

А. И. Нетрусов, И. Б. Котова

МИКРОБИОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Часть 2

УЧЕБНИК ДЛЯ БАКАЛАВРИАТА И МАГИСТРАТУРЫ

*Рекомендовано Учебно–методическим отделом высшего образования
в качестве учебника для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по естественнонаучным направлениям*

**Книга доступна в электронной библиотечной системе
biblio-online.ru**

Москва • Юрайт • 2018

Авторы:

Нетрусов Александр Иванович — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, заслуженный профессор Московского университета;

Котова Ирина Борисовна — доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, заслуженный преподаватель Московского университета.

Рецензенты:

Егоров Н. С. — доктор биологических наук, профессор Международного учебно-научного биотехнологического центра, заслуженный профессор Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, академик РАЕН, лауреат Государственной премии СССР;

Ножевникова А. Н. — доктор биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии антропогенных местообитаний Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, лауреат Государственной премии Российской Федерации.

Нетрусов, А. И.

Н57 Микробиология: теория и практика. В 2 ч. Часть 2 : учебник для бакалавриата и магистратуры / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Издательство Юрайт, 2018. — 332 с. — Серия : Бакалавр и магистр. Академический курс.

ISBN 978-5-534-03806-4 (ч. 2)

ISBN 978-5-9916-5291-9

В учебнике представлены все основные разделы микробиологии. Выделены важнейшие вехи в истории микробиологии. Отмечено значение работ А. Левенгука, Л. Пастера, Р. Коха, С. Н. Виноградского, Д. И. Ивановского, М. Бейеринка, А. Клейвера, А. Флеминга. Изложены работы И. И. Мечникова и теория фагоцитоза. Рассмотрены свойства микроорганизмов, их признаки, принципы систематики. Рассказано о форме клеток и движении, физиологии и метаболизме микроорганизмов. Учебник знакомит студентов с основными методами изучения микроорганизмов в лаборатории и в природных местообитаниях. Внимание уделено повсеместному распространению микроорганизмов в биосфере, выполняемым ими функциям, биоразнообразию. Представлены сведения об эволюции жизни на Земле и роли прокариот в этом процессе. Рассмотрены симбиозы с участием микроорганизмов. Кратко изложены сведения о развитии инфекционных процессов у растений, животных и человека. Показана роль микроорганизмов в жизни людей, в решении глобальных энергетических и продовольственных проблем, защите окружающей среды и сохранении здоровья населения.

Соответствует актуальным требованиям Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования.

Для студентов, обучающихся по естественнонаучным направлениям «Биология», «Экология», «Зоология» и «Ботаника», «Охрана природы и ресурсов» в рамках дисциплин «Микробиология», «Экология», «Биохимия», «Охрана ресурсов», «Рациональное природопользование».

УДК 579(075.8)

ББК 28.4я73



Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав. Правовую поддержку издательства обеспечивает юридическая компания «Дельфи».

ISBN 978-5-534-03806-4 (ч. 2)

ISBN 978-5-9916-5291-9

© Нетрусов А. И., Котова И. Б., 2017

© ООО «Издательство Юрайт», 2018

Оглавление

Раздел III МИКРОБНОЕ БИОРАЗНООБРАЗИЕ. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Глава 10. Разнообразие и систематика микроорганизмов	9
10.1. Место микроорганизмов в системе живого и принципы их классификации	9
10.1.1. Основные понятия систематики микроорганизмов.....	9
10.1.2. Основные способы классификации микроорганизмов и филогения, основанная на изучении последовательностей рРНК	11
10.2. Группы микроорганизмов	13
10.2.1. Эукариотические микроорганизмы. Краткая характеристика плесневых грибов, микроводорослей и простейших.....	13
10.2.2. Прокариоты. Сходство и различия бактерий и архей	16
Резюме	18
<i>Практикум</i>	19
Глава 11. Повсеместное распространение микроорганизмов.....	26
11.1. Основные среды обитания микроорганизмов.....	26
11.1.1. Почва.....	26
11.1.2. Водоемы	33
11.1.3. Воздух.....	37
11.1.4. Многоклеточные организмы	37
11.2. Способы существования микроорганизмов в среде обитания	37
11.2.1. Пространственное расположение микробных клеток.....	37
11.2.2. Жизненные стратегии микроорганизмов	40
11.3. Отношение микроорганизмов к абиотическим факторам внешней среды	41
11.3.1. Основные понятия	41
11.3.2. Активность воды.....	42
11.3.3. Показатель кислотности среды (рН).....	45
11.3.4. Температура	46
11.3.5. Гидростатическое давление	48
11.3.6. Электромагнитные излучения.....	49
11.3.7. Присутствие молекулярного кислорода	51
11.3.8. Микробные местообитания с несколькими экстремальными факторами	53
11.4. Отношение микроорганизмов к биотическим факторам внешней среды	57
11.4.1. Виды биотических связей и типы симбиозов.....	57
11.4.2. Микробное сообщество. Синтрофия.....	60

11.4.3. Примеры микробных симбиозов	62
Резюме	65
<i>Практикум</i>	66
Глава 12. Симбиозы микроорганизмов с животными	70
12.1. Мутуалистические симбиозы	70
12.1.1. Симбиозы водных животных с микроорганизмами	70
12.1.2. Примеры симбиозов насекомых с микроорганизмами	72
12.1.3. Микробиота рубца жвачных животных	73
12.1.4. Нормальная микробиота человека	76
12.2. Паразитические симбиозы	79
12.2.1. Основные понятия	79
12.2.2. Инфекционный процесс	81
12.2.3. Механизмы защиты макроорганизма от инфекции	82
12.2.4. Нарушения защитных реакций макроорганизма	90
12.2.5. Резервуары и пути проникновения возбудителей в макроорганизм	91
Резюме	94
<i>Практикум</i>	97
Глава 13. Микроорганизмы и растения	104
13.1. Мутуалистические симбиозы	104
13.1.1. Особенности микробно-растительных симбиозов	104
13.1.2. Ризосфера	105
13.1.3. Азотфиксирующие клубеньки	107
13.1.4. Микориза (актинориза)	107
13.1.5. Эпифитные микроорганизмы	108
13.2. Фитопатогенные микроорганизмы	109
13.2.1. Общие свойства фитопатогенных микроорганизмов и факторы, способствующие их распространению	109
13.2.2. Особенности инфекционного процесса у растений	110
13.2.3. Профилактика и методы борьбы с фитопатогенными микроорганизмами	111
Резюме	112
<i>Практикум</i>	114

Раздел IV ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 14. Микроорганизмы в природе	121
14.1. Микроорганизмы как часть экосистемы	121
14.1.1. Основные понятия экологии микроорганизмов	121
14.1.2. Основные функции микроорганизмов в природе	122
14.1.3. Особенности микробных местообитаний	123
14.2. Методы экологии микроорганизмов	125
14.2.1. Общие принципы сбора и обработки проб из природных источников	125
14.2.2. Способы оценки микробного разнообразия в природе	128
14.2.3. Изучение активности микроорганизмов в природе	133
14.3. Глобальные циклы биогенных элементов и участие в них микроорганизмов	136
14.3.1. Основные понятия	136

14.3.2. Цикл углерода и его связь с циклом кислорода.....	137
14.3.3. Круговорот азота	138
14.3.4. Цикл серы.....	140
14.3.5. Превращение микроорганизмами соединений фосфора.....	140
14.3.6. Превращение микроорганизмами соединений железа	145
14.3.7. Участие микроорганизмов в превращениях ряда других элементов	147
14.3.8. Участие микроорганизмов в формировании состава атмосферы. Парниковые газы	151
14.3.9. Загрязнение природных экосистем и возможности самоочищения. Ксенобиотики и их детоксикация	152
Резюме	155
<i>Практикум</i>	157

Глава 15. Роль микроорганизмов в эволюции биосферы..... 173

15.1. Современные представления об эволюции биосферы и роли микроорганизмов в этом процессе.....	173
15.1.1. Гипотезы возникновения и развития жизни на Земле.....	173
15.1.2. Теория симбиогенеза.....	180
15.2. Гипотеза о зарождении жизни вне Земли. Теория панспермии	182
Резюме	183
<i>Практикум</i>	183

Раздел V

НАРОДНОХОЗЯЙСТВЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 16. Значение микробных процессов в человеческой практике... 187

16.1. «Польза» и «вред» микробных процессов. Области применения микроорганизмов.....	187
16.2. Общие принципы организации и совершенствования микробиологических производств	188
Резюме	191
<i>Вопросы и задания для самоконтроля</i>	192

Глава 17. Положительная роль микроорганизмов в человеческой практике 193

17.1. Микроорганизмы в пищевых производствах	193
17.1.1. Традиционные микробиологические способы приготовления пищевых продуктов с помощью микроорганизмов.....	193
17.1.2. Молочнокислые бактерии и продукты, приготовленные с их помощью	194
17.1.3. Дрожжи и процессы приготовления пищевых продуктов с их использованием	202
17.1.4. Пищевые производства на основе других групп микроорганизмов.....	206
17.2. Микроорганизмы в производстве индивидуальных веществ и препаратов	207
17.3. Другие непищевые производства с участием микроорганизмов.....	214
17.3.1. Получение органических удобрений. Компостирование.....	214
17.3.2. Биологические топливные элементы. Получение электричества с помощью микроорганизмов	216

