\text{Молочная кислота}}{8C_3H_6O_3} + \underset{\text{Уксусная кислота}}{3C_2H_4O_2}$$

В растительном сырье имеются пентозаны, дающие при гидролизе пентозы. Поэтому даже при нормально идущем созревании силоса в нем обычно накапливается некоторое количество уксусной кислоты, которая также образуется некоторыми другими молочнокислыми бактериями из гексоз.

Большинство молочнокислых бактерий живут при температуре 7—42 °С (оптимум около 25—30 °С). Отдельные культуры проявляют активность при низких температурах (около 5 °С). Отмечено, что при разогревании силоса до 60—65 °С в нем накапливается молочная кислота, которую продуцируют некоторые термотолерантные бактерии, например *Bacillus subtilis.*

В силосе могут развиваться кислотоустойчивые дрожжи, не оказывающие вредного влияния на качество корма. В правильно заложенной заквашиваемой массе дрожжи активно не размножаются. Это объясняется тем, что они не могут расти при низком уровне окислительно-восстановительного потенциала, создаваемого в силосе молочнокислыми бактериями. Критические точки rH_2 для масляно-кислых бактерий — около 3, для молочнокислых бактерий — 6—9, для дрожжей — 12—14.

Развитие маслянокислых бактерий связано со следующими их особенностями. Эти бактерии более строгие анаэробы, чем молочнокислые бактерии, но неустойчивы к высокой кислотности и прекращают расти при реакции среды, близкой к pH 4,7—5,0, как и большинство гнилостных бактерий. Накопление масляной кислоты нежелательно, так как она имеет неприятный запах и содержащий ее корм скот поедает плохо. При подобном брожении корма кроме масляной кислоты накапливаются амины, аммиак и другие вредные продукты.

В растительной массе, заложенной в силос, могут быть бактерии кишечной группы. Они вызывают гнилостный распад белка, а сахар превращают в малоценные для консервирования продукты. При нормально протекающем силосовании бактерии кишечной группы быстро отмирают, так как они некислотоустойчивы.

Фазы созревания силоса. Рассмотрим динамику созревания силоса. Процесс квашения можно условно разбить на три фазы.

Первая фаза созревания заквашиваемого корма характеризуется развитием смешанной микрофлоры. На растительной массе начинается бурное размножение разнообразных групп микроорганизмов, внесенных с кормом в силосное помещение. Обычно первая фаза брожения бывает кратковременной. Окончание первой, или предварительной, фазы брожения связано с подкислением среды, угнетающей деятельность большей части микрофлоры корма. К этому времени в силосе устанавливаются анаэробные условия, так как весь кислород уже израсходован аэробами.

Во второй фазе — фазе главного брожения — основную роль играют молочнокислые бактерии, продолжающие подкислять корм. Большинство неспорообразующих бактерий погибает, но бациллярные формы в виде спор могут длительное время сохраняться в заквашенном корме. В начале второй фазы брожения в силосе обычно преобладают кокки, которые позднее сменяются палочковидными молочнокислыми бактериями, отличающимися большой кислотоустойчивостью.

Третья фаза брожения корма — конечная — связана с постепенным отмиранием в созревающем силосе возбудителей молочнокислого процесса. К этому времени силосование подходит к естественному завершению. Быстрота подкисления корма зависит не только от количества углеводов в нем, но и от структуры растительных тканей. Чем быстрее отдают растения сок, тем скорее идет процесс квашения при одних и тех же условиях. Быстроте заквашивания способствует измельчение массы, облегчающее отделение сока.

О качестве силосованного корма можно судить по составу органических кислот, накопившихся при брожении (табл. 23).

Таблица 23

Примерное соотношение кислот в силосе разного качества

Качество силоса	Значение pH	Соотношение кислот
Очень хорошее	4,2 и ниже	Молочная — 60% и более, уксусная — 40% и менее, масляная — 0
Хорошее	4,5 и ниже	Молочная — 40—60%, уксусная — 60—40%, масляная — 0 (или следы)
Среднее	Около 4,5	То же, но масляная — до 0,2%
Плохое	Выше 4,7	Молочная — мало, масляная — значительно
Очень плохое	Выше 5,5	Преобладают летучие кислоты, в том числе и масляная

Регулирование процесса силосования. Для регулирования процесса силосования существует несколько приемов. Среди них отметим использование заквасок молочнокислых бактерий. Указанные микроорганизмы находятся на поверхности растений, но в небольшом количестве. Поэтому требуется определенный срок, в течение которого молочнокислые бактерии усиленно размножаются, и только тогда заметно проявляется их полезная деятельность. Данный срок можно сократить, искусственно обогащая корм молочнокислыми бактериями. Особенно целесообразно внесение заквасок при работе с трудносилосуемым материалом.

Предложена технология приготовления и использования бактериальных заквасок, улучшающих качество корма. В большинстве случаев рекомендуют использовать молочнокислую бактерию *Lactobacillus plantarum*. Иногда к ней добавляют другого возбудителя молочнокислого брожения. Готовят как жидкие, так и сухие закваски. Данный микроорганизм в отличие от других молочнокислых бактерий может сбраживать не только простые углеводы, но и крахмал.

Предлагают также добавлять в силосуемую массу, бедную моносахаридами, ферментные препараты (мальтаза, целлюлаза), разлагающие полисахариды и обогащающие корм сахарами, доступными молочнокислым бактериям.

При силосовании кормов с большим запасом углеводов, например кукурузы, образуется слишком кислый корм, что нежелательно. Поэтому в таких случаях готовят закваску из пропионовокислых бактерий. При ее использовании часть молочной кислоты превращается в пропионовую и уксусную кислоты, которые слабо диссоциируют. В результате корм становится менее кислым. Пропионовокислые бактерии полезны еще и тем, что вырабатывают значительное количество витамина B_{12}.

Для улучшения силосуемости труднозаквашиваемых кормов используют препарат милазы. Указанный фермент участвует в превращении крахмала в мальтозу, что увеличивает резерв сахаров, доступных молочнокислым бактериям, и усиливает подкисление корма.

Рекомендованы также буферные кислотные смеси, в состав которых входят разные минеральные кислоты. С успехом используют органические кислоты, например муравьиную.

Кислотные препараты пригодны для труднозаквашиваемых кормов. Их введение в силосуемый корм подавляет развитие сапротрофной микрофлоры первой фазы брожения, а снижение реакции среды до pH 4 не препятствует развитию молочнокислых бактерий, которые поддерживают кислотность корма на низком уровне.

Для консервирования плохо заквашиваемых кормов пригодны также препараты, содержащие формиат кальция, метабисульфит, пиросульфит натрия, сульфаминовую, бензойную, муравьиную кислоты и другие вещества, подавляющие побочные микробиологические процессы в силосуемом корме и сохраняющие его.

Другие способы микробиологического консервирования кормов. Изложенные выше сведения относятся к консервирова-

нию кормов, имеющих нормальную влажность (около 75%). При влажности консервируемой массы 50—65% происходит хорошая ферментация даже при дефиците углеводов и получается корм высокого качества — **сенаж**. При этом реакция среды корма может быть довольно высокой — около 5, так как гнилостные бактерии обладают меньшим осмотическим давлением, чем молочнокислые.

При подсушивании корма в нем приостанавливаются гнилостные процессы, но продолжают действовать возбудители молочнокислого брожения. На этом основано приготовление сенажа, во время которого несколько подсушенную массу закладывают для консервирования, как при холодном силосовании.

В клевере, влажность которого составляет 50% и ниже, также развиваются микробиологические процессы. Они протекают тем слабее, чем суше корм. Доминирующей микрофлорой в консервируемом корме очень быстро становятся молочнокислые бактерии. Данная группа довольно специфичных микроорганизмов близка к *Lactobacillus plantarum,* но отличается способностью расти в условиях значительно более сухой среды и сбраживать крахмал. Развитие указанных микроорганизмов в корме приводит к накоплению в нем некоторого количества молочной и уксусной кислот. По типу сенажирования хорошо сохраняются и предназначенные на корм измельченные початки кукурузы с влажностью 26—50% (оптимум 30-40%).

В последнее время рекомендовано обрабатывать недосушенное сено (влажностью около 35%) жидким аммиаком, который действует как консервант. При введении аммиака в корме создается щелочная реакция, блокирующая микробиологические и ферментные процессы. После обработки аммиаком корм укрывают изоляционным материалом.

Некоторые технологические приемы консервирования кормов основаны на принципах, исключающих развитие в корме микробиологических и ферментативных процессов. Например, производство травяной муки, гранулирование, брикетирование и изготовление смесей идут с применением высоких температур, а иногда и высокого давления.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие процессы используют при подготовке кормов к хранению? 2. Жизнедеятельность каких бактерий обусловливает силосование зеленого корма? 3. Чем различается деятельность гомоферментативных и гетероферментативных форм бактерий? 4. Какие условия определяют характер продуктов, образуемых молочнокислыми бактериями?

Микробиологическая трансформация отходов агропромышленного комплекса[1]

21.1. Аэробная микробиологическая очистка сточных вод

При рассмотрении экологических проблем необходимо учитывать, что важной составной частью современной микробиологии и биотехнологии является очистка воды от загрязнений и утилизация всевозможных отходов агропромышленного комплекса. Несмотря на постоянное совершенствование химической очистки сточных вод, микробиологическая очистка сельскохозяйственных стоков перед их сливом в водоем является совершенно необходимой. Методы такой очистки основаны на использовании специфических биологических сообществ — **активного ила,** для глубокой утилизации как органических, так и неорганических загрязнений, оставшихся в воде после осуществления всех других возможных вариантов ее очистки.

Необходимо подчеркнуть, что применение живого консорциума — активного ила — для удаления примесей из воды основано на уникальной способности микроорганизмов утилизировать не только те субстраты, которые для них оптимальны и таким образом привычны, но и огромное количество других веществ, в том числе (что особенно важно) синтетических, созданных человеком искусственно и поэтому отсутствовавших ранее в природе. Понятно, что из-за часто меняющегося состава сточных вод необходимо использовать для их очистки сложные сообщества микроорганизмов, включающие бактерии, водоросли, простейшие, которые путем согласованного метаболизма с большей или меньшей скоростью поглощают примеси из воды. Следствием этого, в частности, является и необходимость их адаптации к составу воды и даже к микрофлоре окружающей среды. Поэтому в каждом конкретном очистном сооружении эксплуатируется активный ил определенного индивидуального состава.

Общие показатели загрязненности сточных вод. Под *качеством воды* понимают совокупность ее характеристик и свойств, обусловленных природой и концентрацией содержащихся в ней веществ.

В связи с невозможностью индивидуального аналитического определения всех присутствующих в сточной воде соединений при-

[1] Данная глава построена на материале, более сложном, чем основной текст учебника, и может быть рекомендована подготовленному читателю — студентам старших курсов, аспирантам и т. д.

бегают к суммарной оценке их содержания. К общим показателям загрязненности сточных вод следует отнести те, которые характеризуют общие свойства воды: органолептические; физико-химические; содержание нерастворимых примесей (взвешенных веществ) или зольность; концентрацию растворенных веществ (общее содержание органических и неорганических примесей); органический углерод; перманганатную и дихромную (бихроматную) окисляемость (химическое потребление кислорода — ХПК). Совокупность этих показателей позволяет оценить общее состояние сточных вод и предложить наиболее эффективный способ их очистки.

Следует, однако, отметить, что часто в сточных водах могут присутствовать химические соединения, которые даже в незначительных количествах сильно влияют как на свойства воды, так и на возможность очистки данного вида стоков. В подобных случаях необходим более детальный анализ состава сточной воды с выяснением не только концентраций тех или иных соединений, но и более полным определением качественного и количественного состава загрязнений.

Определение таких показателей, как органолептические (цвет, вид, запах, прозрачность, мутность), оптическая плотность, цветность, pH, температура и т. д., не вызывает каких-либо трудностей экспериментального или методического характера. Значительно сложнее определить общее содержание органических веществ в сточной воде, которое необходимо знать для контроля работы очистных сооружений, повторного использования сточных вод в технологических процессах, выбора методов очистки и доочистки, определения окончания процесса очистки, а также для оценки возможности сброса воды в водоемы.

Из большого числа способов, применяемых для определения содержания органических веществ, приведем два, наиболее широко используемых при проведении процессов биологической очистки сточных вод: **химическое потребление кислорода (ХПК)**[1] и **биологическое потребление кислорода (БПК)**[2].

[1] *Химическое потребление кислорода* (ХПК). Методика основана на окислении веществ, присутствующих в сточных водах, 0,25%-ным раствором дихромата калия при кипячении пробы в течение 2 ч в 50%-ном (по объему) растворе серной кислоты. Для полноты окисления органических веществ применяется катализатор — сульфат серебра. Многочисленные исследования показали, что большинство органических соединений в таких условиях окисляются до H_2 и CO_2, однако ряд соединений (пиридин, бензол и его гомологи, нафталин) в этом режиме окисляются не полностью. Тем не менее дихромный метод имеет широкое применение.

[2] *Биохимическое потребление кислорода* (БПК). Измеряется количеством кислорода, которое расходуется микроорганизмами при аэробном биологическом разложении веществ, содержащихся в сточных водах, при стандартных условиях за определенный интервал времени.

Измерения БПК выполняют следующим образом: в герметический сосуд (ферментер) помещают определенное количество исследуемой сточной воды, которую засевают микроорганизмами. В процессе культивирования регистрируется изменение количества кислорода, использованного на окисление соединений, присутствующих в сточных водах. В зависимости от длительности культивирования различают биохимическое потребление кислорода за 5, 20 суток и полное окисление; эти показатели условно обозначаются как $БПК_5$; $БПК_{20}$; $БПК_n$.

Измерение $БПК_5$ целесообразно проводить для стоков, содержащих легкоусвояемые загрязнения — углеводы, низшие спирты. Для стоков химических производств, включающих большой спектр органических загрязнений, лучше определять $БПК_n$.

Особое значение при измерении БПК имеют количество и состав микроорганизмов. Оптимальным вариантом при этом является использование микрофлоры из уже работающих биологических систем, адаптированной именно к данному спектру загрязнений. Количество вносимой микрофлоры должно соответствовать ее концентрации в работающих очистных сооружениях.

Цель очистки производственных сточных вод — удаление из них взвешенных и растворимых органических и неорганических соединений до концентраций, которые не превышают заранее регламентированные (ПДК). В зависимости от характера загрязнений и их концентраций возможно применение различных способов очистки сточных вод. Наиболее распространены: *механические* (отстаивание, фильтрование); *механофизические* (коагуляция, нейтрализация с последующим отстаиванием); *физико-химические* (ионный обмен, сорбция); *термические; биохимические.*

Каждый из перечисленных способов имеет преимущества и недостатки, свою область применения, поэтому чаще всего пользуются несколькими способами очистки, что позволяет более полно извлекать загрязнители.