17.3.3. Микробное выщелачивание металлов из бедных руд	222
17.3.4. Мочка волокнистых растений.....	223
17.3.5. Микроорганизмы как инструменты и объекты научных исследований.....	223
17.4. Роль микроорганизмов в переработке отходов и очистке окружающей среды от загрязнений	224
17.4.1. Классификация загрязнений. Ксенобиотики и возможности их разрушения микроорганизмами	224
17.4.2. Способы микробиологической переработки отходов. Основные принципы и показатели.....	226
17.4.3. Микробиологическая очистка сточных вод.....	227
17.4.4. Утилизация твердых бытовых отходов с помощью микроорганизмов.....	232
17.4.5. Биоремедиация загрязненных объектов природной среды.....	234
Резюме	236
<i>Практикум</i>	240
Глава 18. Негативные микробные процессы	244
18.1. Порча микроорганизмами продуктов питания.....	244
18.1.1. Факторы, влияющие на процесс порчи пищевых продуктов	244
18.1.2. Микробная порча молока и молочных продуктов.....	246
18.1.3. Микробная порча мяса, продуктов из него и морепродуктов	248
18.1.4. Микробная порча консервов	251
18.1.5. Микробная порча фруктов, овощей, зерна.....	252
18.1.6. Микробная порча некоторых напитков.....	253
18.1.7. Методы защиты продуктов от порчи.....	253
18.2. Микробное повреждение промышленных и бытовых объектов и материалов.....	254
18.3. Болезнетворные микроорганизмы. Принципы выявления, профилактики и лечения инфекционных заболеваний.....	256
18.3.1. Бактериальные болезни	256
18.3.2. Заболевания, вызываемые грибами	265
18.3.3. Протозойные инфекции.....	265
18.3.4. Особенности вирусных инфекций	267
18.3.5. Выявление болезнетворных агентов	274
18.3.6. Способы профилактики и лечения инфекционных заболеваний	276
18.3.7. Проблемы борьбы с инфекционными заболеваниями.....	280
18.3.8. Оценка безопасности воды, воздуха, почвы и пищевых продуктов.....	282
Резюме	290
<i>Практикум</i>	295
Список литературы.....	306
Приложение. Краткий систематический обзор микроорганизмов-прокариот	307
Предметный указатель.....	324
Новые издания по дисциплине «Микробиология» и смежным дисциплинам	332

Раздел III
МИКРОБНОЕ БИОРАЗНООБРАЗИЕ.
ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ
СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ



Глава 10

РАЗНООБРАЗИЕ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- современную систематику микроорганизмов;

уметь

- объяснить различия систематического положения эукариотов и прокариотов;

владеть

- современными методами идентификации микроорганизмов.
-

10.1. Место микроорганизмов в системе живого и принципы их классификации

10.1.1. Основные понятия систематики микроорганизмов

Микроорганизмы — это большая сборная группа, внутри которой представители объединены микроскопическими размерами, но могут существенно различаться клеточной организацией, морфологией и возможностями обмена веществ. Поэтому термин «микроорганизм» не имеет таксономического смысла. Представители мира микробов относятся к самым разным таксономическим группам, другие члены которых могут быть многоклеточными организмами, иногда гигантских размеров. Например, низшие плесневые грибы родственны шляпочным грибам, а микроводоросли объединены с такими крупными особями, как ламинария. Микроорганизмы — это самая обширная по количеству представителей группа, члены которой повсеместно распространены. У микроорганизмов встречаются все известные типы обмена веществ.

Накопление огромного фактического материала и необходимость сравнивать результаты, полученные разными исследователями, потребовали ввести правила описания объектов и распределения (**классификации**) их по группам. Под классификацией понимают отнесение конкретного биологического объекта к определенной группе однородности (**таксону**) по совокупности присущих ему признаков. В современной классификации микроорганизмов принята следующая иерархия таксонов: домен, филум, класс, порядок, семейство, род, вид. Отношения соподчиненности и взаимосвязи таксонов различных уровней изучает **систематика**. Вид является основной таксономической единицей. В микробиологии используют биномиальную систему обозначения объекта (**номенклатуры**), включающей родовое и видовое названия, например, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa* и т.д. В ряде случаев допускается применение исто-

рически сложившихся русскоязычных наименований (кишечная палочка, пекарские дрожжи, синегнойная палочка).

Для классификации важно договориться о наборе критериев, которые будут определяющими при объединении объектов в группу. Большинство микроорганизмов устроено крайне просто и универсально, поэтому для их разбиения на таксоны недостаточно морфологических описаний. Исследователи вынуждены привлекать функциональные характеристики микроорганизмов, т.е. отмечать особенности их метаболизма. При этом в зависимости от подхода признаки могут иметь неодинаковую значимость (одни обязательны для помещения в данную группу, а другие могут варьировать).

Представление о месте микроорганизмов среди других живых существ эволюционировало с течением времени. А. Левенгук называл их маленькими «зверушками», позже микроорганизмы относили к низшим растениям. Об этом напоминает устаревший термин «микрофлора», часто используемый и в современной литературе. Для классификации и систематизации всего живого необходимо было взять за основу некий важный признак, который имелся бы у всех организмов и незначительно менялся бы в течение длительных временных периодов. Тогда различия в этом консервативном признаке позволят распределить живые объекты по группам, взаимоотношения между которыми будут отражать родственные связи и пути эволюции организмов. В этом случае иерархия таксонов по сути дела будет отражать генеалогическое древо, поскольку в подавляющем большинстве случаев невозможно напрямую установить исторический путь эволюции микроорганизмов из-за отсутствия их ископаемых остатков.

В настоящее время микробиологический объект невозможно классифицировать, не изучив совокупность морфофизиологических, биохимических и молекулярно-биологических данных. При определении неизвестного микроорганизма (**идентификации**) исследуют следующие свойства:

1. Тип клеточной организации (прежде всего, отнесение к про- или эукариотам).
2. Морфологию клеток и колоний (на определенных средах и при определенных условиях).
3. Культуральные признаки (характер роста на твердых и жидких средах).
4. Физиологические свойства (способность к использованию различных субстратов, отношение к температуре, аэрации, pH и т.д.).
5. Биохимические свойства (наличие тех или иных метаболических путей).
6. Молекулярно-биологические свойства (последовательность нуклеотидов 16S рРНК, содержание ГЦ-пар в мол.%, возможность гибридизации нуклеиновых кислот с материалом типовых штаммов).
7. Хемотаксономические свойства (химический состав различных соединений и структур, например, спектр жирных и тейхоевых кислот у актинобактерий, миколовых кислот у нокардий, микобактерий, коринебактерий).
8. Серологические свойства, основанные на реакциях «антиген — анти-тело» (особенно для патогенных микроорганизмов).
9. Чувствительность к специфическим фагам (фаготипирование).

Иногда отмечают наличие у микроорганизма внехромосомных элементов, в том числе молчащих (криптических) плазмид. При этом следует помнить, что плазмиды могут легко утрачиваться. При идентификации микроорганизмов-прокариот современные исследователи опираются на указания «Руководства Берджи по систематике бактерий» («Bergey's Manual of Systematic Bacteriology»).

10.1.2. Основные способы классификации микроорганизмов и филогения, основанная на изучении последовательностей рРНК

В настоящее время существует несколько основных способов классификации живых объектов, в том числе микроорганизмов.

Формальная **нумерическая классификация** считает все признаки организма одинаковыми по значимости. Учитываемые критерии должны быть альтернативными, т.е. присутствовать (+) или отсутствовать (–) у конкретного объекта. Точность помещения его в данную группу будет зависеть от полноты изучения организма. Для количественной оценки степени сходства и различия объектов разработаны специальные компьютерные программы, сравнивающие организмы по набору исследованных признаков. Сходные организмы объединяются в кластеры.

Для **морфофизиологической классификации** необходимо изучить не только совокупность морфологических признаков, но и особенности метаболизма организмов. При этом учитывают разную значимость применяемых критериев: некоторые свойства считают обязательными, значимыми для объекта, а другие могут присутствовать в разной степени или совсем отсутствовать. Результаты всех необходимых тестов применяют при работе с определителем. В настоящее время для идентификации прокариотических микроорганизмов исследователи пользуются определителем, носящим имя американского бактериолога Берджи, предложившего в 1923 г. основы такой классификации.

Молекулярно-генетическая классификация предполагает анализ строения молекул важных биополимеров. Такая молекула должна быть консервативной и значимой для основополагающего жизненного процесса. Профессор Иллинойского университета Карл Вез предложил взять за основу рибосомальную РНК (16S рРНК для прокариот, 18S рРНК — для эукариотических организмов). Эта молекула входит в состав рибосом, которые у всех живых существ отвечают за важнейший жизненный процесс — синтез белка. Аппарат синтеза белка незначительно меняется во времени, так как любое сколько-нибудь существенное нарушение может привести к гибели клетки. Поэтому в молекулах рРНК разных организмов большинство нуклеотидов неизменно, а изменяющаяся в процессе эволюции часть уникальна для конкретного организма. 16S рРНК состоит из 1500 нуклеотидов, из которых 900 — консервативны, т.е. она обладает достаточно большой, но не чрезмерной информацией и может считаться своеобразным биологическим генетическим «хронометром». Сравнивая с помощью специальных компьютерных программ нуклеотидные последовательности этой молекулы у разных организмов, можно получить группы сходства биологических объектов, отражающие их родственные связи

и эволюционное развитие. На основе множества сравнений было построено филогенетическое древо, где все представители живого мира разделены на три больших домена (империи, надцарства): *Bacteria*, *Archaea* и *Eukarya* (рис. 10.1). Домены *Bacteria* и *Archaea* содержат только прокариотические организмы, а домен *Eukarya* объединяет всех эукариот — как одноклеточных, так и многоклеточных, включая человека.

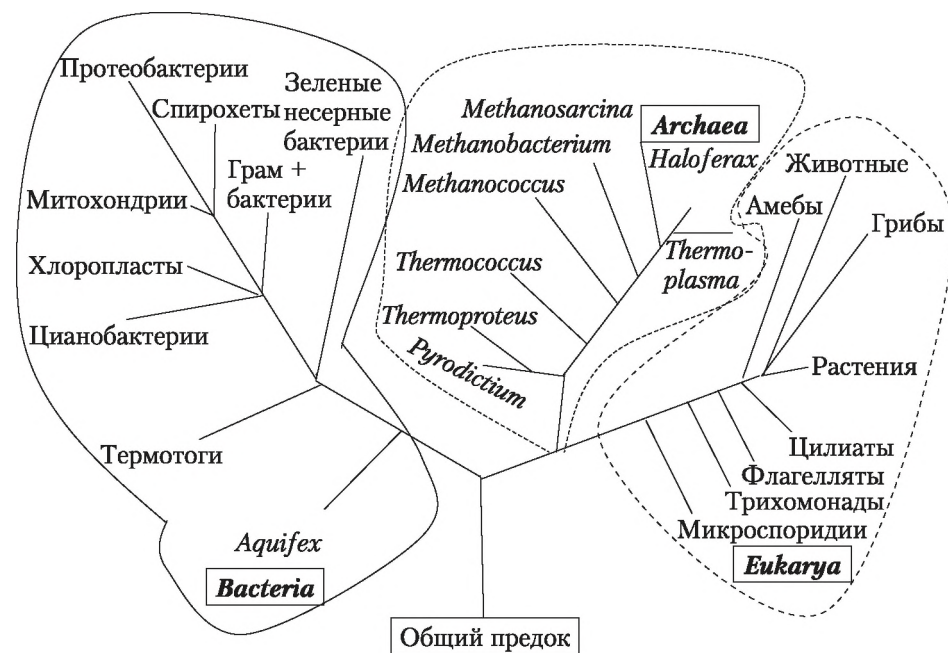


Рис. 10.1. Отдельные филогенетические группы филогенетического древа, основанного на сравнении 16 (18)S рРНК

При анализе рибосомальных РНК из митохондрий и хлоропластов было показано, что они имеют прокариотное симбиотическое происхождение. Нуклеотидные последовательности изученных организмов исследователи направляют во всемирный компьютерный генбанк (GenBank), данные которого предназначены для проведения сравнения с последовательностями каждого вновь выделенного организма.

В настоящее время для идентификации конкретного микроорганизма выделяют его чистую культуру и сначала проводят анализ нуклеотидной последовательности 16S рРНК. Сравнение с уже известными последовательностями позволяет поместить микроорганизм в один из кластеров на филогенетическом древе, учитывая следующие критерии сходства последовательностей нуклеотидов: «вид» $\geq 97\%$, «род» $\geq 94\%$, «семейство» $\geq 92\%$, «порядок» $\geq 90\%$, «класс» $\geq 85\%$, «филум» $\geq 80\%$. Данные критерии названы **операционными таксономическими единицами (OTU)**. Значения процентов, их определяющие, являются «договорными», общепринятыми в международном научном сообществе для выделенных в настоящее время культивируемых прокариот и клонов некультивируемых бактерий и архей.

Следует подчеркнуть, что в других классификационных схемах, принятых, например, в зоологии или ботанике, критерии отнесения к роду или виду могут существенно отличаться по этому признаку. Далее определение видового названия ведется традиционными микробиологическими методами. Для уточнения таксономической принадлежности проводят ДНК-ДНК гибридизацию, которая дает $> 30\%$ совпадения в пределах рода и $> 70\%$ — в пределах вида. Нуклеотидная последовательность вновь выделенного микроорганизма должна быть направлена в генбанк для пополнения базы данных.

Для выявления родственных связей микроорганизмов более узких групп иногда используют и другие молекулы. Например, для дышащих организмов применяют определение последовательности аминокислот в белке цитохрома *c*. У ряда прокариотических и эукариотических микроорганизмов определена полная последовательность ДНК в хромосомах.

Для более четкой дифференцировки микроорганизмов на уровне рода и вида предложено применять **полифилетическую (полифазную) таксономию**, когда наряду с определением последовательностей нуклеотидов используют информацию разных уровней, вплоть до экологического. При этом проводят предварительный поиск групп схожих штаммов и определение филогенетических позиций этих групп, фиксируют различия между группами и их ближайшими соседями и собирают данные, позволяющие дифференцировать группы.

10.2. Группы микроорганизмов

10.2.1. Эукариотические микроорганизмы. Краткая характеристика плесневых грибов, микроводорослей и простейших

В домене *Eukarya* есть три группы, содержащие микроскопические объекты. Это водоросли, простейшие и грибы.

Водоросли — это одноклеточные, колониальные или многоклеточные фототрофы, осуществляющие окислительный фотосинтез. Молекулярно-генетическая классификация водорослей находится в стадии разработки, поэтому для практических целей пользуются классификацией водорослей по составу пигментов, запасных веществ, строению клеточной стенки, наличию подвижности и способу размножения. Микробиологическими объектами традиционно считаются одноклеточные представители динофлагеллятных, диатомовых, эвгленовых и зеленых водорослей, а также их бесцветные формы, растущие в темноте и утратившие пигменты. Все водоросли образуют хлорофилл *a* и различные формы каротиноидов, а по способности синтезировать другие формы хлорофиллов и фикобилины представители групп различаются. Окрашивание клеток в разные цвета: зеленый, бурый, красный, золотистый — зависит от сочетания пигментов у конкретного вида. Диатомовые водоросли — это одноклеточные планктонные формы, имеющие характерную клеточную стенку в виде кремниевого двустворчатого панциря. Некоторые представители могут передвигаться скольжением. Диатомеи размножаются как бесполым, так

и половым путем. Одноклеточные эвгленовые водоросли обитают в пресноводных водоемах и движутся с помощью жгутиков. У них отсутствует клеточная стенка. В темноте они способны расти за счет окисления органических веществ. Клеточная стенка динофлагеллят состоит из целлюлозы. Эти планктонные одноклеточные водоросли имеют два боковых жгутика. Микроскопические представители зеленых водорослей обитают в пресных и морских водоемах, в почве и на поверхности различных наземных объектов. Они могут быть неподвижными или передвигаться с помощью жгутиков. Зеленые микроводоросли имеют целлюлозную клеточную стенку и запасают в клетках крахмал. Они способны размножаться как бесполым, так и половым путем.