Аэробные процессы биохимической очистки сточных вод. Существуют две большие группы аэробных процессов биоочистки: экстенсивные и интенсивные. К экстенсивным относятся методы, непосредственно не связанные с управляемым культивированием микроорганизмов: поля орошения, поля фильтрации; биопруды. Микроорганизмы, находящиеся в верхних слоях почвы полей орошения и фильтрации или в воде биопрудов, образуют ценозы, за счет деятельности которых и происходит очистка воды.

В основе интенсивных способов лежит деятельность активного ила или биопленки, т. е. естественно возникающего биоценоза, формирующегося на каждом конкретном производстве в зависимости от состава сточных вод и выбранного режима очистки. Формирование биоценоза — процесс достаточно длительный и иду-

щий постоянно в ходе очистки сточной воды в промышленных аппаратах: аэротенках, биофильтрах.

Активный ил представляет собой темно-коричневые хлопья размером до нескольких сотен микрометров; микроскопия показала, что он состоит на 70% из живых организмов и около 30% составляют твердые частицы неорганической природы.

Живые организмы вместе с твердым носителем, к которому они прикреплены, образуют *зооглей* — симбиоз популяций организмов, покрытый общей слизистой оболочкой. Причины возникновения хлопьев активного ила не совсем понятны, зооглей может формироваться за счет флокуляции или адгезии клеток на поверхности носителя. Взаимодействие микроорганизмов в пределах одного зооглея достаточно сложно, и основой его служат, по всей видимости, симбиотические связи организмов разных популяций.

Соотношение капсульных и бескапсульных форм клеток в иле называется *коэффициентом зооглейности* K_2

Микроорганизмы, выделенные из активного ила, относятся к различным родам: *Actinomyces, Arthrobacter, Bacillus, Corynebacterium, Desulfotomaculum, Micrococcus, Pseudomonas, Sarcina* и др. Наиболее многочисленны бактерии рода *Pseudomonas.* Они окисляют спирты, жирные кислоты, парафины, ароматические углеводороды, углеводы и др. Широко представлены в активном иле и бактерии родов *Flavobacterium, Achromobacter, Mycobacterium* (выделено 30 видов), которые осуществляют деградацию нефти, парафинов, нафтенов, фенолов, альдегидов и жирных кислот. Алифатические углеводороды окисляются представителями рода *Bacillus.* Окислительная способность перечисленных микроорганизмов для различных органических соединений различна, и лишь для бактерий рода *Pseudomonas* она практически одинакова для разных видов загрязнений.

В зависимости от внешней среды, которой в данном случае является сточная вода, та или иная группа бактерий может оказаться преобладающей, а остальные становятся спутниками основной группы.

При изменении состава сточной воды может увеличиться численность одного из видов микроорганизмов, однако другие культуры, проигрывающие в конкурентной борьбе за субстрат, все равно остаются в составе биоценоза. На взаимоотношения микроорганизмов ила влияют и продукты биосинтеза различных групп: возможен не только симбиоз или антагонизм микроорганизмов, но также и взаимодействие их по принципу аменсализма, комменсализма или нейтрализма. На формирование ценозов активного ила могут оказывать влияние сезонные колебания температуры (ведущие к преобладанию психрофильных форм микроорганизмов в зимний период),

обеспеченность кислородом и присутствие в сточных водах минеральных компонентов.

Роль всех этих параметров при формировании активного ила делает процесс достаточно сложным и практически не воспроизводимым: даже для стоков, имеющих одинаковый состав, но возникающих в разных регионах, невозможно получить одинаковые биоценозы активного ила. Существенная роль в создании и функционировании консорциума клеток принадлежит простейшим.

Функции простейших достаточно многообразны: сами они не принимают непосредственного участия в потреблении органических веществ, но регулируют видовой и возрастной состав микроорганизмов в активном иле, поддерживая его на оптимальном уровне. Поглощая большое количество бактерий, простейшие способствуют выходу значительного количества бактериальных экзоферментов, которые могут концентрироваться в слизистой оболочке и принимать участие в деструкции загрязнений. В активных илах встречаются разнообразные простейшие: саркодовые *(Sarcodina);* жгутиковые *(Mastigophora);* ресничные инфузории *(Ciliata);* сосущие инфузории *(Suctoria).*

Простейшие выбирают из смешанной культуры бактерий лишь те виды, которые они усваивают. Одна инфузория пропускает через свой организм от 20 до 40 тыс. бактерий за сутки.

Поедание старых ослабленных форм облегчает размножение оставшихся и приводит к появлению большого количества молодых, биологически активных форм. При хорошей работе очистных сооружений представители класса саркодовых (амебы рода *Amoeba)* развиваются в активных илах в незначительных количествах.

В активных илах высокого качества на 1 млн клеток бактерий должно быть 10—25 клеток *Protozoa.* Это соотношение называется *коэффициентом протозойности* K_p. Скорость биохимического окисления растет с увеличением значения K_z и K_p. Следует отметить, что простейшие очень чувствительны к присутствию в сточных водах небольших концентраций определенных органических веществ: так, фенол и формальдегид уже в незначительных концентрациях угнетают их развитие.

В активном иле идентифицированы бактерии множества различных видов, но, как правило, их определение до вида не представляет большого интереса. Следует выделить три основные группы: флокулообразующие бактерии; органотрофные нитчатые бактерии; бактерии-нитрификаторы.

Флокулообразователи необходимы не только для деградации органических веществ (определяемых как биохимическая потребность в O_2 — БПК), но и для образования стабильных флокул, которые способны быстро осаждаться с образованием плотного ила в отстойнике.

Нитрификаторы превращают аммонийный азот в нитраты. Эти бактерии необходимы, если процесс направлен на получение выходных стоков с низкой концентрацией аммонийного азота.

Нитчатые бактерии представляют собой до некоторой степени аномалию. С одной стороны, известно, что они образуют скелет, вокруг которого формируются флокулы, с другой — являются источником двух проблем — плохого осаждения и образования устойчивой пены.

Простейшие потребляют бактерии и обеспечивают низкую мутность выходных стоков. Всего было идентифицировано около 200 видов простейших, но именно инфузории, в частности круглоресничные (прикрепленные к субстрату), такие как сувойки *(Vorticella)* и *Opercularia,* имеют наибольшее значение. Применительно к илу термин «активный» означает, что биомасса:

- представляет собой микрофлору, содержащую все ферментативные системы, необходимые для деградации загрязнений, которые следует удалить;
- имеет поверхность с сильной адсорбционной способностью;
- способна образовывать стабильные флокулы, которые легко осаждаются при отстаивании.

Несколько иную картину представляет биоценоз, возникающий на биофильтрах. На поверхности загрузочного материала биофильтра происходит образование биологической пленки: микроорганизмы прикрепляются к носителю и заполняют его поверхность. В отличие от биоценоза активного ила, количественный и видовой состав которого практически одинаков во всей системе очистки, на разных уровнях биофильтра создаются свои ценозы микроорганизмов, которые порой резко отличаются не только качественным, но и количественным составом. Это вызвано тем, что по мере прохождения сточной воды через биофильтр за счет жизнедеятельности предыдущего ценоза меняется характеристика органических загрязнений воды, попадающей на следующий уровень. При этом сначала потребляются более легкоусвояемые загрязнения и преимущественно развивается микрофлора, усваивающая эти соединения с большей скоростью.

В свою очередь, сточная вода обогащается продуктами жизнедеятельности этого ценоза. По мере дальнейшего продвижения воды происходит потребление все более трудноусвояемых компонентов смеси и, следовательно, развиваются другие организмы, которые функционируют за счет потребления части биопленки, оторвавшейся с поверхности носителя. Созданный таким образом биоценоз способен практически полностью извлечь из сточной воды все органические примеси.

Эффективного управления процессом биологической очистки можно достичь лишь при правильном подборе параметров процесса,

обеспечивающих необходимую полноту извлечения загрязнений. Основные параметры, влияющие на биологическую очистку, таковы: температура; pH; количество растворенного кислорода; уровень перемешивания; концентрация и возраст циркулирующего в очистных системах активного ила; наличие в воде токсичных соединений.

Техника аэробных способов очистки. Аэробный способ очистки сточной воды основан на использовании системы аэротенков (вторичных отстойников). **Аэротенк** — открытое железобетонное сооружение, через которое пропускается сточная вода, содержащая органические загрязнения и активный ил.

Суспензия ила в сточной воде на протяжении всего времени нахождения в аэротенке подвергается аэрации воздухом. В зависимости от способа смешения суспензии активного ила с очищаемой водой и гидродинамического режима движения суспензии активного ила аэротенки делятся на: аэротенк-вытеснитель; аэротенк-смеситель; аэротенк сложного типа.

В аэротенке-вытеснителе свежая порция активного ила и очищаемая вода одновременно подаются в аппарат и далее происходит движение суспензии активного ила по аппарату в режиме, приближающемся к идеальному вытеснению.

В аэротенке-смесителе активный ил и очищаемая сточная вода поступают по всей длине аппарата одновременно и в аппарате создается режим, близкий к полному смешению, одновременно из аппарата отводится суспензия активного ила. В аппаратах сложного типа на разных этапах очистки одновременно реализуется и режим смешения, и режим вытеснения.

Различия в гидродинамических режимах аэротенков в первую очередь влияют на физиологическое состояние популяции микроорганизмов и, следовательно, на скорость и глубину потребления субстрата, которым являются загрязнения из сточной воды. Развитие популяции микроорганизмов в аэротенке-вытеснителе происходит по законам турбулентной культуры. Развитие микроорганизмов определяется законами периодического роста. Поступивший из вторичного отстойника активный ил имеет определенный исходный состав популяции: вначале, после контакта с очищаемой водой, развиваются те микроорганизмы, которые потребляют наиболее легкоусвояемые компоненты загрязнения. В результате концентрация загрязнений в сточной воде по мере ее продвижения по аппарату снижается и одновременно в активном иле увеличивается концентрация соответствующих клеток. При достижении концентраций легкоусвояемого компонента, лимитирующих рост, начинают потребляться другие типы субстратов и преимущество в развитии получают другие группы микроорганизмов. При снижении концентраций всех компонентов сточной воды до минимальных процесс развития по-

пуляции останавливается: видовой и количественный состав активного ила возвращается к начальному состоянию. Такой процесс при его достаточной длительности позволяет практически полностью извлечь все загрязнения из сточной воды.

В аэротенке-смесителе сточная вода, попадая в аэротенк, практически мгновенно распределяется по объему, при этом концентрация загрязнений снижается до стационарных значений. Развитие популяции микроорганизмов в аэротенке-смесителе происходит по тем же законам, что и развитие микробов в хемостате.

В аэротенках сложного типа сочетаются оба способа проведения процесса.

Как правило, схема аэробной биологической очистки включает в себя следующие стадии: усреднение и осветление сточных вод от механических примесей (усреднители, песколовки, отстойники); аэробная биологическая очистка осветленных сточных вод (аэротенки, генераторы активного ила, вторичные отстойники); доочистка сточных вод (биологические пруды, фильтровальные станции); обработка осадков (иловые площадки, сушилки, печи и т.д.).

На практике применяются одноступенчатые и многоступенчатые системы биологической очистки. Сточные воды поступают в усреднитель, где происходит интенсивное перемешивание стоков с различным качественным и количественным составом. Перемешивание осуществляется за счет барботажа воздуха. При очистке фекальных стоков и отходов нефтепереработки необходимым элементом очистных сооружений является система механической очистки — песколовки и первичные отстойники.

К системе биологической очистки относятся не только аэротенк и вторичный отстойник, но и регенератор активного ила, который представляет собой часть аэротенка, куда подается только суспензия возвратного активного ила и не подается вода.

Очищенная вода и активный ил из аэротенка подаются во **вторичный отстойник,** где происходит отделение активного ила от воды. Часть активного ила вновь возвращается в систему очистки, а избыточный активный ил, образовавшийся в результате роста микробов, поступает на иловые площадки с последующим вывозом его после обезвоживания на поля.

Система более полной биологической доочистки может состоять из множества элементов, которые определяются дальнейшим назначением сточной воды. Возможно применение **биологических прудов,** где биологически очищенная вода проходит дальнейшее осветление и насыщается кислородом. Часто вода осветляется с помощью различных механических систем, например песчано-гравийных фильтров, иногда воду хлорируют или озонируют.

Интенсификацию процессов биологической очистки можно проводить путем аэрации суспензии активного ила чистым O_2. Для этого были разработаны аппараты закрытого типа — **окситенки** с принудительной аэрацией сточной воды. В целом схема очистки стоков в окситенках практически не отличается от рассмотренной общей схемы аэробной очистки сточной воды.

Очистка сточной воды с использованием биофильтров. В отличие от аэротенков в биофильтрах клетки микроорганизмов находятся в неподвижном состоянии, так как прикреплены к поверхности пористого носителя. Образовавшуюся таким образом биопленку можно рассматривать как иммобилизованные клетки, хотя в этом случае иммобилизована не монокультура, а целый консорциум. Очищаемая вода контактирует с неподвижным носителем, на котором иммобилизованы клетки, и за счет их жизнедеятельности происходит снижение концентрации загрязнителя.

Преимущество применения биофильтров состоит в том, что формирование конкретного биоценоза приводит к практически полному удалению всех органических примесей. В качестве загружаемого твердого материала можно использовать керамику, щебень, гравий, керамзит, металлические и полимерные материалы с высокой пористостью. Существенным признаком конструкции является и режим аэрации воды, по которому все биофильтры можно разделить на: аппараты с принудительной циркуляцией и аппараты с естественной циркуляцией.

Технологические схемы с использованием биофильтров мало отличаются от схем очистки с применением аэротенков. Принцип вытеснения жидкости с одновременной фиксацией клеток микроорганизмов в иммобилизованном состоянии положен и в основу работы аэротенков-вытеснителей с применением *стеклоершей.* Стеклоерши погружают в аэрированную сточную воду, и на их поверхности происходит накопление биоценоза активного ила. Последний при этом так же, как и при работе с биофильтрами, развивается на каждом участке ершей неодинаково и изменяется в объеме как количественно, так и по качественному составу. Предполагается, что такая система найдет широкое применение в очистке локальных стоков, под которыми понимают стоки производств с узким спектром загрязнений.

Экстенсивные способы очистки сточных вод. Несмотря на очевидную необходимость создания интенсивных методов биологической очистки водных выбросов, до сих пор широко применяются и экстенсивные способы: биологические пруды, поля орошения, поля фильтрации.

Пруды с искусственной или естественной аэрацией также относятся к сооружениям биологической очистки, в которых под воз-

действием биоценоза активного ила происходит окисление органических примесей. Помимо водорослей и бактерий, в прудах представлена микро- и макрофауна: простейшие, черви, коловратки, насекомые и др. Особую роль играют биопруды в процессах окончательной очистки стоков после очистных сооружений, когда остающиеся примеси осложняют процесс дальнейшей утилизации вод. Применение биопрудов позволяет практически полностью удалить остаточные количества многих соединений.

Поля фильтрации и **поля орошения** также используются для очистки сточных вод, при этом первые служат только для целей очистки, на них подается максимально возможное количество жидкости. Поля орошения предназначены для выращивания сельскохозяйственных растений, и вода на них подается по мере необходимости. Процесс самоочищения воды осуществляется в этих случаях за счет жизнедеятельности различных групп почвенных организмов — бактерий, микромицетов, водорослей, простейших, червей и членистоногих: на поверхности почвенных комочков образуется биопленка.

Решающим фактором, влияющим на формирование почвенного биоценоза, является структура почвы.

Существенную роль в процессах очистки сточных вод на полях фильтрации и орошения играют нитрификаторы. В летний период на 1 га образуется до 70 кг нитратов, которые с током жидкости поступают в нижние горизонты, где существуют анаэробные условия. Восстановление нитратов денитрификаторами делает возможным окисление сохранившихся в воде органических веществ. Хотя дефицит площадей не позволяет в настоящем и будущем широко использовать поля орошения и фильтрации, этот экстенсивный способ очистки сточных вод еще находит применение из-за своей простоты.

21.2. Анаэробная микробиологическая очистка сточных вод

Сравнение способов аэробной и анаэробной очистки. Известно, что при выборе между аэробными и анаэробными способами очистки сточных вод обычно склоняются в сторону первых, так как эти системы признаны более надежными, стабильными, они лучше изучены. Однако анаэробные процессы очистки имеют свои несомненные преимущества. Во-первых, в анаэробных процессах образуется меньше ила, чем в аэробных. Переработка ила может быть весьма дорогостоящей операцией из-за его высокой влажности (90—97%). В аэробных процессах образуется от 1 до 1,5 кг биомассы (ила), в то время как в анаэробных — только 0,1—0,2 кг на

каждый удаленный килограмм ВПК. Во-вторых, в анаэробных процессах образуется метан (CH_4), который может использоваться как горючее и, в-третьих, даже без учета использования метана в качестве источника энергии потребность в энергии на аэрацию в аэробных процессах очистки превышает потребность в энергии на перемешивание при анаэробных процессах.

Главный недостаток анаэробных систем — меньшая скорость реакции по сравнению с аэробными процессами, поэтому требуются установки больших размеров.

Системы, использующие анаэробные процессы, стали известны в Европе примерно 100 лет назад. **Септиктенки** представляли собой отстойники, в которых осевший ил подвергался анаэробной деградации. Качество отделения твердой фракции и сбраживания ила было улучшено с помощью перегородок, регулирующих направление потока внутри отстойников. Впоследствии два этих процесса были разделены и проводились в отдельных отстойниках. Анаэробное сбраживание ила используется для улучшения качества удаляемого ила: уменьшения его массы и количества патогенных микроорганизмов в нем. Септиктенки эксплуатируются обычно при температуре около 35 °С и с большим временем выдерживания (больше 20 сут). При этом не делается попыток создать механизм, удерживающий биомассу на время, большее, чем время пребывания жидкости.

Развитие быстрых анаэробных процессов требует не только оптимизации условий анаэробной биодеградации, но и поддержания высокой концентрации активной биомассы в аппарате. Это относится большей частью к анаэробным системам очистки сточных вод, работающим в мезофильном интервале температур. Существуют также криофильные (работающие при температуре, не превышающей 20 °С) и термофильные (работающие при температуре 55 °С и выше) реакторы; большинство систем, работающих без обогрева (включая септиктенки), относятся к криофильным. Микробная смесь в любом реакторе отражает тип разлагаемой органики и характер условий в реакторе, включая такие, как концентрация питательных веществ, перемешивание и тип вводного устройства.

Преобладающими видами в таких реакторах являются бактерии, однако в силу некоторой специфики продукты жизнедеятельности одних бактерий являются субстратом для других, и, следовательно, должен поддерживаться баланс между численностью бактерий и концентрацией субстрата.

На протяжении долгого времени для описания анаэробного процесса использовалась упрощенная модель, согласно которой сложные молекулы разлагаются до простых (в основном летучих жирных кислот) «кислотообразующими» бактериями, а эти проме-

жуточные соединения разлагаются до метана и CO_2 «метанообразующими» бактериями. Биохимия этого процесса, оказавшегося значительно сложнее, теперь изучена намного более детально. Важнейшими параметрами, регулирующими процесс, служат и промежуточные концентрации летучих жирных кислот.

Изучение термодинамики и кинетики анаэробного процесса показало, что для обычных реакторов с мешалкой, в условиях отсутствия какого-либо удерживания биомассы или рециркуляции, минимальное время пребывания жидкости в аппарате составляет 5 суток. В других системах можно уменьшить время пребывания жидкости за счет увеличения времени пребывания биомассы свыше 5 суток.

Микробиология анаэробной очистки сточных вод. Недавние успехи в изучении микробиологического и биохимического механизмов анаэробного сбраживания дают возможность оптимизации управления процессом, в частности предупреждения нестабильности в работе сбраживателя. Несмотря на развитие современной технологии выделения и культивирования облигатных анаэробов и наличие некоторых данных о составе микробных популяций в сбраживателях для городских и животноводческих стоков, о таксономии этих микроорганизмов известно пока мало. Хотя биохимические механизмы ферментации в смешанной культуре еще не вполне изучены, все лучшее понимание этих сложных взаимосвязей порождает доверие к широкомасштабному промышленному применению анаэробного сбраживания загрязнений. Процессы, протекающие в основном в бактериальной биомассе, включают конверсию сложных органических субстратов, таких как полисахариды, липиды и белки, в CH_4 и CO_2. Благодаря тому что бактериальное сообщество может менять используемые пути ферментации, оно функционирует как саморегулирующаяся система, поддерживающая значение pH, окислительно-восстановительного потенциала и термодинамическое равновесие оптимальным для роста образом и, следовательно, обеспечивающая стабильность сбраживателя.

По своим пищевым потребностям эти бактерии могут быть разделены на три обширные группы. Первая включает гидролитические бактерии-бродильщики, обычно называемые *ацидогенныши,* так как они обеспечивают начальный гидролиз субстрата и сбраживание углеводов до низкомолекулярных органических кислот и других малых молекул. Вторая группа представляет собой *гетероацетогенные* бактерии, которые продуцируют CH_3COOH и H_2. Третья — это *метаногенные* микроорганизмы (метаногены), которые продуцируют CH_4. Эта последняя группа может быть в дальнейшем подразделена на потребителей водорода (литотрофов), ук-

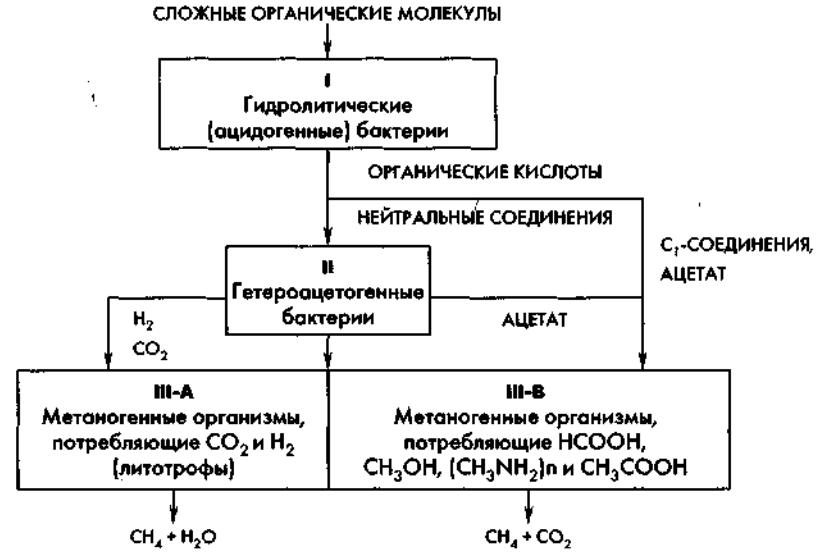


Рис. 70. Пути биодеградации субстрата при анаэробном сбраживании

сусной кислоты (ацетотрофов) и одноуглеродных (C_1) соединений (рис. 70).

Синергические эффекты, происходящие при сосуществовании этих групп, например различные скорости потребления субстратов и роста, могут быть объяснены совместным культивированием и возникают в результате взаимодействий, таких как видовой перенос водорода. Субстраты, содержащие серу и азот, могут вызывать рост еще двух дополнительных групп: сульфатредуцирующих бактерий и денитрификаторов.

Кроме характера субстрата, на состав популяции в процессе смешанной ферментации также влияют другие условия культивирования. Один из таких параметров — температура. Сбраживатели могут работать в криофильных (не выше 20 °С), мезофильных (20—45 °С) или термофильных (50—65 °С) условиях. Термофильные сбраживатели имеют высокие скорости реакции, но часто получаемая при этом выгода недостаточно велика, чтобы возместить стоимость дополнительной тепловой энергии, необходимой для поддержания более высоких температур. К тому же в этих условиях существует мало разновидностей, которые могут влиять на способность системы адаптироваться к различным субстратам или ингибирующим соединениям.

Поэтому большинство установок в настоящее время работает в температурном интервале 34—38 °С, что экономически выгодно и к тому же допускает существование большего числа видов микро-

организмов. Таким образом, дальнейшая информация будет относиться в основном к мезофильному сбраживанию.

Ниже приведены некоторые продукты анаэробного сбраживания — соединения, образующиеся в количестве, превышающем 0,2 моль на моль субстрата в неперегруженном анаэробном сбраживателе:

- *органические кислоты* — уксусная, пропионовая, масляная, капроновая, муравьиная, молочная, янтарная;
- *спирты и кетоны* — метанол, этанол, изопропиловый спирт, бутанол, глицерин, ацетон;
- *газы* — водород, метан, CO_2;
- *ферменты* — целлюлаза, алкогольдегидрогеназа;
- *витамины* — рибофлавин, витамин B_{12}.

Из других продуктов, образующихся в малых количествах, можно назвать малоновую кислоту, некоторые жирные кислоты с более длинной цепью и изомерные жирные кислоты, концентрация которых зависит от характеристик источника питания и культуральных условий.

Микроорганизмы анаэробного ила могут быть как облигатными, так и факультативными анаэробами. При сбраживании в мезофильных условиях размеры популяции гидролитических бактерий колеблются от 10^5—10^6 до 10^8—10^9 клеток на 1 мл ила. В нем можно обнаружить представителей различных родов, включая образующие и необразующие спор грамположительные палочки, такие как протеолитические *Eubacterium,* целлюлозолитические *Clostridium,* облигатные анаэробы, такие как *Acetobacterium, Bacteroides* и *Bifidobacterium* и факультативные анаэробы *Streptococcus* и сем. *Enterobacteriaceae.*

Грамположительные кокки играют значительную роль в сбраживании стоков свиноферм. Недавние исследования 130 культур, выделенных из таких сбраживателей, позволили идентифицировать представителей *Peptostreptococcus, Eubacterium, Bacteroides, Lactobacillus, Peptococcus, Clostridium, Streptococcus.* Гидролитические бактерии используют ряд экзоферментов, таких как протеазы, липазы, амилазы, целлюлазы и пектиназы. Эти ферменты часто видоспецифичны и могут отличаться от таковых у аэробных бактерий. Следовательно, процесс сбраживания представляет собой растворение природных субстратов, таких как белки, липиды, гомо- и гетерополисахариды (целлюлоза, пектин, крахмал и гемицеллюлоза). Анаэробная биодеградация лигнина не представляется возможной из-за необходимых для этого окислительных условий, хотя недавно сообщалось о биодеградации конифорилового спирта — основного компонента лигнина. Присутствие в качестве интермедиата фенилпропионовой кислоты также подтверждает версию о сбраживании лигнина по побочному метаболическому пути. Кроме природных субстратов, ана-

эробные популяции разрушают фенолы и серосодержащие соединения, находящиеся в стоках предприятий, осуществляющих такие процессы, как сульфатная варка, газификация угля и нефтехимических производств. Продукты брожения могут меняться в зависимости от вида и штамма бактерий, состава и количества питательных веществ и других параметров культивирования: pH, температуры и окислительно-восстановительного потенциала *(Eh).* Гомоацидогенные виды, например *Acetobacterium woodi,* образуют, как правило, видоспецифичные продукты, но описано также много видов гетероацидогенных бактерий, например *Lactobacillus brevis.*

Даже у гомоацидогенных видов бактерий могут происходить изменения в составе вырабатываемых продуктов. Например, *Clostridium formicoaceticum* образует только уксусную кислоту во время логарифмической фазы роста, но начинает синтезировать, кроме того, муравьиную кислоту в стационарной фазе при низких значениях pH. Другие виды в этих условиях синтезируют масляную кислоту.

Важным фактором при гетероацидогенном процессе является концентрация водородных ионов. На ход процесса влияет как pH, так и редокспотенциал *(Eh).* Из-за широкого спектра видов, входящих в группу гидролитических ацидогенных бактерий, и их изменчивости они относительно устойчивы к изменениям условий культивирования, часть их — ацидофильна. Отмечалось, что среднее время генерации составляет для них 2—3 ч, т. е. относительно невелико для анаэробных процессов. Однако на эту группу неблагоприятно влияют низкие значения pH и *Eh.* В случае резкого возрастания концентрации водорода микроорганизмы выбирают альтернативный метаболический путь для того, чтобы, используя более восстановленные соединения, удалять водород и, следовательно, управлять его концентрацией. Например, при нормальном образовании уксусной кислоты из глюкозы получается 4 моль газообразного водорода и 2 моль уксусной кислоты на 1 моль субстрата:

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O = 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$$

В случае резкого увеличения расхода или концентрации субстрата в сбраживателе микробная популяция немедленно на это реагирует, образуя избыточные количества H_2 и CH_3COOH, снижая уровень *Eh* и pH. Если бы этот процесс продолжался беспрепятственно, то сбраживатель бы «прокис» и перестал работать. Однако ацидогенные бактерии используют управляющие обратные связи и выбирают альтернативные метаболические пути, такие как образование пропионовой и масляной кислот, что помогает восстанавливать стабильность сбраживателя:

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2C_5H_5COOH + H_2O$$
$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_3H_7COOH + 2CO_2 + 2H_2$$

Эта роль водорода в управлении синтезом и потреблением промежуточных продуктов объясняет образование некоторых длинноцепочечных (с длиной цепи более 4 атомов водорода) жирных кислот, которые служат для накопления или расходования водорода. Эти процессы будут рассмотрены ниже, когда речь пойдет о II и III трофических группах.

Традиционно считалось, что процесс анаэробного сбраживания включает деятельность двух основных трофических групп — ацидогенных и метаногенных бактерий. Однако позднее стало ясно значение группы гетероацетогенных бактерий (группа II), осуществляющих симбиотическую ацетогенную дегидрогенизацию жирных кислот (с более длинной, чем у уксусной кислоты, цепью) — лимитирующую стадию при образовании метана. Некоторые исследователи выделяют гомоацетогенные бактерии, такие как *Acetobacterium woodi,* в отдельную четвертую трофическую группу, но в этой книге они включены в группу ацидогенных бактерий (группа I).