Простейшие являются морфологически разнообразной группой одноклеточных гетеротрофных организмов. Они повсеместно распространены и ведут сапротрофный или паразитический образ жизни. Свободноживущие простейшие питаются бактериями, водорослями, дрожжами, другими простейшими и даже мелкими членистоногими, а также мертвыми остатками растений, животных и микроорганизмов. Их клетки способны поглощать питательные вещества всей поверхностью ЦПМ в растворенном виде или путем эндоцитоза. У большинства простейших клеточная стенка отсутствует. Они могут быть неподвижными или передвигаться с помощью жгутиков, ресничек и ложноножек. Простейшие делятся на несколько групп. Амебы питаются путем эндоцитоза, движутся с помощью ложноножек и размножаются делением клетки надвое. Большинство амеб является свободноживущими водными формами, однако некоторые вызывают заболевания человека и животных. У амеб простой жизненный цикл, где стадия активно питающихся клеток сменяется образованием цист. Клетки инфузорий содержат два разных ядра и при бесполом размножении делятся в поперечном направлении. При половом процессе между двумя инфузориями разных половых типов происходит обмен ядрами, предварительно претерпевшими деление и слияние. Инфузории движутся с помощью скоординированной системы ресничек. Захват пищи при эндоцитозе происходит в специальной «ротовой» области клетки, а выброс остатков осуществляется через отверстие на ее заднем конце. Природными местобитаниями инфузорий являются загрязненные органическими веществами водоемы, а также рубец жвачных животных. Жгутиконосцы — это подвижные простейшие, имеющие один или несколько жгутиков. Растворенные питательные вещества они поглощают всей поверхностью ЦПМ. Клетки жгутиконосцев делятся только в продольном направлении. Жгутиконосцы представлены как свободноживущими, так и симбиотическими видами. К паразитическим симбионтам человека и животных относят трипаносом, вызывающих сонную болезнь, лейшманий — возбудителей труднозаживляемых язв и лямблий, приводящих к кишечным расстройствам. Обитающие в кишечнике трихомонады чаще всего безвредны для макроорганизма. Из всех простейших наиболее сложный жизненный цикл имеют споровики. Он включает половую и бесполовую стадии с множественным делением и образованием спор. Споровики неподвижны или способны передвигаться скольжением, а питание поглощают в растворенном виде через

ЦПМ. Наиболее известным представителем споровиков является малярийный плазмодий, вызывающий тяжелое и длительно протекающее заболевание человека. До недавнего времени простейшим уделяли внимание, в основном, медицинские микробиологи в связи с их патогенностью для человека. Однако оказалось, что при выращивании некоторых почвенных и водных простейших микробиологическим способом в виде чистых культур можно получать ценные продукты. Например, жгутиконосец *Astasia longa* при культивировании в ферментере на синтетической среде может образовывать до 20% от общего количества липидов ценной полиненасыщенной арахидоновой кислоты.

Грибы — это гетеротрофные организмы, большинство из которых образует мицелий. Мицелий состоит из вытянутых нитевидных ветвящихся клеток (гиф), которые часто соединены в сложную паутинообразную структуру. Мицелий бывает многоядерным (ценоцитным), без поперечных перегородок, а может быть септированным, многоклеточным. Клеточная стенка грибов содержит хитин. Грибы питаются путем поглощения растворенных в воде веществ через ЦПМ. Большинство грибов получают энергию в процессе аэробного дыхания, окисляя органические соединения, но есть и факультативные анаэробы, способные переключаться на спиртовое брожение. В рубце жвачных обнаружены строго анаэробные грибы, расщепляющие целлюлозу. Данные организмы способны размножаться вегетативно, бесполом и половым путем. Их подразделяют на группы в соответствии с особенностями их размножения. К несовершенным грибам относят представителей, у которых не обнаружено половое размножение. В эту группу входят такие традиционные микробиологические объекты, как виды родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Rhodotorula* и др. Группу зигомицетов составляют грибы, обладающие ценоцитным мицелием и образующие зигоспору путем слияния двух родительских гиф при половом процессе. Известные роды зигомицетов — это *Mucor* и *Rhizopus*. Грибы, формирующие для спороношения специальную сумку (аск), называют аскомицетами. Они имеют септированный мицелий, а при бесполом размножении образуют конидии (цепочки спор, собранные в кисточки или головки). В эту группу входят виды родов *Neurospora*, *Saccharomyces*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*. Некоторые дрожжи и большинство высших шляпочных грибов относятся к базидиомицетам. При половом размножении у них формируется специальная раздутая гифа (базидия), образующая выросты со спорами. Мицелий базидиомицетов разделен перегородками.

Среди грибов есть свободноживущие, симбиотические и хищные формы. Хищные грибы ловят и умерщвляют простейших и мелких беспозвоночных ловушками из специальных гиф. После гибели жертвы гифы проникают внутрь ее тела и поглощают из него питательные вещества. Широко распространены грибы-паразиты, вызывающие заболевания растений, животных и человека. Так, многие пасленовые растения поражаются фитофторой, злаки заражаются спорыньей, ржавчинными и головневыми грибами, от мучнисторосяных грибов страдают самые разные растения. Грибы вызывают поверхностные и генерализованные микозы человека и животных. Некоторые грибы существуют в мутуалистических

симбиозах с различными организмами. Например, входят в состав лишайников и образуют микоризу на корнях высших растений. Грибы издавна используются человеком в пищу. Многие биотехнологические процессы получения спиртосодержащих напитков, соевого соуса, некоторых сортов сыра, антибиотиков, витаминов, липидов и органических кислот основаны на метаболизме низших грибов. Важное место в хозяйственной деятельности человека занимают представители сборной нетаксономической группы **дрожжей**, в которую входят грибы, для которых характерно отсутствие или существенное сокращение мицелиальной стадии роста. Наиболее известны дрожжи родов *Saccharomyces*, *Lipomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*. Морфология и метаболизм дрожжей в значительной степени зависит от условий их выращивания. Многие дрожжи длительно существуют в виде отдельных неподвижных клеток и размножаются почкованием или делением. Большинство дрожжей — факультативные анаэробы. Есть среди дрожжей и патогенные виды (например, *Candida albicans* является возбудителем «молочницы»).

10.2.2. Прокариоты. Сходство и различия бактерий и архей

Прокариотические микроорганизмы объединены в два отдельных домена: *Bacteria* и *Archaea*. Разделение этих групп произошло на основании результатов сравнения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК, а также вследствие существенных различий в составах клеточных стенок, липидов и из-за особенностей метаболизма. **Археи** отличаются от бактерий и эукарий рядом существенных признаков. В обычных липидах глицерол связан сложноэфирной связью с жирными кислотами (рис. 10.2, а), а у архей — простой эфирной связью с изопреноидным C_{20} -спиртом — фитанолом (рис. 10.2, б). Цепи фитанола могут содержать пятичленные кольца. Липиды архей способны образовывать тетрамеры ($C_{20} + C_{20} = C_{40}$, рис. 10.2, в), поэтому сложенная из тетрамеров мембрана более жесткая, чем традиционный бислой (рис. 10.2, г), так как у нее нет внутреннего пространства (рис. 10.2, д).

Археи могут иметь как обычные бислойные, так и ригидные монослойные мембраны. Чем экстремальнее условия их обитания, тем больше монослойных областей содержится в ЦПМ. Содержание изопреноидов (в частности, сквалена) в мембранах архей составляет 7—30%. Такие соединения обнаружены в глубоких нефтяных отложениях, что свидетельствует о древности микроорганизмов-архей. У архей нет типичных для бактерий пептидогликановых (муреиновых) клеточных стенок. В состав клеточных стенок некоторых архей может входить другой гетерополисахарид — **псевдомуреин**, в котором отсутствует N-ацетилмурамовая кислота. Некоторые археи могут иметь поверх ЦПМ белковый S-слой в качестве клеточной стенки. Еще один вариант организации архей — это полное отсутствие клеточной стенки, когда мембрана почти целиком представлена ригидным монослоем из тетрамеров, усиленным большим количеством пятичленных колец, например, как у представителей рода *Thermoplasma*.

По ряду признаков археи ближе к эукариям, чем к бактериям. Так, подобно эукариотам, у ряда архей обнаружены интронные участки в ДНК, а также гистоноподобные белки, связанные с нуклеиновыми кислотами.