Описаны 2 новых вида гетероацетогенных грамотрицательных бактерий: *Syntrophobacterwolinii* и *Syntrophomonaswolfei*. В литературе сообщалось о популяции микроорганизмов этой группы, достигающей численности $4{,}2.10^6$ клеток на 1 мл сырого ила, и сейчас осуществляется дальнейшее изучение видов. Именно эти бактерии разлагают жирные кислоты (пропионовую и масляную), некоторые спирты и даже ароматические соединения (бензойную кислоту) в ряде случаев совместно с метаногенами.

Конверсия пропионовой и масляной кислот протекает следующим образом:

$$C_2H_5COOH + 2H_2O \longrightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$$
$$C_3H_7COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$$

Низкое парциальное давление водорода, необходимое для биоконверсии жирных кислот гетероацетогенными бактериями, объясняет, почему они успешно растут только при совместном культивировании с утилизирующими H_2 метаногенными организмами и почему симбиоз и межвидовой перенос H_2 усиливают рост представителей обеих трофических групп.

Потребление жирных кислот с длинной цепью в присутствии избытка H_2 бывает вызвано как гидравлической перегрузкой сбраживателя, так и его перегрузкой по органическому субстрату.

Группой, предварительно перерабатывающей эти кислоты в пригодный для метаногенных организмов субстрат, являются гетероацетогенные бактерии, образующие CH_3COOH и H_2, которые могут потребляться микроорганизмами III группы. Однако термодинамические расчеты показывают, что возрастание количества H_2 прекращает или даже обращает эти реакции. Следовательно, сбраживатель будет накапливать пропионовую, масляную и высшие жирные кислоты до концентрации нескольких тысяч миллиграммов на литр. Предупреждая остановки процесса от скачкообразных нагрузок или минимизируя их и поддерживая пригодные для культивирования условия, можно добиться того, что процесс постепенно возобновится так, что метаногенные организмы будут использовать H_2, а гетероацетогенные бактерии снова начнут потреблять высшие жирные кислоты. Следовательно, можно предполагать наличие корреляции между присутствием этих кислот и парциальным давлением H_2 в газовой смеси сбраживателя. С этой точки зрения ранним индикатором перегрузки, вызывающей неизбежную остановку работы сбраживателя, будет концентрация H_2 в биогазе.

Термодинамические ограничения, обсуждавшиеся выше, обусловливают тесный симбиоз между гетероацетогенными и метаногенными бактериями. Воздействие массопереноса может менять локальную концентрацию H_2 и влиять на кинетику процесса. Природа описанного синергизма еще полностью не объяснена, поскольку эти бактерии недостаточно таксономически и физиологически охарактеризованы. Различные типы биоэнергетики и уровень продуктивности могут быть видоспецифичны..

Третья (III) трофическая группа определяется на основе специфических субстратов, используемых для образования метана. К подгруппе Ш-А относятся хемолитотрофные организмы, они превращают H_2 и CO_2 в метан, используя газообразный H_2 как донор электронов:

$$CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

В результате этой реакции происходит превращение одной молекулы АДФ в АТФ, следовательно, реакция термодинамически выгодна.

Микроорганизмы второй подгруппы Ш-В перерабатывают уксусную и муравьиную кислоты, метанол и метиламины в метан. Уравнение конверсии CH_3COOH выглядит так:

$$CH_3COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

Эта реакция дает только 0,25 моль АТФ и поэтому термодинамически относительно невыгодна.

Приведенные выше реакции нуждаются в специальных метаболических путях и специфичных ферментных кофакторах, которые были идентифицированы для каждой группы. Это, в частности, кофактор F_{430}, тетрапиррольный комплекс никеля и кофермент F_{420} — флуоресцирующее соединение сине-зеленого цвета, которое может быть использовано как средство диагностики метаногенов. Вся эта группа в целом проявляет уникальное видовое разнообразие, вклю-

чая экологическую, физиологическую и морфологическую вариабельность. В нее входят микроорганизмы с клеточной стенкой разного типа, разнообразной морфологии (кокки, палочки, ланцетовидные), одноклеточные и нитчатые, подвижные и неподвижные, мезофильные и термофильные и т. д.

Клеточные стенки этих организмов содержат псевдомуреин вместо муреина, характерного для эубактерий. Псевдомуреин содержит L-талозаминуроновую кислоту вместо мурамовой. Некоторые из клеточных оболочек построены на основе полипептидов или гликопротеидов. Отличия также наблюдаются в составе липидной фракции и последовательности нуклеотидов в рибосомальной РНК. Поэтому считается, что метаногенные бактерии принадлежат к архебактериям, или археям *{Archaebacteria,* или *Archaea),* филогенетически древней группе, включающей также крайне галофильные и термоацидофильные микроорганизмы.

Численность популяции метаногенов в сбраживателе достигает 10^6—10^8 клеток на 1 мл сырого ила. Из него выделены представители *Methanobacterium, Methanospirillum, Methanococcus, Methanosarcina, Methanothrix.* Из них такие виды, как *Methanosarcina barkeri, Methanococcus mazei, Methanothrix soehngenii,* демонстрируют способность расти на уксусной кислоте в чистой культуре с временем удвоения 1—10 сут или более. Все известные метаногенные микроорганизмы, кроме *Methanothrix soehngenii,* способны к автотрофному потреблению H_2 и CO_2.

Установлено, что приблизительно 70—75% метана при анаэробной ферментации образуется из CH_3COOH, следовательно, примерно 25—30% синтезируется автотрофно при потреблении С,-соединений. Это происходит вопреки термодинамической выгодности хемолитотрофного метаболизма и показывает, что концентрация водорода должна быть ограничена.

Метаногены — наиболее капризная с точки зрения культивирования группа среди микроорганизмов, участвующих в анаэробном сбраживании. Для роста они требуют широкого спектра питательных веществ, включая С, Р, N, S, Са, *Mg,* К, Na, органические субстраты, такие как аминокислоты, витамины и микроэлементы. Очевидно, что H_2 и CO_2 также являются необходимыми питательными веществами для роста хемолитоавтотрофов.

Большинство мезофильных метаногенов не будет расти при значениях pH ниже 5,5. Метаболизм H_2, CH_3COOH и C_1-соединений у них зависит от pH. Низкие значения pH в большей степени благоприятствуют восстановлению протона до водорода, нежели его восстановлению в CH_4, и поэтому при таких условиях образование CH_4 обычно приостанавливается. Кроме того, эмпирическим путем было показано наличие верхнего предела pH, равного 8.

Реакторы, применяемые для анаэробной очистки сточных вод. Септиктенк представляет собой реактор без мешалки, который часто работает при температуре ниже 25 °С без какого-либо перемешивания. Объем тенка распределяется между двумя камерами, первая из которых занимает 2/3 объема и имеет наклонное днище для удержания ила. Ил периодически удаляется, обычно раз в год. Некоторое количество ила оставляют в тенке для поддержания в нем анаэробной активности. Среднее время пребывания клеток микроорганизмов определяется по частоте обезыливания. Таким образом, принимая во внимание, что тенк освобождается от ила раз в год и примерно одна шестая часть ила оставляется для поддержания работы тенка, можно считать, что биомасса остается в системе в течение примерно 50 суток. Если такого времени пребывания достаточно для поддержания метаногенной активности при высоких температурах (35 °С), то при температуре окружающей среды и в отсутствие перемешивания метаногенез протекает слабо.

Септиктенки широко используются в городских очистных станциях и перерабатывают осадки, удаляемые из первичных отстойников, пену и активный ил из вторичных отстойников. Использование анаэробных реакторов для очистки коммунальных стоков основано на небольших септиктенках, в которых в качестве источника топлива часто применяется газ. Навозные стоки — результат интенсивного животноводства — имеют характеристики, близкие к характеристикам ила, образующегося при очистке коммунальных сточных вод с высоким содержанием нерастворимых твердых частиц и компонентов, не поддающихся биодеградации. Для очистки этих сточных вод используются сбраживатели, спроектированные так же, как септиктенки для коммунальных стоков.

В настоящее время созданы сбраживатели с флокулированной биомассой, т. е. реакторы, в которых биомасса микроорганизмов могла бы удерживаться и можно было бы избежать вымывания медленно растущих микроорганизмов. Кроме того, имеются реакторы с неподвижной биопленкой, когда биомасса удерживается в прикрепленном к инертному носителю виде и, следовательно, время его пребывания в реакторе больше времени пребывания жидкости. Применяются и другие реакторы для анаэробной очистки сточных вод (реакторы со стационарным нисходящим потоком, реакторы с расширяющимся и псевдосжиженным слоем и др.). В заключение следует отметить, что анаэробные процессы очистки сточных вод не получили еще широкого применения несмотря на ряд очевидных преимуществ перед аэробными биологическими и химическими процессами. Главное их преимущество заключается в высокой степени превращения углерода органических веществ, содержащихся во входном потоке, в метан и CO_2. Это

уменьшение количества углерода сопровождается уменьшением энергии, которую бактериальная популяция тратит на образование биомассы, и, следовательно, количество удаляемого избыточного ила меньше, чем в аэробном процессе биоочистки. Кроме того, попутно образуется биогаз, представляющий собой весьма ценное топливо.

Хотя анаэробные реакторы, такие как септиктенки и сбраживатели для коммунальных стоков, широко использовались на протяжении многих лет, чаще всего применяется аэробная очистка сточных вод. Интерес к анаэробной очистке возрос из-за более строгих требований к предварительной очистке промышленных сточных вод перед их сбросом в канализацию, необходимости снижения энергетических затрат на очистку, особенно на очистку сильно загрязненных стоков, и непригодности альтернативных способов очистки для некоторых типов сточных вод.

Последние работы, обеспечивающие лучшее понимание биохимии и микробиологии анаэробных процессов, создали основу эксплуатации и управления реакторами, а инженерные усовершенствования распределительных систем и устройств для контроля и управления обеспечили повышение их надежности.

21.3. Микробиология твердых отходов

Переработка отходов на свалках. Независимо от метода переработки отходов твердые остатки традиционно ликвидируются с помощью свалок. В настоящее время свалки расположены во множестве мест и, несмотря на возрастающий объем отходов на душу населения, это положение сохраняется. Основная сложность связана с увеличением расстояния от свалки до источника отходов, что приводит к возрастанию неуправляемого попадания отходов в окружающую среду из-за их потерь при транспортировке.

По мере исчерпания невозобновляемых ресурсов больший упор делается на исследования в области повторного использования отходов. Однако ясно, что даже при современных технологиях простая ликвидация отходов на свалках как минимум на 65% дешевле любого другого способа их переработки, и в силу этого данный способ ликвидации отходов в настоящее время наиболее распространен. Более того, после того как стало ясно что из отходов образуется в больших количествах ценный источник энергии — CH_4, основные усилия были направлены на извлечение этого газа и на соответствующее преобразование свалок.

Какой бы тип очистки ни рассматривался, будь то окончательная ликвидация отходов или анаэробные фильтры, или сбраживатели для получения CH_4, полное управление биореактором не будет достигнуто без более глубокого понимания основ микробиологии и биохимии процесса разложения отходов. К сожалению, количество фундаментальных исследований в этой области чрезвычайно мало.

Состав твердых отходов и стратегия их размещения. Состав твердых отходов варьирует в зависимости от страны, типа хозяйства, а также времени года. Однако, несмотря на то что в развитых странах состав твердых отходов становится все более однотипным, существенные различия встречаются даже на относительно небольших расстояниях.

Исследования химического состава отходов показали, что фракция, подвергающаяся биодеградации, увеличиваясь с течением времени, к настоящему моменту достигла 70% от общего количества твердых отходов. Современные тенденции использования пластмасс и бумаги в пищевой промышленности таковы, что состав их будет все в большей степени подвергаться изменениям. С точки зрения элементарного состава это приведет к тому, что из-за лимитирования по азоту и/или фосфору удлинится время стабилизации отходов на свалках.

Локализация отходов. Первоочередной заботой при выборе места для свалки должна быть защита поверхности земли и грунтовых вод. Одним из способов достижения этой цели является *ограждение отходов герметичной оболочкой*. Для этого используются: глина, мелкозернистая почва, смесь земли с цементом, бетон, асфальт и полимерные пленки. Исследование процесса переноса вымываемых веществ через слой глины трех разных сортов (каолинит, монтмориллонит и иллит) показало, что наиболее важные для подвижности ионов металлов факторы — значение pH, ионный состав и ионнообменная емкость глины. Однако проверку подвижности надо все же проводить в реальных условиях. Например, пропускающая способность облицовки из глины может быть в 10—1000 раз выше, чем значения, полученные в лаборатории для неразрушенных и уплотненных образцов. Кроме того, было обнаружено, что слой глины толщиной в несколько десятков сантиметров не может в течение длительного времени препятствовать распространению отходов. Таким образом, без специальной их обработки этот метод захоронения отходов может нанести больший вред здоровью людей, чем захоронение радиоактивных отходов эквивалентной токсичности.

Альтернативным локализации отходов способом защиты водоносных горизонтов является *демпфирование* за счет медленного просачивания загрязненной воды, например через слой песка.

Стратегия размещения твердых отходов значительно различается в разных странах. В Великобритании наиболее распространен-

ным способом является помещение отходов в конце рабочего дня в специальный отсек. Аналогия между захоронением отходов в отсеках и использованием обычных ферментеров не очевидна.

Поведение отходов на свалке носит гораздо более сложный характер, так как все время происходит наслаивание нового материала через неравные промежутки времени. Следовательно, этот процесс подвержен действию градиентов температуры, концентрации газа, жидкости, *Eh,* pH, ферментной активности и потоков жидкости. Более сложные факторы — это молекулярные свойства отходов: водорастворимость, коэффициент распределения липиды/вода, летучесть, размеры молекул и их заряд, диффузия через границу раздела окисленной и восстановленной фаз, конформация и функциональные группы, способность сорбироваться микроорганизмами, а также межвидовое взаимодействие различных микроорганизмов; перекрывание экологических ниш и ареалов различных видов микроорганизмов.

Характерной чертой свалок является наличие сложной, взаимозависимой системы микроорганизмов, которые существуют как ассоциации клеток различных видов, прикрепленные к поверхности твердых частиц, являющихся источником питательных веществ. Эти ассоциации сильно зависят от концентрационных градиентов, в особенности от градиентов концентраций доноров и акцепторов электронов и водорода.

Биодеградация твердых отходов микроорганизмами. Твердые отходы перед транспортировкой на свалку могут быть подвергнуты обработке, т. е. измельчению, перемалыванию и дроблению. Такая предварительная обработка может сильно влиять на катаболические процессы в твердых отходах. На типичной свалке, где отходы размещаются по отсекам, вся система в целом работает как группа реакторов периодического действия, в которых отходы находятся на разных стадиях биодеградации и подвергаются случайным воздействиям, например попаданию воды, содержащей растворенный O_2 или различные ксенобиотики. В этом случае можно применить простую модель периодических культивирований, действующих в той последовательности, в какой происходит загрузка. Для более традиционного типа свалки (постепенная загрузка без ежедневного закрывания ячеек) можно использовать модель периодического культивирования с повторным внесением посевного материала микроорганизмов и беспозвоночных.

В начальной стадии катаболизма твердых отходов, сопровождаемого физическими и химическими процессами, преобладают аэробные процессы, в ходе которых наиболее лабильные молекулы быстро разрушаются рядом беспозвоночных (клещи, нематоды и др.) и микроорганизмов (грибы, бактерии, актиномицеты). Утилизация этих субстратов затем сменяется последующим катаболизмом макромолекул, таких как лигноцеллюлозы, лигнины, таннины и меланины, которые подвергаются лишь медленной биодеградации, приводящей к тому, что кислород перестает быть лимитирующим субстратом. Продолжительность этого периода сильно варьирует и частично зависит от предобработки, которая может менять степень доступности O_2. Наиболее удачный метод оценки степени биодеградации основан на различиях в скорости разложения целлюлозы и лигнина. Отношение содержания целлюлозы к лигнину составляет 4,0; 0,9—1,2 и 0,2 соответственно для непереработанных твердых отходов, активно перерабатываемых или частично стабилизированных отходов на свалке и полностью стабилизированных отходов, так как лигнин постепенно все хуже поддается переработке. Ксенобиотики подвергаются разложению аналогичным образом, их биодеградация более вероятна в аэробных условиях и включает такие процессы, как: функционирование конститутивных или индуцибельных ферментов; кометаболизм; перенос плазмид; мутагенез и другие процессы, связанные с переносом генетической информации.

В органической фракции может быть достигнуто соотношение C : N > 55 : 1. Возможно, достижение этой величины лимитирует процесс аэробного разложения.

В течение этой стадии рост температуры до 80 °C и присутствие антимикробных соединений абиотического происхождения приводят к гибели или инактивации таких патогенов, как *Salmonella sp.* и вирусов, личинок насекомых и семян растений. Температура используется как индикатор работы свалки. Хотя возрастание ее оказывает положительное влияние, увеличивая активность и скорость роста микроорганизмов, она отрицательно влияет на растворимость O_2, который является лимитирующим фактором. CO_2, в свою очередь, может влиять на скорость метаболизма, снижая pH, хотя это снижение ускоряет гидролиз полимеров. И наконец, значительное образование воды в ходе микробного метаболизма существенно изменяет ее баланс в системе.

Исчерпание молекулярного O_2 in situ приводит к замедлению тепловыделения, поступление O_2 за счет конвекции также существенно снижается. Одновременно накопление CO_2 в течение стадии компостирования создает микроаэрофильные условия, которые приводят к увеличению числа сначала факультативных, а затем и облигатных анаэробов.

В отличие от аэробного метаболизма, при котором минерализация отходов часто достигается с помощью одного вида бактерий, анаэробная биодеградация требует совместного метаболизма микроорганизмов разных видов, входящих в состав смешанной популяции.

Эта популяция взаимодействующих друг с другом микроорганизмов способна использовать различные неорганические акцепторы электронов, часть — в последовательности, соответствующей выделению энергии при этой реакции. Поскольку большинство бактерий нуждается в определенных акцепторах электронов, эта последовательность приводит к существенным изменениям в составе микробной популяции.

Виды, способные использовать более окисленные акцепторы, получают термодинамические и, следовательно, кинетические преимущества.

Во время гидролиза и ферментации бактерии, не нуждающиеся во внешнем акцепторе электронов и потому не зависящие от концентрационных градиентов этих акцепторов, гидролизуют полимеры, такие как полисахариды, липиды, белки и нуклеиновые кислоты, и сбраживают образовавшиеся мономеры до водорода и CO_2, линейных и разветвленных жирных кислот этанола, молочной и янтарной кислот. Распределение отдельных продуктов может значительно варьировать и зависит от *Eh,* скорости роста микроорганизмов, строения субстратов и концентрации H_2.

Была обнаружена весьма тесная связь между сбраживающими мономеры бактериями и теми бактериями, которые катаболизируют продукты их жизнедеятельности, так как реакции сбраживания термодинамически возможны обычно только при очень низких концентрациях H_2. Даже в отсутствие ингибирования концентрация H_2 часто влияет на реакцию. Например, при низких концентрациях H_2 равновесие сдвигается в сторону более окисленных продуктов (в основном CH_3COOH) и больше энергии запасается в виде АТФ; этот эффект также имеет место при поддержании низких концентраций лактата. Как сульфатвосстанавливающие бактерии, так и метаногенные организмы, восстанавливая конечный продукт, обеспечивают этим в то же время поступление необходимых факторов роста.

В процессе образования ацетата участвуют два типа ацетогенных бактерий: водородобразующие ацетогенные бактерии, которые получают энергию для роста при совместной конверсии спиртов и органических кислот в CH_3COOH и H_2 (и иногда CO_2), и гомоацетогенные бактерии, которые катаболизируют углеводы, водород и CO_2 в CH_3COOH. Основное различие между этими двумя типами ацетогенных бактерий состоит в том, что водородобразующие бактерии должны расти в совместной культуре с бактериями, облигатно снижающими концентрацию H_2, такими как нитрат- и сульфатвосстанавливающие или метаногенные бактерии, для поддержания низкого парциального давления H_2. В противном случае происходит накопление жирных кислот, являющихся ингибиторами. При метаногенезе возможны два типа лимитирования роста метаногенов, по-

требляющих CO_2. В о-п е р в ы х, на свалках часто высока концентрация акцепторов электронов — нитратов и сульфатов. В о-в т о р ы х, гомоацетогенные бактерии также могут потреблять CO_2, восстанавливая его до CH_3COOH и конкурируя таким образом с метаногенными бактериями за водород.

В настоящее время известны восемь различных субстратов метаногенных организмов, четыре из них были обнаружены на свалках: смесь CO_2 и H_2; CH_3COOH; CH_3OH; триэтиламин.

Соединения, используемые как доноры и акцепторы электронов, в поступающем сырье оказываются в месте взаимодействия микроорганизмов, относящихся к группам с различным типом метаболизма. Ситуация усложняется еще и тем, что, за исключением CO_2, эти вещества используются последовательно, и эта последовательность может ограничивать протекание различных реакций и взаимодействий.

Например, снижение высоких концентраций сульфата сульфатвосстанавливающими бактериями и превращение его в H_2S подавляет активность метаногенов, так как восстановление сульфата энергетически более выгодно, чем образование CH_4 из H_2, CO_2 и CH_3COOH. Наоборот, в отсутствие сульфата сульфатвосстанавливающие бактерии могут вести себя как синтрофные ацетогены, используя такие интермедиа™, как молочная кислота и этанол, и переходить с восстановления сульфата на образование H_2 за счет восстановления протона.

Вещества, образующиеся на свалках. Для свалок характерно образование из разлагающихся твердых отходов продуктов двух типов: это фильтрующиеся в почву **воды** и **газы.** Данным водам предшествует вода, которая просачивается сквозь слой отходов, унося с собой растворимые и суспендированные вещества.

Состав вод формируется под влиянием взаимодействующих друг о другом сложных первичных и вторичных факторов. К п е р в и ч н ы м относятся: геология, гидрология и гидрометеорология; место свалки; состав отходов (включая концентрацию доноров и акцепторов электронов); состав микробного посевного материала; влажность отходов; стратегия размещения твердых отходов; проницаемость земляного покрытия; топография местности и растительный покров; время года и длительность использования свалки.

Эти факторы, в свою очередь, определяют изменения таких в т о р и ч н ы х факторов, как *Eh,* pH и температура вместе с физико-химическими процессами, включающими подкисление, испарение, осаждение, растворение, сорбцию и ионный обмен. Когда просачивание H_2O сквозь твердые отходы из-за осаждения и попадания грунтовых, поверхностных и образуемых микроорганизмами вод превосходит абсорбционную способность отходов, образуются

фильтрующиеся в почву воды. Однако некоторое количество таких вод из-за неоднородностей и каналов в отходах или из-за интенсивного кратковременного дождя образуется прежде, чем достигается предел *абсорбционной емкости* (55% от массы абсорбента). Абсорбционная емкость отходов варьирует в зависимости от их предобработки, степени уплотнения и состава. Измельчение, например, способно ее утроить (емкость в 125 л/м^3). Большое значение имеет также содержание бумаги в твердых отходах, так как количество воды, которую бумага может абсорбировать, достигает более 250% от ее собственной массы.

Фильтрующиеся в почву воды содержат растворимые соединения, органические и неорганические, а также микроорганизмы — вирусы и бактерии. Вещества, обнаруживаемые в водах, образующиеся на свалках бытовых твердых отходов, перечислены ниже. Этот список мог бы быть гораздо больше, если бы в него вошли данные о веществах, обнаруживаемых на свалках для промышленных отходов.

Идентифицированные **компоненты фильтрующихся в почву вод,** образовавшихся на свалках твердых отходов:

- *элементы:* Al, B, Fe, Cd, Ca, K, Co, Mg, Мп, Cu, Mo, Na, Ni, Pb, Sr, Cr, Zn и др.;
- *неорганические ионы:* аммоний, нитрат, нитрит, сульфат, сульфит, фосфат, фторид, хлорид, цианид;
- *алифатические соединения:* ацетон, бутанол, гексан, валериановая кислота, дисульфиды, дихлорметан, дихлорэтан, изомасляная кислота, изопропиловый спирт, кетоны, масляная кислота, метанол, пропионовая кислота, уксусная кислота, хлороформ, эфиры масляной, уксусной и капроновой кислот;
- *ароматические соединения:* бензойная кислота, бензол, гуминовая кислота, индол, крезолы, ксилолы, лигнин, таннин, толуол, фенолы, производные бензойной и фталевой кислот, алкилбензолы, ароматические кетоны, диметилфталат и др.;
- *ациклические соединения:* циклогексан, циклогексановая кислота, циклогексанол, циклогексанон;
- *терпены:* камфора, сесквитерпен, терпинеол, фехнон, туйон.

До сих пор не существует способа предсказания состава и концентрации фильтрующихся вод.

На ранних стадиях функционирования типичной свалки процесс аэробного катаболизма приводит к накоплению больших концентраций жирных кислот, снижению pH и растворению металлов, которые затем образуют комплексы со свободными кислотами. При

переходе к микроаэробным условиям редокс-потенциал уменьшается, pH увеличивается и металлы начинают выпадать в осадок в виде сульфатов и карбонатов, что уменьшает их концентрацию в фильтрующихся водах. Картина еще более усложняется, если учесть, что при низких значениях *Eh* тяжелые металлы образуют комплексы с ионами аммония и гуминовыми кислотами.

Состав фильтрующихся в почву вод, образующихся на свалках, меняется под действием как краткосрочных (сезонные колебания), так и долгосрочных факторов (процесс катаболизма отходов), с преобладанием значения последних. Как было отмечено выше, начальная стадия биодеградации отходов на свалке является ацидогенной. Фильтрующиеся воды на этой стадии характеризуются высокими значениями БПК и ХПК и низкой концентрацией высокомолекулярных веществ: гуминовых и фульвиновых кислот, тяжелых металлов и сульфата. Переход к стадии метаногенеза оказывает сильное воздействие на состав фильтрующихся в почву вод и сопровождается уменьшением БПК, ХПК и ростом концентрации гуминовых и фульвиновых кислот.

Определение загрязнений в почвенных водах можно проводить с использованием химических и/или биологических меток. Типичной химической меткой является увеличение концентрации аммония, хлорида, железа, марганца, магния, калия, натрия и органического углерода в грунтовых водах; присутствие нитчатых бактерий — биологическая метка — также прзнак загрязнения грунтовых вод водами со свалки.

Способы борьбы с фильтрацией вод в почву. Лучший способ — применение малопроницаемой засыпки для уменьшения просачивания вод. Однако это снижает скорость биодеградации твердых отходов. В качестве альтернативы можно либо использовать ограждение, обладающее меньшей проницаемостью, чем окружающая почва, либо надеяться на уменьшение вредного воздействия за счет естественных микробиологических и физико-химических процессов в почве, окружающей место свалки. Действие тяжелых металлов значительно ослабляется за счет ограничения их подвижности (за исключением никеля и свинца). Она уменьшается под действием карбоновых кислот и увеличивается за счет образования растворимых гидрокарбонатов и сульфатов. Кислотно-основные реакции такого типа увеличивают значение pH жидкости, находящейся в почве, способствуют осаждению твердых металлов и увеличению ее катионообменной способности.

Было показано, что перенос таких веществ, как масляная кислота, фенол, n-хлорфенол и диметилфталат через насыщенную зону, окружающую место свалки, происходит приблизительно одинаково,

хотя конечные концентрации разных веществ различаются, поскольку различны скорости их биодеградации. Так, например, масляная кислота и фенол разрушаются с довольно высокой скоростью. Реакции такого типа изучают для создания оптимальных условий переработки отходов под землей in situ с помощью радиоактивных меток.

Однако даже после того как процесс биодеградации завершится, вероятность загрязнения источников водоснабжения конечными продуктами метаболизма остается.

Если природные механизмы ослабления действия загрязнений не способны противостоять загрязнению водами, фильтрующимися в почву со свалки, необходимы сбор и очистка этих вод. Очистка вод на самой свалке или на специальных сооружениях должна быть приемлема с точки зрения охраны окружающей среды и экономически доступна.

Возможно, наиболее удачный метод очистки фильтрующихся со свалки вод — управляемая анаэробная переработка, которая ускоряет стабилизацию свалки. Альтернативой этому методу является рециркуляция фильтрующихся вод сквозь массу твердых отходов с помощью поверхностного орошения, введением их в глубь массы отходов. В этом случае свалка используется как анаэробный биофильтр, работающий в режиме идеального вытеснения с обратной связью. При использовании этого метода скоростью добавления воды следует управлять так, чтобы оптимизировать процесс биологической очистки с точки зрения времени пребывания, глубины слоя отходов и поддержания температуры в их массе. Рециркуляция воды с помощью распыления также ускоряет испарение, улетучивание низкомолекулярных органических соединений и окисление с последующим осаждением железа, хотя в целом общий объем воды, доступной для рециркуляции, будет, конечно, со временем увеличиваться.

Общее воздействие рециркуляции фильтрующихся в почву вод заключается в увеличении влажности и перемещении этих вод сквозь толщу отходов, что ускоряет процесс биодеградации, в особенности, если регулирование pH и подача дополнительных питательных веществ сопровождаются дополнительным засевом отходов микроорганизмами. Кроме того, может происходить осаждение сульфидов тяжелых металлов. Однако концентрации аммония, хлорида и ХПК могут оставаться по-прежнему высокими, что влечет за собой необходимость дальнейшей обработки отходов перед их окончательной ликвидацией. При этом возникают также трудности в достижении высоких скоростей потока жидкости сквозь массу отходов, возможность образования уплотненного слоя почвы и усложняется организация горизонтального перемещения жидкости в окружающую почву или грунтовые воды.