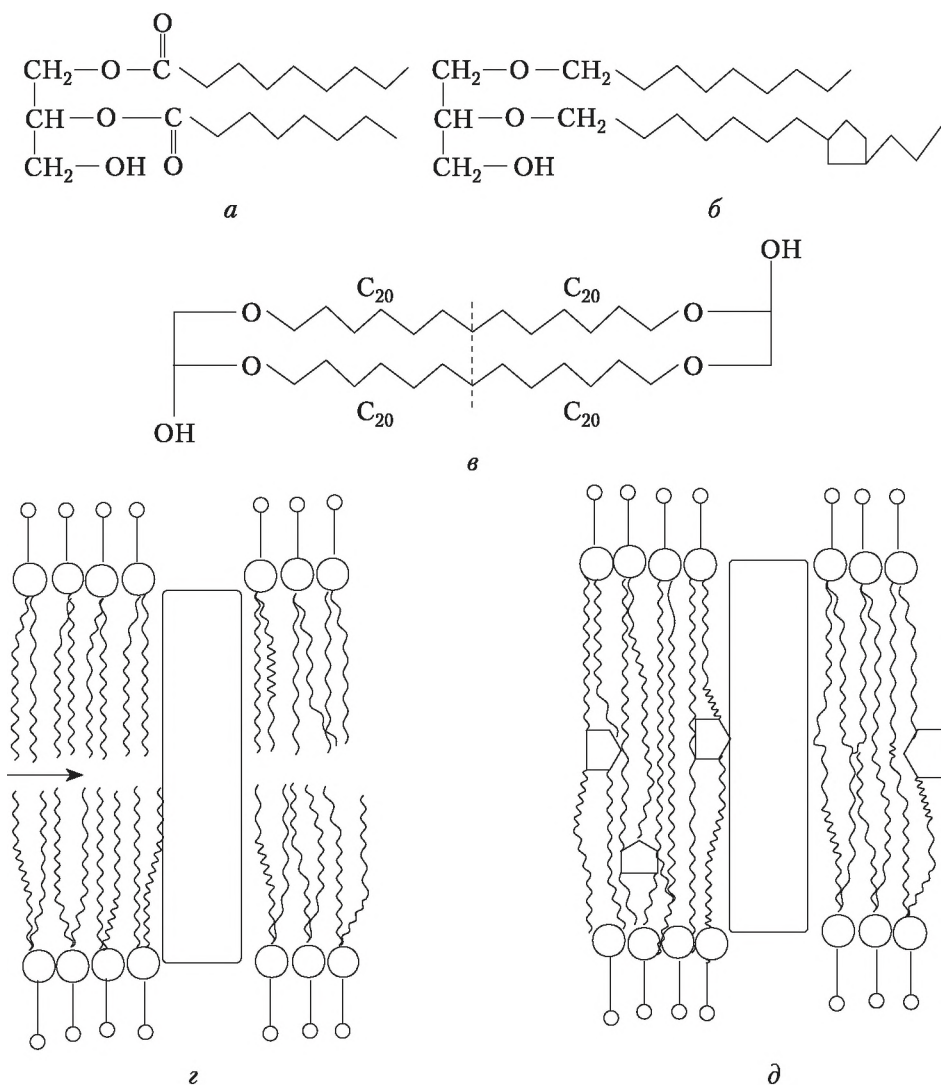


Рис. 10.2. Структура:

а — фосфолипидов бактерий; б, в — архей; г — бислоистой мембраны;
д — монослойной мембраны

РНК-полимеразы архей по составу и строению напоминают эукариотические ферменты, а в их тРНК не найдено риботимина. Трансляция белка у архей нечувствительна к известному бактериальному ингибитору хлорамфениколу, зато ингибируется дифтерийным токсином (как у эукариот). Многие археи живут в экстремальных условиях и дают скудный рост. Отсутствие конкурентов в таких местообитаниях позволило представителям этой древней группы сохраниться до настоящего времени. Галофильные археи способны осуществлять бесхлорофильный фотосинтез, связанный с функционированием особого белка, **бактериородопсина**, по многим свойствам схожего с родопсином сетчатки глаза животных.

Домен *Archaea* разделен на пять филумов, в которых есть хотя бы единичные культивируемые организмы: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Nanoarchaeota*. К первому филуму относятся повсеместно распространенные микроорганизмы нескольких физиологических и систематических групп. Это метаногены — строгие анаэробы, обитающие в донных осадках пресноводных зон, богатых органикой, или в рубце жвачных. Широко распространены также экстремальные галофилы (галоархеи), растущие при высоких концентрациях соли и способные осуществлять особый тип фотосинтеза с помощью бактериородопсина, который на свету работает как протонная помпа. Термоплазмы, обитающие в горячих кислых источниках, и облигатно анаэробные термококки развиваются при высоких температурах, причем термоплазмы лишены клеточных стенок. В этот филум входят также экстремально термофильные сульфатредукторы. Ко второму филуму относятся микроорганизмы, обитающие в очень специфических местах с узкими границами значений физико-химических факторов. Это экстремофилы, зависящие от серных соединений, оптимумы pH и температуры роста которых отличаются экстремальными значениями. Третий, четвертый и пятый филумы содержат от одной до четырех чистых культур, а основная часть организмов не поддается культивированию и представлена в виде последовательностей генов, кодирующих молекулу 16S рРНК.

Домен *Bacteria* объединяет прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности, клеточные оболочки, содержащие пептидогликан. В настоящее время домен делится на 32 филума, которые содержат культивируемых представителей, все или часть из которых получены в виде чистых культур.

Краткий систематический обзор прокариот будет представлен в конце курса, поскольку рассмотрение филогенетических групп невозможно без знакомства с метаболическими возможностями и физиолого-биохимическими особенностями их представителей.

Резюме

Мир микробов является большой сборной группой, внутри которой представители могут различаться клеточной организацией, внешним видом и образом жизни. Под классификацией понимают отнесение конкретного биологического объекта к определенному таксону по набору присущих ему признаков. Основной таксономической единицей является вид. Отношения соподчиненности и взаимосвязи таксонов различных уровней изучает систематика.

Формальная нумерическая классификация считает все признаки организма одинаковыми по значимости и учитывает наличие или отсутствие каждого такого признака у конкретного объекта. Морфофизиологическая классификация опирается на определение совокупности особенностей строения и метаболизма организмов, при этом различают обязательные для группы признаки и те, которыми можно пренебречь. Молекулярно-генетическая классификация основана на анализе строения молекул важных биополимеров.

Путем сравнения нуклеотидных последовательностей молекул 16S рибосомальных РНК можно получить группы сходства биологических объектов, отражающие их родственные связи и эволюционное развитие. Все представители живого мира разделены на три домена: *Bacteria*, *Archaea* и *Eukarya*. В домен *Eukarya* вошли как одноклеточные, так и многоклеточные эукариотические организмы, включая человека. Домены *Bacteria* и *Archaea* содержат только организмы-прокариоты.

В домене *Eukarya* есть группы, содержащие в своем составе микроскопические объекты. Это водоросли, простейшие и грибы. Водоросли — это фототрофные организмы, осуществляющие окислительный фотосинтез. Простейшие — морфологически разнообразная группа одноклеточных гетеротрофных организмов. Грибы — это гетеротрофные организмы, большинство из которых образует мицелий.

Прокариотические микроорганизмы составляют два отдельных домена: *Bacteria* и *Archaea*. Основанием для разделения этих групп послужили, прежде всего, результаты сравнения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК, а также существенные различия в составе клеточных стенок, липидов и ряд других особенностей. Домен *Archaea* подразделяется на пять филумов, имеющих культивируемых представителей. Домен *Bacteria* включает прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности, клеточные оболочки, содержащие пептидогликан. В настоящее время домен делится на 32 филума, которые содержат культивируемых представителей, все или часть из которых получены в виде чистых культур.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Почему термин «микроорганизм» не имеет таксономического смысла?
2. Сравните между собой имеющиеся классификации микроорганизмов.
3. К каким доменам относятся представители мира микробов?
4. Сравните группы эукариотических микроорганизмов по морфологии и метаболическим возможностям.
5. Чем археи отличаются от бактерий?

Семинар 1

Основные филогенетические группы организмов: археи, бактерии

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Выделение и идентификация чистых культур микроорганизмов

Цель работы: после выполнения работы студенты будут знать принципы выделения чистых культур микроорганизмов и смогут определить их систематическое положение.

1.1. Выделение чистых культур микроорганизмов и проверка их на чистоту.

Для выделения чистых культур микроорганизмов из накопительных обычно используют метод Коха. Принцип его заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, являющейся потомством одной клетки. Выделение чистых культур аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов проводят, рассеивая накопительную культуру на поверхность агаризованной питательной среды методом «истошающего штриха» (рис. 10.3) либо растирая каплю суспензии стерильным стеклянным шпателем Дригальского.

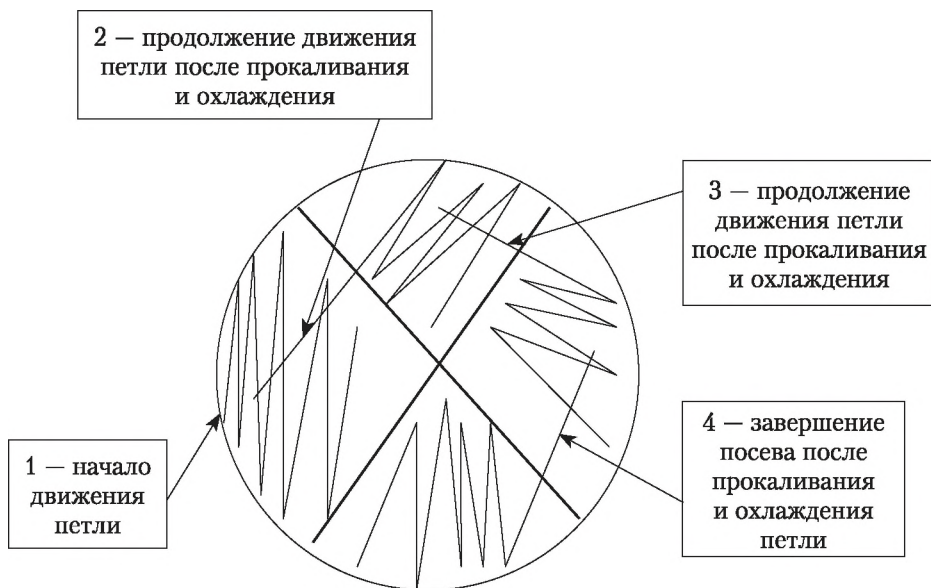


Рис. 10.3. Посев по методу «истошающего штриха»:

1...4 — этапы последовательного нанесения линий для получения отдельных колоний

В зависимости от свойств накопительных культур микроорганизмов для получения отдельных колоний используют разные среды. Например, для посева спорных аэробных, денитрифицирующих и углеводородокисляющих бактерий применяют БСА, для аммонифицирующих — МПА, для уробактерий — МПА с 2% мочевины, для метилотрофов — агаризованную среду с метанолом, для азотфиксаторов — агаризованную среду Эшби и т.д. Чашки с посевами крышками вниз помещают в термостат (30°C) на 4–6 сут. По окончании инкубации изолированные колонии микроорганизмов описывают (табл. 10.1) и микроскопируют. Затем из выбранных колоний с помощью петли делают посев прямым штрихом на соответствующие скошенные агаризованные среды. Посевы помещают в термостат (30°C) на 3–5 сут. После инкубации проверяют чистоту выделенных культур визуально (рост должен быть однородным по всему штриху) и микроскопированием (чистые культуры многих бактерий должны быть морфологически однородны, допустимо лишь некоторое варьирование размеров

клеток). Необходимо также провести рассев на соответствующую твердую среду в чашки Петри. Однородность колоний и совпадение их признаков с описанными ранее является свидетельством чистоты культуры. Однако следует учитывать, что некоторые виды бактерий могут образовывать колонии разной морфологии в результате процесса диссоциации.