Для ликвидации отходов широко используется почва, поэтому очень важен выбор типа почвы с подходящей проницаемостью, размерами частиц и стабильностью; необходимо также поддерживать фильтрующие характеристики почвы с помощью соответствующего режима подачи отходов, так как любые антиокислительные условия в почве будут снижать скорость биодеградации. Первоначальные градиенты концентраций доноров и акцепторов электронов, кислорода и температуры приводят к расслоению микробной популяции, прежде всего к сорбции микроорганизмов, потребляющих органический углерод. После того как произошла сорбция, начинается процесс микробного катаболизма.

Процесс захоронения отходов в почве дешев, но может возникнуть ряд сложностей, особенно зимой, из-за больших объемов фильтрующихся в почву вод, малого испарения и низкой микробной активности.

Так, хотя распыление образующихся на свалке вод на песчаных почвах, служащих источником кормовых трав, не оказывало на эти травы никакого вредного влияния, в них накапливались оксиды Ca, Mg и P (V). Фильтрующиеся в почву воды свалок, обладая фитотоксичным действием, одновременно содержат необходимые для растений питательные вещества.

Аэробная обработка отходов может происходить как при прямой инфильтрации воды, так и при ее рециркуляции. Для переработки отходов используются окислительные рвы, глинистые склоны и другие более сложные приспособления. Основным методом очистки остается применение аэрационных прудов, в которых достигается уменьшение ВПК на 70% после нескольких месяцев пребывания. Сложности при работе этих прудов возникают из-за токсичных металлов и высокомолекулярных соединений, в особенности гуминовых и фульвиновых кислот.

Снижение стоимости процесса очистки возможно за счет использования водных растений, которые могут насыщать фильтрующиеся в почву воды кислородом и тем самым ускорять процесс аэробного бактериального окисления.

Капельные биофильтры и системы с активным илом также используются для очистки вод, образующихся на свалках, иногда в смеси со сточными водами. При проведении этих процессов часто возникает необходимость в добавлении питательных веществ, кроме того, добавление, например, фосфата способствует осаждению тяжелых металлов в составе фосфорорганических соединений. Такая очистка приводит к удалению 99% БПК и 95% ХПК одновременно со значительным снижением концентрации ионов NH_4 (благодаря сочетанию процессов бактериальной нитрификации и клеточной ассимиляции), Fe (98%), *Mn* (92%), Zn (94%), однако

наиболее устойчивые органические молекулы нуждаются в дальнейшей деградации. Главным лимитирующим фактором процесса может быть температура, так как из-за сезонных дождей самые низкие температуры в году совпадают с образованием самых больших объемов фильтрующихся в почву вод. Часто встречающаяся низкая концентрация фосфатов может усиливать процесс вспучивания ила. Наконец, серьезные трудности вызывает накопление металлов в бактериальных флокулах.

Анаэробная очистка в прудах позволяет удалить 80—90% ХПК в течение 40—50 дней при температуре 25 °С (но около 50% при 10 °С). Однако куда более многообещающим представляется использование сбраживателей, так как их производительность немногим меньше, чем у аэрационных прудов, а монтаж и эксплуатация в 2 раза дешевле. Так как с помощью физико-химических процессов невозможно удалить столько органических веществ, сколько удаляется в результате биологических процессов, то их используют в основном для обработки стабилизированных биологической очисткой фильтрующихся вод. Ни один из испытанных физико-химических способов очистки (химическая коагуляция и осаждение; адсорбция активных углей; обратный осмос; адсорбция на полимерах; химическое окисление, включая озонолиз; выпаривание и облучение) не оказался полностью эффективным.

Оптимизация получения и использования биогаза, образующегося на свалке. Биогаз, образующийся на свалке, с одной стороны, может быть нежелательным продуктом, а с другой — служить источником энергии. Выбросы этого газа, которые могут быть обнаружены термографическим методом, приводят к появлению дурного запаха, закислению грунтовых вод, снижению урожая сельскохозяйственных культур (вплоть до полной их гибели). Следовательно, утечки этого газа должны быть ограничены. Для того чтобы эти ограничения выполнялись, необходимы приспособления, позволяющие управлять перемещением газа, например различные преграды и траншеи, наполненные на небольшую глубину гравием, и системы экстракции газа или его инжектирования, размещенные на большой глубине (более 6 м). Могут быть изготовлены оболочки, препятствующие утечке газа из природных материалов и из искусственных пленок. Если удастся проконтролировать перемещение газовых потоков, то проблема решается сжиганием или пропусканием газа через почву. Ловушки из мелкопористой почвы снижают количество плохо пахнущих веществ, которые окисляются в ней аэробной микрофлорой.

Идентифицированные минорные компоненты газа, образующегося на свалке, следующие: ацетон, бензол, бутанол, гексан, гептан, диметилсульфид, бутан, изобутан, изопропиловый спирт, ксилол, метан, углеводороды C_4—C_{14}; этан и этанол, этилен и этилмеркаптан.

За прошедшие годы наиболее важным изменением в составе газа, образующегося на свалках, было увеличение в нем концентрации **метана.** Извлечение этого газа осуществляется или планируется в Бразилии, Канаде, Швейцарии, Японии, Англии. Использование газа, образующегося на свалках, имеет огромные перспективы, так как подобным способом его можно получать в больших количествах.

Однако в настоящее время газ метан не находит сбыта и представляет собой лишь отход, создавая неудобства в эксплуатации свалок. По расчетам, в период наиболее активного метаногенеза достоверное значение выхода метана колеблется от 3,1 до 371 л/кг почвы в год.

Метаногенные микроорганизмы в основном чувствительны к влиянию взаимодействующих факторов окружающей среды как прямых, так и косвенных, которые, в свою очередь, управляются основными факторами, связанными с местоположением свалки.

Состав твердых отходов является определяющим как для состава выделяющегося газа, так и для скорости его образования. Предобработка может приводить к его значительным изменениям. Уменьшение размера частиц от 250 до 10 мм увеличивает скорость образования газа в 4 раза, возможно, из-за увеличения площади поверхности или благодаря лучшему поступлению O_2, так как при этом наблюдается сдвиг в ферментационном равновесии по CO_2. Увеличение содержания воды от 10 до 65% приводит к более заметным изменениям в отходах с низкой плотностью (0,25 т/м^3) по сравнению с отходами с более высокой плотностью (0,80 т/м^3) из-за возрастания подвижности бактериальных клеток, что, в свою очередь, ускоряет процесс гидролиза и затем метаногенеза. Напротив, при постоянной влажности (21%) увеличение плотности от 0,32 до 0,47 т/м^3 приводит к возрастанию скорости газообразования от 410 до 845 мл/сут на 1 кг сухих твердых отходов.

Изменения в скорости метаногенеза также появляются при перемещении воды сквозь толщу твердых отходов. Было показано увеличение скорости метаногенеза на свалке на 25—30% при движении воды; движение воды и ее содержание — два независимо действующих на метаногенез фактора. Дальнейшее увеличение скорости происходило, когда воду заменяли фильтрующимися в почву водами, что обусловлено наличием в них питательных веществ, веществ—предшественников метаногенеза и изменением pH. Кроме того, установлено, что повышение температуры от 22 до 33 °С сопровождалось увеличением выхода газа на 70%: оптимальной для метаногенеза температурой является 41 °С, и выход метана остается без изменения в температурном интервале 48—55 °С. Температура свалки меняется под действием микробного метаболизма (который,

в свою очередь, определяется плотностью отходов, их удельной поверхностью, влажностью, исходной температурой, составом, доступностью акцепторов электронов, в особенности O_2), теплоты нейтрализации и солнечного тепла, которые находятся в равновесии с теплопотерями в атмосферу, в окружающую почву и воду. Однако быстрый разогрев часто связан с аэробным метаболизмом, в то время как анаэробиоз часто сопровождается снижением температуры.

Было обнаружено, что наивысший выход газа из отходов наблюдался при их подщелачивании 16 г $CaCO_3$ сухого вещества/кг. Это объясняется тем, что при низкой щелочности жирные кислоты поглощают избыток метана. На работающей свалке для начала метаногенеза соотношение концентраций CH_3COOH и щелочи должно составлять менее 0,8. Такая буферная емкость в твердых отходах может быть достигнута добавлением известняка.

Газ, образующийся на свалке, извлекается с помощью вертикальных или горизонтальных перфорированных труб из полиэтилена. Насосы или газодувки способны увеличить степень извлечения газа. После удаления конденсата и пыли этот биогаз может использоваться как низкосортное топливо для обжига кирпича; получения пара и обогрева теплиц; получения электроэнергии; получения этанола; применения вместо углеводородного топлива или угля.

Список литературы

Основная

1. *Бабьева И. П., Зенова Г. М.* Биология почв. М., 1989.
2. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. М., 2002.
3. *Громов Б. В.* Строение бактерий. Л., 1985.
4. *Громов Б. В., Павленко Г. В.* Экология бактерий. Л., 1985.
5. *Добровольская Т. Г.* Структура бактериальных сообществ почв. М., 2002.
6. *Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н.* Введение в природоведческую микробиологию. М., 2001.
7. *Звягинцев Д. Г.* Почва и микроорганизмы. М., 1987.
8. *Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М.* Экология актиномицетов. М., 2001.
9. *Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н., Тихонович И. А., Ходжапова Л. Г., Шишкова С. О.* Генетика развития растений. Спб., 2000.
10. Микроорганизмы и охрана почв / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М., 1989.
11. *Мюллер Э., Леффлер В.* Микология. М., 1995.
12. Определитель бактерий Берджи. М., 1997. Т. 1,2.
13. *Поздеев О. К.* Медицинская микробиология. М., 2001.
14. *Шлегель Г.* Общая микробиология. М., 1987.
15. *Шлегель Г.* История микробиологии. М., 2002.

Дополнительная

1. *Артамонов В. И.* Биотехнология агропромышленному комплексу. М., 1989.
2. *Бекер В. Е., Лиениньш Г. К., Райнулис Е. П.* Биотехнология. М., 1990.
3. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / Под ред. Б. В. Симарова. Л., 1990.
4. *Заварзин Г. А.* Лекции по природоведческой микробиологии. М., 2003.
5. *Кондратьева Е. Н.* Автотрофные прокариоты. М., 1996.

6. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред! Д. Г. Звягинцева. М., 1991.
7. Промышленная микробиология / Под ред. Н. С. Егорова. М., 1989.
8. *Смирнов В. В., Каприанова Е. А.* Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев, 1990.
9. *Чурикова В. В., Викторов Д. И.* Основы микробиологии и вирусологии. Воронеж, 1989.
10. Экологическая биотехнология / Под ред. К. Ф. Фостера и Д. А. Вейза. Л., 1990.
11. Экология микроорганизмов / Под ред. А. Н. Нетрусова. М., 2004.
12. *Bergey's* manual of systematic bacteriology: 2nd edition. Vol. 1. Ed. D. R. Boone, R. W. Costenholz: Springer-Verlag N. Y. Berling, Meidelberg, 2001.

Приложение

Структура «Руководства Берджи по систематике бактерий»[1]

Таксономическое положение	Характерные представители (роды)
Том 1. ***The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria***	
ДОМЕН ARCHAEA	
Филум Crenarchaeota	*Thermoproteus, Pyrodictium, Sulfolobus*
Филум Euryarchaeota	
Класс 1. Methanobacteria	*Methanobacterium*
Класс 2. Methanococci	*Methanococcus*
Класс 3. Halobacteria	*Halobacterium, Halococcus*
Класс 4. Thermoplasmata	*Thermoplasma, Picrophilus*
Класс 5. Thermococci	*Thermococcus, Pyrococcus*
Класс 6. Archaeoglobi	*Archaeoglobus*
Класс 7. Methanopyri	*Methanopyrus*
ДОМЕН BACTERIA	
Филум Aquiflcae	*Aquifex, Hydrogenobacter*
Филум Thermotogae	*Thermotoga, Geotoga*
Филум Thermodesulfobacteria	*Thermodesulfobacterium*
Филум «Deinococcus-Thermus»	*Deinococcus, Thermus*
Филум Chrysiogenetes	*Chrysiogenes*
Филум Chloroflexi	*Chloroflexus, Herpetosiphon*
Филум Thermomicrobia	*Thermomicrobium*
Филум Nitrospirae	*Nitrospira*
Филум Deferribacteres	*Geovibrio*

[1] Дано в сокращении по: *Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A.* Microbiology. 5th-ed. McGrew-Hill, Inc. Boston, New York, San-Francisco.

Продолжение

Таксономическое положение	Характерные представители (роды)
Филум Cyanobacteria	*Prochloron, Synechococcus, Pleurocapsa, Oscillatoria, Anabaena, Nostoc, Stigonema*
Филум Chlorobi	*Chlorobium*
Том 2. *The Proteobacteria*	
Филум Proteobacteria	
Класс 1. Alphaproteobacteria	*Rhodospirillum, Rickettsia, Caulobacter, Rhizpbium, Brucella, Beijerinckia, Nitrobacter, Hyphomicmbium, Methylobacterium*
Класс 2. Betaproteobacteria	*Alcaligenes, Thiobacillus, Methylophilus, Neisseria, Nitrosomonas, Bulkholderia, Comamonas*
Класс 3. Gammaproteobacteria	*Chromatium, Leucothrix, Legionella, Pseudomonas, Azotobacter, Vibrio, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella, Yersinia, Haemophilus*
Класс 4. Deltaproteobacteria	*Desulfovibrio, Bdellovibrio, Myxococcus, Polyangium*
Класс 5. Epsilonproteobacteria	*Campylobacter, Helicobacter*
Том 3. *The Low G + C Gram--Positive Bacteria*	
Филум Firmicutes	
Класс 1. Clostridia	*Clostridium, Peptostreptococcus, Eubacterium, Desulfotomaculum, Heliobacterium, Veilonella*
Класс 2. Mollicutes	*Mycoplasma, Ureaplasma, Spiroplasma, Acholeplasma*
Класс 3. Bacilli	*Bacillus, Staphylococcus, Caryophanon, Paenibacillus, Thermoactinomyces, Lactobacillus, Enterococcus, Leuconostoc, Listeria, Streptococcus*
Том 4. *The High G + C Gram--Positive Bacteria*	
Филум Actinobacteria	*Actinomyces, Micrococcus, Arthrobacter, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Thermomonospora, Actinomadura, Streptomyces, Frankia, Bifidobacterium*

Окончание

Таксономическое положение	Характерные представители (роды)
Том 5. *The Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres, Bacteriodetes and Fusobacteria*	
Филум Planctomycetes	*Planctomyces, Gemmata*
Филум Chlamydia	*Chlamydia*
Филум Spirochaetes	*Spirochaeta, Borrelia, Treponema, Leptospira*
Филум Fibrobacteres	*Fibrobacter*
Филум Acidobacteria	*A cidobacterium*
Филум Bacteroidetes	*Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Flavobacterium, Sphingobacterium, Flexibacter, Cytophaga*
Филум Fusobacteria	*Fusobacterium*
Филум Verrucomicrobia	*Verrucomicrobium*
Филум Dictyoglomi	*Dictyoglomus*

Указатель латинских названий

Acetobacter 183, 194
— *peroxydans* 183
— *xylinum* 26, 184
Acetobacteriaceae 52
Acetobacterium 408
— *woodi* 409, 410
Acholeplasma 68
Acholeplasmataceae 67, 68
Achromatium 53, 236, 238
Actinomyces 65, 398
Actinomycetaceae 65
Actinomycetales 64, 65
Actinoplanaceae 65
Aedes 362
Aerobacter 384
Aerococcus 61
Aeromonas 52
Aeschynomene
— *indica* 222
— scarba 222
Agrobacterium 52, 349, 350, 384
— *radiobacter* 349, 350, 352
Alcaligenes 102, 319
Algae 70
Alnus 229
Altemaria 78, 190, 193, 262, 345, 350, 356, 384
— tenuis 190
Amceboaphelidium 281
Aomoeba 399
Anabaena 215, 268
— azollae 215, 348
— *cylindrica* 347
Anaerobacter polyendosporus 41
Anaplasmataceae 58
Ancalomicrobium 24
Anisoplia austriaca 359
Anoxyphotobacteria 49, 58
Anthoceros punctatus 215
Aphelidium 281
Aquaspirillum 49
Arachnia 65
Archaea 47
Archaebacteria 68
Archangiaceae 54, 185
Archangium 54, 185
Armillariella 190
Arthrobacter 62, 63, 160, 181, 182, 204, 260, 315, 316, 349, 350, 398
— *atrocyaneus*
— *siderocapsulatus* 245
— *mysorens* 352
Ascomycetes 77, 78, 79
Aspergillus 77, 97, 165, 183, 184, 189, 204, 236, 243, 250, 262, 265, 272, 338, 340, 350, 381, 384
— *fumigatus* 186, 200, 327
— *itaconicus* 184
— niger 184, 278, 381, 384
— oryzae 165, 381
— terreus 184, 384
Asticcacaulis 267
Aulosira 347
Aureobasidium 193, 263
— azolla 215, 348
— *caroliniana* 348
— *flliculoides* 348
— *imbricata* 348
— rubra 348
Azolla 215
Azomonas 51, 213
— *agilis 213,* 352
— *insignis* 213
— *macrocytogenes* 213
Azorhizobium caulinodans 222
Azospirillum 49, 216, 349, 350
— *amazonense* 216
— *brasilense* 216, 218, 348, 349
— *halopraeferans* 216
— *lipoferum* 216, 218, 348, 349, 352
Azotobacter 51, 99, 121, 211, 212, 214, 315, 328, 329, 345, 346
— agilis 212
— *beijerinckii* 211
— *chroococcum* 211, 345, 356
— *maerocytogenes* 212
— *paspali 2*11
— *vinelandii* 211, 212
Azotobacteriaceae 51, 160, 211, 213, 214, 348

Bacillaceae 62, 160, 186, 191, 195, 199
Bacillariophyta 72
Bacillus 25, 40, 41, 42, 46, 62, 83, 86, 91, 94, 106, 149, 182, 189, 191, 194, 195, 196, 200, 208, 217, 236238, 240, 243, 247, 261, 319, 349, 350, 360, 398
— *albus* 46
— *anthracis* 355, 357
— *azotofixans* 217
— cereus 39, 195, 196, 261, 381
— *idosus* 278
— *licheniformis* 208
— *macerans* 191, 217
— *megaterium* 27, 243, 261, 272, 289, 352
— *mesentericus* 182, 195, 243, 261, 262, 272, 289, 338, 381
— *mucilaginosus* var. *siliceus* 352
— *mycoides 192,* 261, 278, 289, 350, 381
— *pasteurii* 105, 199
— *polymyxa* 191, 217
— *popilliae* 360
— *septicus insectorum* 360
— *sphaericus* 361
— *subtilis* 39, 105, 195, 261, 262, 272, 278, 289, 290, 338, 352, 381, 391
— *thuringiensis* 360, 361, 362, 363, 364
— *tracheitus sivegraphitosis* 360
Bacteria 385
Bacterium typhimurium 357
Bacteroidaceae 52, 360
Bacteroides 52, 187, 408
— *succinogenes* 187
Bartonellaceae 58
Basidiomycetes 11, 78, 79, 190
Bdellovibrio 43, 49, 115, 281
— *bacteriovorus* 115
— *bassiana* 359, 363
Beggiatoa 55, 106, 107, 236, 238
Beggiatoacea 55
Beijerinckia 51, 213, 214, 260
— indica 213
— *mobilis* 213
— *fluminensis* 213
— derxii 213
Betabacterium 173
Bifidobacterium 65, 173, 373, 408
— bifidum 173, 373
Blakeslea trispora 372
Blasia pusilla 215
Blastobacter 267
Bodo 74
Borrelia 23, 49
Botrydium 72
Botrytis 186, 191, 356
— *paradossa* 359
— *cinerea* 186, 191
Bradyrhizobium 220, 234, 341, 342, 343

— *japonicum* 221, 223
— *lupini* 221
— *vigna* 221
Brevibacterium 62, 369, 370, 371
Bumilleriopsis 72
Butyrovibrio fibrisolvens 187

Caesalpinoideae 221
Calothrix 215, 268
Campylobacter 49, 106
Candidal 79, 181, 185, 243, 263
— *albicans* 381
— *japonica* 381
— *vitilis 381*
Capnocytophaga 55
Casuarina 229
Casuarinales 229
Caulobacter 57', 160, 267
Cellulomonas 62, 63, 186
Cellvibrio 264, 290
Cephalosporium 78
Cercomonas 74
Chaethomium 77, 186, 264, 369, 384
— *cellulolyticum* 386
Characiopsisis 72
Chiorella 144
Chitinophaga pinensis 200
Chlamydiaceae 58
Chlamydiales 58
Chlamydomonadales 72
Chlamydomonas 74, 268
Chiorella 268, 322, 369
— *vulgaris* 322
Chlorobiaceae 59, 126
Chlorobiales 58, 59
Chlorobium 59, 215
Chlorococcales 72
Chlorococcum 268
Chloroflexaceae 59
Chloroflexus 59
Chloronema 59
Chlorophyta 71
Choanephora 262
Chondromyces 54
Chromatiaceae 58, 126
Chromatium 59, 215
Chromobacterium 102
Chroococcidiopsis
Chytridiomysetes 76
Cicinnobolus cesati 355
Ciliata 74, 399
Ciliophora 74
Citrobacter 52, 217
Cladosporium 78, 193, 262, 384
— *herbarum* 193
Clavaria 190
Claviceps
— *paspali* 339
— *purpurea* 339
Clonothrix 56
Clostridiceae 386
Clostridium 40, 41, 42, 62, 107, 176, 177, 178, 179, 186, 189, 190, 191, 194, 195, 196, 204, 211, 214, 233, 247, 262, 265, 408
— *acetobutylicum* 177
— *acidi-urici* 178
— *aurantibutyricum* 191
— *botulinum* 102, 178, 179
— *butylicum* 177, 179
— *butyricum* 40, 177, 178, 211
— *cellobioparum* 187, 188
— *corallinum* 191
— *cylindrosporum* 178
— *dissolvens* 188
— *felsineum* 179, 191, 192, 193, 211
— *flavum* 191
— *formicoaceticum* 409
— *histolytkum* 178
— *kluyveri* 178
— *omelianskii* 187, 188, 290
— *oroticum* 178
— *pasteurianum* 124, 177, 179, 210, 211, 232, 233, 262
— *pectinolyticum* 191
— *pectinovorum* 191, 192, 193, 211
— *perfringens* 178, 179, 182
— *putrificus* 195
— *sporogenes* 178, 182, 195
— *thermocellum* 187, 188, 290, 379, 380
— *thermosaccharolyticum* 379
— *thermosutfurogenes* 240, 380
— *tyrobutyricum* 177
— *uracilicum* 178
Coccomyxa 268
Colpoda 75
Coriariales 62, 63, 229
Corynebacterium 204, 370, 384, 398
— *autotrophicum* 216
Crenothrix 56
Cristispira 23, 49, 50
Cryptococcus 263
Cryptomonas 74
Cucurbitales 229
Cunninghamella 262
Curtobacterium 62
Cyanobacteriales 59
Cylindrospermum 215, 347
Cystobacter 54
Cystobacteriaceae 55
Cytophaga 55, 185, 189, 200, 263, 290
Cytophagaceae 185
Cytophagales 54

Daedaleopsis confragasa 369
Darluca filum 355
Deinococcus radiophilus 111
Dematium 262, 264
Dendrodochium toxicum 340
Derxia 55, 214
— *gummosa* 214
Desulfobacter 239
Desulfococcus 239
Desulfomonas 149
Desulfonema 240
Desulfosarcina 239
Desulfotomaculum 40, 62, 149, 216, 239, 398
— *acetooxidans* 239
— *desulfuricans* 240
— *nigrificans* 239, 240
— orientis 239, 240
— ruminis 239, 240
— *vulgaris* 240
Desulfovibrio 53, 149, 216, 239
— *desulfuricans* 239
— gigas 239
— *vulgaris* 239
Desulfurococcus 69
— *mucosus* 240
Deuteromycetes 78, 79
Diatomeae 72
Dryas 229

Elaeagnus 229
Elavobacterium 102
Endagonaceae 334
Endomycetales 78
Endomycopsis 381
— *fibuligera* 381, 382, 385
Enterobacter 52, 86, 181, 216, 260, 349, 351, 384
— *aerogenes* 351
Enterobacteriaceae 52, 86, 180, 195, 217, 218, 357, 360
Entomophthora
— *anisopliae* 359
— *thaxteriana* 364
Eremothecium ashbyi 371 ,
Erwinia 52, 181, 217, 218
— *amylovora* 165
— *corotovora* 191
— *herbicola* 52, 218, 336, 338
Escherichia 52, 92, 94, 107, 181, 192, 217
— сой 31, 92, 93, 105, 180, 192, 235, 319, 373, 374, 387
Eubacterium 64, 408
Euglena viridis 74
Eumycota 76

Fagales 229
Firmibacteria 60

Firmicutes 48, 60
Flagellata lA
Flavobacterium 181, 200, 349, 351, 352
Flexibacter 55
Fomes 189, 190
Frankia 65, 229, 230, 330
Frankiaceae 65
Fungi 75
Fusarium 78, 165, 186, 191, 204, 262, 336, 339, 346, 358, 384
— *graminearum* 339
— *lactis* 190
— *moniliforme* 365
— *nivala* 190
— *orobanches* 356
— *oxysporumf. lycopersici* 191
— *sambicinum* 262
— *sporotrichiella* 339, 340
Fusobacterium 52

Gallionella 57, 245, 246
— *ferrugineae* 246
Gemella 61
Gibberella fujikuroi 365
Glomus 334
Gluconobacter 52, 183
— *oxydans* 183
Gonatobotrys 193
Gracilicutes 48
Gunnera macrophylla 215

Haloarcula 69
Halobacterium 69, 98
Halococcus 69, 98
Hansenula 243
Hantzschia 73
Heliobacterium 61
Heliscomenobacter 56
Helmintosporium 346, 358
Herbaspirillum seropedicae 217
Heterothrix 72
Hippophae
Holotricha 75
Hyphomicrobium 56, 160181, 267, 269
Hyphomonas 267
Hyphomycles 78

Klebsiella 52, 216, 217, 231, 234, 319, 349, 350, 384
— *planticola* 217, 330
— *pneumoniae* 234, 235, 350
— *rubacearum* 231
Kurthia 62

Labrys 267
Lactobacillaceae 62, 172, 360, 386
Lactobacillus 62, 107, 172, 173, 373, 374, 408
— *acidophilus* 172, 174, 373, 374
— brevis 173, 390, 409
— *bulgaricus* 172, 174, 373, 374
— casei 172, 173
— *cellobiosus* 173
— *coryneformis* 175
— *curvatus* 172
— *delbrueckii* 172
— *fermentum* 173
— *helveticus* 172
—lactis172
— *leichmanii* 172
- *plantarum* 172, 173, 175, 390, 393, 394
— *xylosus* 172
Leguminosae 221
Leptospira 49
Leptospiraceae 49
Leptospirillum ferrooxidans 246
Leptothrix 56, 58, 245
— *discophorus* 247
— *ochraceae* 245
Leptotnchia 52
Leptinotarsa decemlineata 361
Leuconostoc 61, 179
— *cremoris* 170, 173
— *dextramcum* 173
— *mesenteroides* 173
Lipomyces 79, 263

— *starkeyi* 263, 381
— *tetrasporium* 263
Lynglua 215

Macmmonas 53
Macrosporium 262
Mastigophora 74, 399
Melanconiales 78
Melittangium 54
Mendosicutes 48, 68
Metallogenium 57, 245
— *simbioticum* 247
Metarrhizium anisopliae 359, 363
Methanobacterium 68, 107, 386, 412
Methanococcus 68, 386, 412
— mazei 412
Methanosarcina 68, 107, 386, 412
— *barkeri* 412
Methanospirillum 386.412
Methanothrix 412
— *sochngenii* 412
Methylobacterium 216
Methylococcaceae 52
Methylococcus 52, 181, 216
Methylocystis 181
Methylomonadaceae 181
Methylomonas 52, 181, 216
Methylosinus 181
Methylotropus 319
Microbacterium 62, 181, 326
Microbispora 67
Micrococcaceae 61, 199, 360
Micrococcus 61, 243, 398
— *glutamicus* 370
— *radiodurans* 39
— urea 199
Microcoleus 215
Microscilla 55
Mycrocyclus 267
Micromonospora 66, 186, 200, 265
— *chalcea* 186
Micromonosporaceae 65, 66
Micropolyspora 67
Mimosoideae 221

Mollicutes 67
Monas 74
Moniliales 78
Monotropa hypopitys 330
Mortierella 200, 262, 280
— *alpina* 262
— *dishotoma* 262
— *usabellina* 262
— *vanaceae* 262
Mucor 77, 165, 184, 336, 340, 350
Mycelia sterilia 78
Mycobactenaceae 65
Mycobacterium 65, 83, 181, 243, 265, 315, 316
— *tuberculosis*
Mycoplasma 67
Mycoplasmataceae 67
Mycoplasmatales 67
Mycota 75
Mycroscilla
Myrica 229
Myricales 229
Myrothecium verrucaria 186
Myxobacteriales 54, 185
Myxococcaceae 54, 185
Myxococcus 54, 55, 185
Myxomycota 76

Nadsonia 78
Navicula 73
Neisseriaceae 52
Nitrobacter 53, 159, 201, 203
— agilis 201
— *winogradskii* 201, 202
Nitrobacteriaceae 53, 201
Nitrococcus 53, 201
Nitrosococcus 53, 201
Nitrosolobus 53, 201
Nitrosomonas 53, 201, 203
— *europaea* 201, 202
Nitrospira 53, 201
Nitrosospira 53, 201
Nitrosovibrio 201
Nitzschia 73