Таблица 10.1

Свойства идентифицируемого микроорганизма

Признак	Результат (рисунок, описание)
Описание колонии	
Форма	
Размер, мм	
Цвет	
Край	
Блеск	
Поверхность	
Профиль	
Цитология и морфология клеток	
Форма и расположение клеток	
Подвижность	
Наличие эндоспор	
Грампринадлежность	
Окраска на кислотоустойчивость	
Физиолого-биохимические свойства	
Рост на среде с глюкозой	
Рост на среде с желатиной (протеолитическая активность)	
Рост на среде с молоком (протеолитическая активность)	
Рост на среде с крахмалом (амилазная активность)	
Тест на каталазу	
Тест на оксидазу	

Для получения чистых культур облигатных анаэробов (гомоацетогенов и метаногенов) используют рассев накопительной культуры на поверхность или в толщу агаризованной минеральной среды того же состава (с 1,5–2% агара). Стерильную анаэробную агаризованную среду в плотно закупоренных сосудах расплавляют, остужают до 45°С и стерильным шприцем вносят аликвоту культуральной жидкости из накопительной культуры с соблюде-

нием условий анаэробноз. После тщательного перемешивания содержимого сосуда его либо оставляют в горизонтальном положении для застывания, либо раскатывают сосуд рукой по ровной поверхности до затвердевания агара по стенкам в виде тонкого слоя. В обоих случаях добиваются получения максимальной поверхности агаризованной среды. Допустим рассев накопительной культуры на поверхность твердой среды в чашках Петри петлей или шпателем при работе в анаэробном боксе и последующей инкубации посевов в анаэробном боксе. Для гомоацетогенов мел в агаризованной среде может служить индикатором образования ацетата (зоны просветления вокруг колоний). Культивирование ведут при 20–30°C (для гомоацетогенов) или при 30–37°C (для метаногенов) до появления отдельных колоний. При использовании в качестве субстрата молекулярного водорода очистку культуры проводят либо в тонком слое агаризованной среды, либо методом предельных разведений в жидкой среде при перемешивании. Чистоту выделенных культур оценивают по однородности полученных колоний и микроскопической картины, а также путем посева на твердые среды в анаэробных условиях (в анаэробном боксе). Материал берут из отдельной колонии с помощью микробиологической иглы или петли и осуществляют поверхностный посев на среду в чашках Петри. При глубинном посеве в толщу расплавленной агаризованной среды стерильным шприцем вносят суспензию клеток из отдельной колонии, приготовленную в стерильном анаэробном физрастворе. Через 2 пассажа выделенную культуру проверяют на чистоту на богатых средах, содержащих 0,1% дрожжевого или солодового экстракта и пептона. Свидетельством чистоты культуры является однородность выросших колоний и совпадение их признаков с описанными в литературе. Для выделения *Methanosaeta*-подобных метаногенов, которые практически не растут на твердых средах, применяют метод предельных разведений в жидкой среде с ацетатом в качестве субстрата.

1.2. Идентификация выделенных чистых культур.

Необходимые материалы и оборудование: световой микроскоп, иммерсионное масло, необходимые красители и реактивы, предметные и покровные стекла, газовые горелки, микробиологические петли и иглы, тест-культуры *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* и *Mycobacterium flavescens*; пробирки со средой с глюкозой и индикатором, чашки с агаризованными средами с молоком и крахмалом, пробирки со столбиками желатины, которые готовит лаборант.

В процессе выполнения данной лабораторной работы студенты изучают принципы постановки тестов, необходимых для описания микробного штамма и идентификации его до уровня рода. Для изучения размеров, морфологии клеток, их подвижности и взаимного расположения готовят и микроскопируют препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный фуксином препарат. Результаты вносят в табл. 10.1. Наличие эндоспор в клетках и тип спорообразования определяют путем простого или дифференциального окрашивания (см. т. 1, подпараграф 2.2.4). Для **окрашивания по Граму** на обезжиренном предметном стекле в каплях воды делают мазки трех микроорганизмов: в центре готовят мазок клеток исследуемой бактерии, а слева и справа — контрольных бактерий, заведомо грам-

положительной, например, *Micrococcus luteus*, и заведомо грамотрицательной, например, *Escherichia coli*. Приготавливают тонкие и негустые мазки, с равномерно распределенными клетками. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1–2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым. Затем краситель сливают и мазки обрабатывают 1–2 мин раствором Люголя до почернения. Сливают раствор Люголя, препарат обесцвечивают 0,5–1,0 мин 96%-м этиловым спиртом, быстро промывают водой и дополнительно окрашивают 1–2 мин водным фуксином. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый, а грамотрицательные — розово-красный цвет. Для получения достоверных результатов необходимо готовить мазки для окраски по Граму из молодых, активно растущих (обычно односточных) культур, так как клетки из старых культур иногда дают неустойчивую реакцию по Граму. Грамотрицательные бактерии могут выглядеть как грамположительные, если мазок получился слишком толстым и густым, и обесцвечивание спиртом не произошло до конца. Грамположительные бактерии могут выглядеть как грамотрицательные, если мазок переобесцвечен спиртом.

Для сравнения и в качестве экспресс-определения можно использовать ускоренный тест для определения грампринадлежности культуры. Для этого исследуемую культуру бактерий с помощью петли переносят с твердой среды на предметное стекло в каплю 3%-го раствора КОН и тщательно перемешивают круговыми движениями зеркальцем петли. Через 10 с петлю поднимают над каплей. Для грамотрицательных бактерий характерно образование слизи ДНК, которая тянется за петлей на 0,5–1,0 см. Образование слизи происходит в результате разрушения клеточных стенок грамотрицательных бактерий и выхода из них нуклеиновых кислот. Если образование слизи не наблюдается, то бактерии относят к грамположительным.

Для **окрашивания на кислотоустойчивость** на обезжиренном предметном стекле в каплях воды готовят два мазка: исследуемой бактерии и заведомо кислотоустойчивых микобактерий (*Mycobacterium flavescens*). Препараты высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На мазки помещают фильтровальную бумагу, заливают препараты карболовым фуксином Циля и 2–3 раза подогревают их до появления паров, держа предметное стекло с помощью пинцета высоко над пламенем горелки. За появлением паров наблюдают, глядя на мазок сбоку, и при их появлении тотчас отставляют препарат в сторону. Дают препаратам остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазки промывают водой. Затем клетки обесцвечивают 5%-м раствором H_2SO_4 . Для этого предметное стекло погружают 2–3 раза в стакан с серной кислотой, не задерживая его в ней. *Важно, чтобы все имеющиеся на предметном стекле мазки погружались в кислоту.* Препарат вновь тщательно промывают водой и докрашивают 3–5 мин метиленовым синим (по Леффлеру). Краску сливают, препарат промывают водой, высушивают и просматривают с иммерсионной системой. При правильном окрашивании кислотоустойчивые клетки имеют красный цвет, а некислотоустойчивые — синий.

Для демонстрации физиолого-биохимических тестов в лабораторной работе выбраны наиболее часто используемые и наглядные, однако для идентификации микроорганизма из конкретной группы могут быть рекомендованы и другие, более специфические тесты. Для определения способности культуры использовать для роста глюкозу применяют жидкую или агаризованную (с 1,5% агара) среду с индикатором, содержащую (г/л): пептон — 5,0; K_2HPO_4 — 1,0; глюкозу — 10,0; бромтимолблау — 2 мл (1,6%-го спиртового раствора), воду дистиллированную, разлитую в пробирки по 8–10 мл. В пробирки с жидкой средой перед стерилизацией помещают заполненные той же средой поплавки (вверх дном). Культуру вносят стерильной петлей в жидкую среду, либо стерильной иглой вертикальным уколом до дна — в столбики агаризованной среды в узких пробирках. Продолжительность культивирования 7 сут. в термостате на 30°C. Рост микроорганизмов или его отсутствие определяют по помутнению среды, росту по уколу, образованию пленки или осадка. Изменение цвета индикатора (бромтимолблау) указывает на образование кислых (пожелтение среды) или щелочных (посинение среды) продуктов метаболизма. Об образовании газа свидетельствует накопление его в поплавке (в жидкой среде) или разрывы и даже поднятие столбика агара (в твердой среде). В качестве контроля используют стерильную незасеянную среду.

Для определения **протеолитической активности** в качестве субстратов используют такие белки, как желатина и казеин. В первом случае производят посев уколом микробиологической иглой вертикально до дна в толще столбика мясо-пептонной желатины (МПЖ), состоящей из МПБ с 10–15% желатины. Через 7–10 сут. инкубации при комнатной температуре отмечают наличие или отсутствие разжижения желатины.

Для выяснения способности микроорганизмов разлагать казеин проводят высев культуры на «молочный агар» (стерильное обезжиренное молоко и 3%-й водный агар в равных объемах) в чашках Петри. Микроорганизмы сеют прямыми штрихами с помощью петли, чашки инкубируют в термостате при 30°C 7 сут. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг выросшего штриха культуры микроорганизмов. Усилить контраст между зоной гидролиза и средой с нетронутым молоком можно, добавив на агар 5%-й раствор трихлоруксусной кислоты. Величина зоны просветления (в мм), измеренная от края штриха культуры, характеризует казеинолитическую активность микроорганизмов.

Для определения **амилолитической активности** культуру сеют петлей прямым штрихом на поверхность агаризованной среды с крахмалом в чашках Петри. Среда содержит (г/л): пептон — 10,0; KH_2PO_4 — 5,0; растворимый крахмал — 2,0; агар — 15,0; pH = 6,8–7,0. Микроорганизмы культивируют 7 сут. в термостате при 30°C. Гидролиз крахмала обнаруживают, заливая поверхность среды с выросшими бактериями 3–5 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если крахмал гидролизировался до декстринов. Величина зоны гидролиза крахмала (в мм), измеренная от края штриха до границы светлой зоны, характеризует амилолитическую активность культуры.

Для выполнения теста на **каталазу** биомассу с помощью петли переносят на сухое предметное стекло и сверху наносят каплю 3%-й перекиси водорода. О наличии каталазы свидетельствует образование пузырьков газа, наблюдаемое через 1—5 мин после соприкосновения бактерий с перекисью невооруженным глазом или с помощью микроскопа при малом увеличении. Можно нанести несколько капель перекиси водорода непосредственно на колонию или штрих культуры, выросшей на скошенном агаре, и наблюдать выделение молекулярного кислорода.

Для проведения теста на **оксидазу** несколько капель 1%-го свежеприготовленного раствора солянокислого тетраметил-*n*-фенилендиамина наносят на отрезок фильтровальной бумаги. Клетки суточной культуры микроорганизма распределяют петлей по поверхности этого влажного отрезка бумаги. При положительной реакции через 10—20 с развивается фиолетовая или пурпурная окраска. Можно также воспользоваться готовыми тестовыми полосками.

Результаты всех тестов вносят в табл. 10.1 и используют при работе с определителем.

Глава 11

ПОВСЕМЕСТНОЕ РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- принципы распределения микроорганизмов в живой природе;

уметь

- объяснить понятия экологических ниш;

владеть

- приемами создания различных условий для роста микроорганизмов в лаборатории.
-

Микроорганизмы — это обширная группа живых существ, повсеместно распространенных на нашей планете. В зависимости от набора условий существования микробное население конкретного места обитания может отличаться большим или меньшим разнообразием, давать обильный или скудный рост. Представители мира микробов обнаружены даже в таких зонах, в которых не способны развиваться высшие организмы.

11.1. Основные среды обитания микроорганизмов

11.1.1. Почва

Важнейшей земной экосистемой является почва. **Почву** определяют как поверхностный слой земли, поддерживающий рост растений. В почвенной микробиологии экосистему почвы считают продуктом сложных взаимоотношений между химическими и физическими процессами, происходящими в чрезвычайно гетерогенной среде с меняющимися условиями, и живыми существами, представляющими почти все формы жизни. Биологическое сообщество почвы распространяется на весь спектр химических и физических условий, в рамках которых может существовать и функционировать жизнь.

В почвах преобладает твердая фаза, и большинство почв является преимущественно аэробными. Почвы образуются в широком спектре климатических условий и зависят от изменений температуры и влажности. Свойства почвы чрезвычайно разнообразны. Их современная классификация, применяемая, например, в США, насчитывает 12 порядков, каждый из которых включает подпорядки, большие группы, подгруппы, семейства и серии. Всего идентифицировано 15 тыс. серий. В одном месте могут встречаться разные типы почв, а биологическая активность внутри почвы

одной серии может варьировать в зависимости от типа и распространенности растений, климатических условий и обработки почвы — текущей и предыдущей.

Взгляды на почву с течением времени эволюционировали. Сначала почву рассматривали как некую косную субстанцию, состоящую из органо-минеральных частиц и являющуюся инертным субстратом для существования растений и животных. Позднее основной функцией почвы стали считать ее плодородие, обеспечивающее урожай растений. Понимание и признание огромной роли почвенных микроорганизмов как существенной и активной части почвенной экосистемы привело к концепции почвы как гетерогенной системы, состоящей из множества локусов разного масштаба с разными вариантами условий окружающей среды, позволяющими развиваться самым разнообразным группам живых организмов. В связи с этим одной из основных функций почвы теперь считают хранение и поддержание биоразнообразия на Земле. Участие почвенных микроорганизмов в биогеохимических превращениях основных элементов оказывает влияние на развитие и функционирование других экосистем и всей планеты в целом и приводит к концепции почвы как открытой системы, обеспечивающей взаимодействие и устойчивый обмен веществом и энергией между всеми компонентами биосферы. Почва, с одной стороны, сама является результатом действия комплекса физико-химических и биологических факторов, а с другой — обладает полифункциональностью, открытостью и способностью к самоорганизации и поддерживает постоянный циклический процесс воспроизводства жизни на Земле.

Органические компоненты почвы накопились и продолжают аккумуляроваться в настоящее время за счет роста и репродукции фототрофных организмов. Основные продуценты в почвенных экосистемах — это растения, хотя водоросли, цианобактерии и хемолитотрофные бактерии также вносят свой небольшой вклад в этот процесс. Плодородие почвы, т.е. ее способность поддерживать рост растений, зависит не только от химического состава почвы, но в значительной мере определяется метаболической активностью почвенных микроорганизмов. Разрушение органического вещества почвы под действием разнообразных групп бактерий и грибов приводит к превращению малорастворимых биополимеров в более растворимые формы. Дальнейшая конверсия мономеров в неорганические ионы сопровождается сукцессией почвенных микробных популяций. При этом последовательно образующиеся субстраты выступают как источник энергии, углерода и других биогенных элементов для роста и развития микроорганизмов, участвующих в процессах разрушения органического материала почвы. Деградация может происходить как в присутствии, так и при отсутствии кислорода, причем в анаэробных условиях в процессе участвуют как микроорганизмы-броуидильщики, так и анаэробно дышащие группы. Органические продукты брожения могут мигрировать в аэробные местообитания, где будут подвергаться окислению и поддерживать рост аэробных бактерий, архей и грибов. Анаэробное дыхание — это один из способов получения энергии для ряда гетеротрофных бактерий, архей и, возможно, некоторых грибов и простейших, сопровождающийся раз-

рушением почвенной органики. Образующиеся неорганические вещества потребляются хемолитоавтотрофными микроорганизмами, которые продуцируют новую биомассу. Микробная масса почвенных микроорганизмов также подвергается разрушению, являясь важным источником питательных веществ для множества других обитателей почвы. В почвах формируются уникальные местообитания для многих организмов (бактерий, грибов, простейших, водорослей, насекомых, нематод, мелких животных). Все эти организмы необходимы для формирования и поддержания почвы.

Ряд органических компонентов почвы разрушается крайне медленно и, как правило, не поддается полной минерализации. За счет медленного и неполного разложения лигнина и микробных клеточных стенок формируется важная органическая фракция почвы — **гумус**, характеризующийся низкой растворимостью и наличием ароматических химических группировок в молекуле. Органическое вещество, постоянно прибавляющееся в виде растительных и животных остатков, постепенно трансформируется почвенными микроорганизмами в стабильный, богатый питательными веществами гумус.

Почвы содержат множество поверхностей, которые влияют на доступность питательных веществ и взаимодействия групп микроорганизмов. Почвы состоят из песка, глины, ила и гумуса. Все эти компоненты формируют гетерогенные агрегаты разного размера, или **почвенные частицы**, которые пронизаны сложной сетью пор. Различный размер пор делает их в разной степени доступными для использования и колонизации. На рис. 11.1 представлено типичное распределение микроорганизмов в почве.