Nocardia 66, 181, 182, 200, 204, 265, 315, 316
— *corallina* 265, 315
— *rubra* 265
Nocardiaceae 65
Noctuidae 361
Nostoc 215, 268
— *linckia 347*
— *punctiforme* 215, 322
Nosema locustae 364

Oceanospiriilum 49
Ochromonas 74
Oicomonas 74
Oomycetes 79
Oomycota
Opercularia 400
Orobanche aegiptyaca 356
Oscillatoria 215
Oscillochloris 59
Oxyphotobacteria 49, 59

Partus tigrinus 369
Papilionoideae 221
Paracoccus denitrificans 208
Paramecium 75
Parasponia parviflora 231
Paspalum 339
Pavetta 231
Pediococcus 171, 172
— *acidi-lactici* 172
— *damnosus* 172
— *dextrinicus* 172
— *halophilus* 172
Pedomicrobium 57, 265, 267
Pelodiction 215
Peltigera 215
Penicillium 77, 97, 183, 184, 204, 236, 243, 250, 262, 264, 272, 278, 327, 336, 338, 340, 350, 369, 384
Peptococcaceae 61
Peptococcus 61, 408
Peptostreptococcus 61
Peritricha 75
Phoma 78
Phormidium tennue 322
Photobacterium 49, 52
Phytophthora 79, 324
Photorhizobium thompsonianum 222
Pinnularia 13
Plagiopyxis 74
Planococcus 61
Planobispora 64
Planomonospora 64
Plesiomonas 52
Pleurochloris 72
Polyangium 54, 185
Polyporus 189, 190
Polystictus 190
Procaryotae 68, 69
Prochlorales 60
Prochlorococcus 60
Prochloron 60
Prochlorothrix 60
Propiombacteriaceae 64, 175
Propionibacterium 64, 175, 176
— *acidi-propionici* 175
— *freudenreichii* 175
Prosthecomicrobium 57, 267, 269
— *pneumaticum* 24
— *polyspheroidem* 269
Proteus 52, 181, 195, 240, 319
— vul 28, 195
Protozoa 73, 281, 399
Pseudomonadaceae 50, 195, 360
Pseudomonas 50, 51, 83, 86, 87, 92, 94, 99, 100, 102, 149, 181, 182, 186, 190, 194, 195, 200, 204, 208, 217, 236, 238, 240, 243, 265, 289, 317, 319, 321, 326, 327, 328, 349, 351, 356, 384, 398
— *aeruginosa* 51, 195, 208, 319, 351, 357
-fluoresces 182, 195, 208, 260, 352
— *fluorescens* var. *cellulosae* 186
— *paucimobilis* 217
— *putida* 351
— *pyacyanea* 182
— *stutzeri 51,* 208
Psychotria 231
Puccinia triticina 355
Pythium 79
Pyrococcus furiosus 240
Pyrodictium brockii 103
— *occultum* 103

Renobacter 267
Rhizobiaceae 52
Rhizobium 52, 83, 91, 194, 220, 221,231,234,319, 330, 341, 342, 343
— *leguminosarum* 221, 223
— *phaseoli* 221
— trifolii 223
Rhizoctonia 78, 186, 358, 384
— solani 186
Rhizopoda 74
Rhizopus 77, 184, 189, 193, 243, 262
— *delemar* 381
Rhodomicrobium 58, 160
Rhodopseudotmonas 58, 159, 215
Rhodospirillaceae 58, 126
Rhodospirillales 58
Rhodospirillum 58, 215
Rhodosporidium 79, 263
Rhodotorula 79, 243, 263
Rickettsia prowazekii 58
Rickettsiaceae 58
Rickettsiales 58
Ruminobacter parvum 187
Ruminococcus 61, 187
— albus 187
— *flavefaciens* 187

Saccharomyces 78, 165, 243
— *cerevisiae* 78, 165, 167, 168, 379
— *cerevisiae* var. *ellipsoids* 168
— *globosus* 165,
— kefir 174
— rosei 379
—vini 165, 168
Saccharomycetacea 78
Salmonella 52, 92, 94, 107, 181, 319, 357, 373, 417
— *enterititis* var. *Issatschenko* 362
Sarcina 61, 398
— *ventriculi* 169
Sarcodina 74, 399
Schizosaccharomyces 78, 165
— *pompe* 165
— *ostosporus* 165
Sclerocystis 334
Sclerotinia 324, 356
Sclerotium 78
Scotobacteria 49
Scytonema 215
Selenomonas 53
Seliberia 57, 265, 267, 269
— stellata 245
Serpula lacrymans 11
Serratia 107, 181, 319, 351
— *marcescens* 182, 351
Sesbania rostrata 222, 231
Shepherdia 229
Shigella 52, 92, 107, 181
Siderocapsa 53
Siderocapsaceae 53
Sidercoccus 53, 245
Siderocystis
Sorangiaceae 185
Sorangium 54, 185
Spherocytophaga 55
Sphaeropsidales 78
Sphaerotheca morsuvae 356
Sphaerotilus 55
— *natans* 56
Spirillaceae
Spirillospora 64
Spirillum 27, 49, 260
Spirochaeta
— *cytophaga* 185
— *plicatilis* 23, 50
Spirochaetaceae 49, 434
Spirochaetales 49

Spiroplasma 68
Spiroplasmataceae 67, 68
Spirotricha 75
Spirotrix 245
Spirulina 369
Sporobolomyces 79, 263
Sporocytophaga 55, 185, 189
— *myxococcoides* 189
Sporodiobolus 263
Sporolactobacillus 40, 62
— *inulinus* 170
Sporosarcina 40, 62
— urea 199
Stachybotris altemans 340
Staphylococcus 61, 83, 87, 107
stella 267
Stigmatella 54
Stremphylium botryosum 190
Streptobacterium 172
Streptococcaceae 171, 386
Streptococcus 61, 83, 91, 171, 181, 408
— *cremoris* 170, 171
— *faecalis* 105
— lactis171, 174, 390
— *lactis var. diacetilactis* 171, 172
— *thermophilus* 171, 172, 174, 390
Streptomyces 66, 83, 186, 189, 200, 250, 319
— *aurantiaca* 372
— *casugoensis* 358, 359
— *cellulosae* 186
— *griseochromogenes* 359
— *gnseus* 358
— *lavandula* 358
Streptomycetacaae 65, 66
Streptosporangium 186
Stella *humosa* 269
Stylonichia 75
Suctoria 399
Sulfolobus 69, 236, 238, 240
— *acidocaldarius* 246
Synechococcus 215
Synechocystis 215
Synthrophobacter 386
— *wolinii* 410
Synthrophomonas 386
—wolinii 41O

Tallobacteria 62
Tenericutes 48, 67
Thamnidium 77
Thermoactionomyces 67
Thermoanaerobacterium ethanolicus 187, 188, 379, 380
Thermoanaerobacterium 172
Thermophilium 69
Thermoplasma 69
Thermoproteus 69
—tenax 240
Thiobacillus 53, 236, 237, 239
— *denitrificans* 208, 237, 238
— *ferrooxidans* 237, 238, 246
— *novellus* 237
— *thiooxidans* 237, 238, 280
— *thioparus* 237
Thiobacterium 53, 236, 238
— *thooxidans* 53, 215
Thiocapsa 215
Thiocystis 215
Thiodendron 24, 236
Thiomicrospira 236
— *denitrificans* 208
Thioploca 55, 236, 238
Thiospaera 236
Thiospira 53, 236, 238
Thiospirillum 59
Thiothrix 236, 238
Thiovulum 53
Tilletiopsis 263
Tolypothrix 215, 268
— tenuis 347
Torula 79, 174
Toxothris
Trema orientalis 231
Treponema 23, 49, 107
Tribonema 72
Trichoderma 78, 186, 190, 327, 356, 384
— *lignorum* 190, 193, 356, 357, 358, 382
— viride 186, 369, 385, 384
— *vulgaris* 315
Trichosporon 263
Trichothecium 243
— *roseum* 358

Ulotrichales 72
Ureaplasma 67
Ustilina 190

Vampirovibrio chlorellovorus 114
Verticillrum 346
— *albo-atrum* 356
— *dahliae* 355
— *lecanii* 364
Vibrio 52, 189
Vibrionaceae 52
Vitreoscilla 55
Vorticella 75, 400

Xanthomonas 51
Xanthophyta 72

Yersinia 181

Zabrus monachus 269
Zygomycetes 77
Zymomonas 378, 380
Zymomonas anaerobica 169, 379
— mobilis 165, 379, 380

Оглавление

Предисловие . . . 3
Введение . . . 5

РАЗДЕЛ 1. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 1. Морфология и ультраструктура клеток бактерий . . . 21
1.1. Морфологические типы бактерий . . . 21
1.2. Ультраструктура бактериальной клетки . . . 26
1.3. Споры и спорообразование . . . 40

Глава 2. Систематика прокариот . . . 44
2.1. Общие сведения по систематике микроорганизмов . . . 44
1.2. Краткая характеристика отдельных групп бактерий . . . 48

Глава 3. Морфология и систематика эукариотных микроорганизмов . . . 70
3.1. Водоросли — *Algae* . . . 70
3.2. Простейшие — *Protozoa* . . . 73
3.3. Грибы — *Fungi* . . . 75
3.4. Вирусы . . . 79

Глава 4. Генетика микроорганизмов . . . 84
4.1. Наследственные факторы микроорганизмов . . . 84
4.2. Механизмы, вызывающие изменение генетической информации . . . 88
4.3. Практическое использование достижений генетики микроорганизмов и генной инженерии в микробиологии . . . 94

Глава 5. Микроорганизмы и окружающая среда . . . 96
5.1. Влажность среды . . . 96
5.2. Температурный режим . . . 101
5.3. Кислотность среды . . . 104
5.4. Присутствие молекулярного кислорода в среде . . . 106
5.5. Другие факторы среды . . . 107
5.6. Взаимодействие факторов внешней среды . . . 112

Глава 6. Питание микроорганизмов . . . 116
6.1. Способы питания и поступления в клетку различных веществ . . . 116
6.2. Пищевые потребности микроорганизмов . . . 120
6.3. Типы питания . . . 124

Глава 7. Метаболизм микроорганизмов . . . 128
7.1. Основные понятия . . . 128
7.2. Брожение . . . 133
7.3. Дыхание . . . 141
7.4. Фотосинтез . . . 149
7.5. Биосинтез отдельных веществ микробной клетки . . . 150

Глава 8. Рост и размножение микроорганизмов . . . 157
8.1. Основные понятия . . . 157

Глава 9. Превращение микроорганизмами соединений углерода 163
9.1. Спиртовое брожение . . . 165
9.2. Молочнокислое брожение . . . 169
9.3. Пропионовокислое брожение . . . 175
9.4. Процессы брожения, вызываемые бактериями рода *Clostridium* и энтеробактериями . . . 176
9.5. Окисление отдельных органических веществ . . . 181
9.6. Разложение целлюлозы и других органических веществ микроорганизмами . . . 185

Глава 10. Превращение микроорганизмами соединений азота . . 194
10.1. Минерализация азота . . . 195
10.2. Нитрификация . . . 200
10.3. Иммобилизация азота . . . 205
10.4. Денитрификация . . . 206

Глава 11. Фиксация молекулярного азота атмосферы микроорганизмами . . . 209
11.1. Азотфиксация свободноживущими микроорганизмами . . . 210
11.2. Ассоциативная азотфиксация . . . 216
11.3. Симбиотическая азотфиксация . . . 219
11.4. Бактерии-симбионты небобовых растений . . . 229
11.5. Биохимия азотфиксации . . . 231

Глава 12. Микробиологические превращения соединений серы, фосфора, железа . . . 235
12.1. Биологический цикл соединений серы . . . 235
12.2. Превращение соединений фосфора . . . 241
12.3. Превращение соединений железа . . . 244

РАЗДЕЛ 2. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 13. Микроорганизмы почвы и их сообщества 248
13.1. Методы определения численности, состава и активности почвенных микроорганизмов 248
13.2. Структура микробных сообществ почв разных типов . 256

Глава 14. Экологические особенности развития микробных сообществ почвы 271
14.1. Температура почвы 271
14.2. Влажность почвы 273
14.3. Воздушный режим почвы 275
14.4. Окислительно-восстановительный потенциал почвы . 276
14.5. Кислотность почвы 279
14.6. Механический состав почвы 280
14.7. Биотические факторы 281

Глава 15. Влияние антропогенных факторов на микробное сообщество почвы 282
15.1. Обработка почвы. Мелиорация 282
15.2. Органические удобрения 287
15.3. Минеральные удобрения 302
15.4. Химические средства защиты растений (пестициды). . 312

Глава 16. Взаимодействие микроорганизмов и растений 325
16.1. Микроорганизмы зоны корня и их влияние на растение 325
16.2. Симбиоз микроорганизмов с растениями 330
16.3. Эпифитные микроорганизмы и хранение урожая 335
16.4. Развитие на растениях токсигенных грибов 338

Глава 17. Микробные землеудобрительные биопрепараты и их использование в сельском хозяйстве 341
17.1. Биопрепарат ризоторфин на основе клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* 341
17.2. Биопрепарат азотобактерин на основе *Azotobacter chroococcum* 345
17.3. Биопрепараты на основе культур цианобактерий 347
17.4. Биопрепараты на основе ассоциативных азотфиксирующих бактерий 348
17.5. Другие микробные землеудобрительные ' биопрепараты 352
17.6. Микоризация растений 354

Глава 18. Применение микроорганизмов и микробных биопрепаратов для борьбы с болезнями и вредителями сельскохозяйственных растений 355
18.1. Микробы-антагонисты и их применение для защиты растений 355
18.2. Применение антибиотиков для защиты растений 357
18.3. Использование микробных биопрепаратов для борьбы с насекомыми-вредителями сельскохозяйственных культур 359
18.4. Стимуляция роста растений биологически активными веществами 365

Глава 19. Использование продуктов микробного синтеза для кормления животных 367
19.1. Синтез кормового белка и аминокислот 367
19.2. Синтез витаминов и ферментов микроорганизмами 371
19.3. Использование пробиотиков в сельском хозяйстве . . . 372

Глава 20. Превращение микроорганизмами растительного сырья (биоконверсия) 375
20.1. Применение методов биоконверсии в сельском хозяйстве 377
20.2. Нетрадиционные пути биоконверсии растительных углеводов в этанол 378
20.3. Получение гидролаз из полисахаридов и микробного белка на крахмалсодержащем сырье 381
20.4. Биоконверсия целлюлозо-лигниновых материалов.... 382
20.5. Получение биогаза из отходов ферм 385
20.6. Силосование кормов как метод анаэробной биоконверсии 387

Глава 21. Микробиологическая трансформация отходов агропромышленного комплекса 395
21.1. Аэробная микробиологическая очистка сточных вод 395
21.2. Анаэробная микробиологическая очистка сточных вод 404
21.3. Микробиология твердых отходов 414

Список литературы 427
Приложение 429
Указатель латинских названий 432