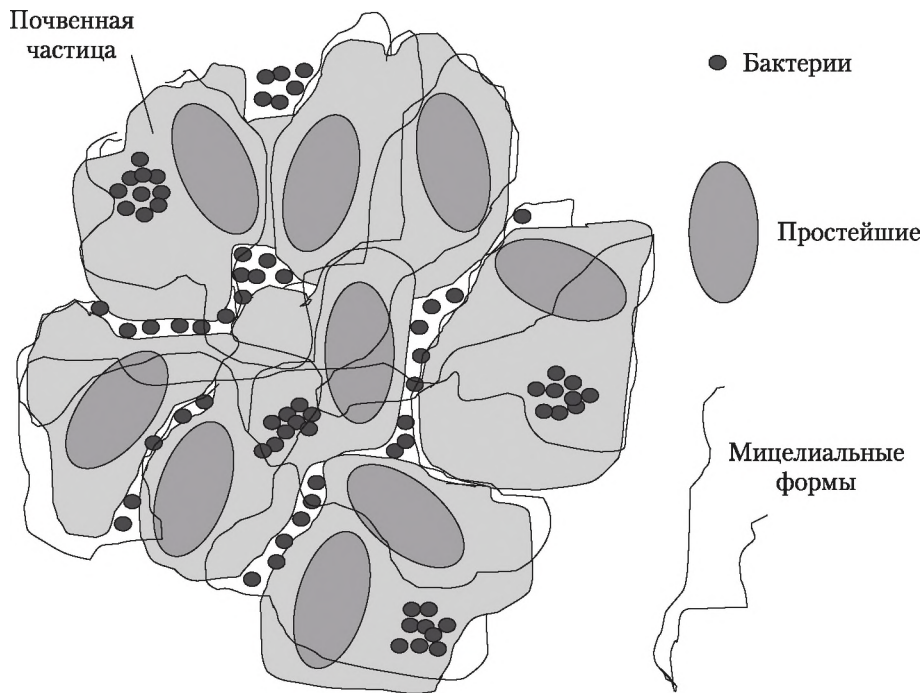


Рис. 11.1. Типичное распределение групп микроорганизмов в почве

Бактерии имеют тенденцию присутствовать в виде микроколоний (2–20 клеток) на поверхности почвенных частиц или в виде суспензии в почвенном растворе в порах. Многие образуют споры или иные покоящиеся формы. Нитчатые грибы и мицелиальные формы прокариот способны расти на почвенных агрегатах, оплетая их и связывая между собой. В то же время, внедряясь между почвенными агрегатами, гифы могут способствовать их разобщению. Простейшие обитают в водной пленке и поедают бактерии. Бактерии и грибы используют разные функциональные стратегии, чтобы получить преимущества в этом физически сложном матриксе. Большинство бактерий локализовано на поверхности почвенных частиц, и им необходимо, чтобы вода и питательные вещества располагались в непосредственной близости. Часто бактерии встречаются внутри маленьких пор (2–6 мкм в диаметре), где у них больше вероятности не быть съеденными простейшими. Мицелиальные формы микроорганизмов, напротив, стремятся расположиться на внешней поверхности агрегатов. Эти организмы могут формировать мостики между отдельными участками, добираясь туда, где влага более доступна. Таким образом, мицелиальные формы могут «продвигаться» на большие расстояния за водой и питанием.

Из-за ограниченной диффузии газов внутрь этих агрегатов и наружу из них, а также из-за обводненности пространства между агрегатами в микрозонах могут возникать значительные градиенты концентраций газов и растворенных веществ. В почвах, по сравнению с атмосферой, заметно более высокие концентрации CO_2 , CO и других газов и пониженное содержание кислорода, иногда с образованием анаэробных микрозон. Если пройдет дождь, то почва может быстро превратиться из аэробного местообитания с несколькими отдельными анаэробными микронишами в преимущественно анаэробную среду, особенно с увеличением глубины.

При нейтральном pH большинство твердых компонентов почвы, включая микроорганизмы, заряжены отрицательно. Положительно заряженные ионы (например, H^+ и ион аммония) притягиваются к отрицательно заряженным поверхностям. Частицы глины и гумус, содержащий полуразрушенный и стабилизированный органический материал, также притягивают и связывают разнообразные органические и неорганические вещества (например, ионы металлов и продукты частичной деградации пестицидов).

Распределение микроорганизмов по почвенному профилю связано с изменением концентрации органического материала и значений физико-химических факторов с глубиной. В большинстве почв высокое содержание органики наблюдается в поверхностных слоях, а с увеличением глубины возрастает количество глины. Обычно плотность микробной популяции снижается от поверхности вглубь из-за уменьшения содержания органического углерода и молекулярного кислорода. Участки почвы вокруг корней растений характеризуются более высокими плотностями микробных популяций, высокими значениями микробной биомассы и более значительным уровнем общей микробной активности. Окислительно-восстановительные условия и доступность тех или иных акцепторов электронов в значительной степени определяют, какие группы микроорганизмов будут обитать в данной почве.

Почвенные микроорганизмы в целом способны существовать при самых различных сочетаниях и разбросах значений физико-химических факторов: от сухих почв до насыщенных влагой, в соленых почвах, при значительных колебаниях почвенной температуры и pH. Микроорганизмы способны использовать нерастворимые соединения. В то же время ряд веществ в почве, токсичных для некоторых групп микроорганизмов (тяжелые металлы, сероводород, органические кислоты, антибиотики, пестициды и другие антропогенные субстанции и загрязнения), успешно утилизируются другими членами микробного сообщества в качестве источника углерода и энергии. Так, почвенные мицелиальные микроорганизмы способны разрушать широкий спектр соединений, включая лигноцеллюлозу, кератин, хитин, углеводороды и труднорастворяемые ксенобиотики, а родококки могут использовать замещенные ароматические вещества и линейные углеводороды. Однако скорость природной микробной деструкции далеко не всегда позволяет быстро избавиться от загрязнителя, что приводит к длительному присутствию ксенобиотика или его интермедиатов в природных экосистемах, распространению их в пространстве и негативному воздействию на окружающую среду.

По современным представлениям в настоящее время удастся культивировать только около 1–10% почвенных микроорганизмов. Некультивируемые формы можно выявлять с помощью молекулярно-биологических методов, экстрагируя микробную ДНК и амплифицируя ее в полимеразных цепных реакциях с последующим определением последовательности нуклеотидов в гене, кодирующем 16S рРНК.

Почвенными считают микроорганизмы, которые хотя бы часть своего жизненного цикла проводят в почве. Это представители всех трех филогенетических доменов *Bacteria*, *Archaea* и *Eukarya*. Почвенные бактерии и грибы — это две наиболее обширные как по биомассе, так и по численности группы. Археи, включая метаногенов, экстремальных галофилов и экстремальных термофилов, также представлены, но их значение в почвах, не характеризующихся экстремальными параметрами и не подвергнутых избыточному обводнению, плохо изучено. На заливных почвах возрастает роль фототрофных бактерий и зеленых водорослей. Многие микроорганизмы в почвах находятся в метаболически инертном состоянии, однако при возникновении благоприятных условий их активность может существенно повышаться. Вирусы, которые являются облигатными внутриклеточными паразитами многих почвенных обитателей, могут персистировать в почве годами. В микробной популяции почвы они часто играют регулируемую роль. Наиболее обычными почвенными обитателями являются представители родов *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Xanthomonas*. Актинобактерии, многие из которых имеют мицелиальную форму, широко распространены в сухих почвах, при нейтральных или щелочных pH. Грибы отличаются менее разнообразными метаболическими возможностями — большинство является хемоорганогетеротрофами. В почве идентифицировано более 70 тыс. видов грибов: это представители оомицетов, хитри-

диевых, зиго-, аско- и базидиомицетов. Члены первых трех групп быстро колонизируют органический материал, попадающий в почву. Хитридиевые обнаруживаются во влажных почвах и включают паразитов животных и растений. Зигомицеты, в основном, являются эндомикоризными грибами. Базидиомицеты — это медленно растущие грибы, участвующие в эктомикоризе и обладающие способностью разрушать лигнин.

Почвенные микроорганизмы рассматриваются также с точки зрения их метаболических возможностей. Органотрофы могут метаболизировать широкий спектр природных и антропогенных органических соединений. Восстановленные формы большого числа неорганических элементов служат источником энергии для разных групп хемолитотрофных бактерий. Фототрофы используют для этих целей световую энергию. В почвах представлены авто- и гетеротрофные микроорганизмы, характеризующиеся и бродильным, и дыхательным метаболизмом с использованием разных конечных акцепторов электронов. Наиболее важные процессы, происходящие в почве при участии микроорганизмов, — это газообмен, осуществление биогеохимических циклов элементов, иммобилизация элементов, биodeградация загрязняющих веществ. Микробиота почвы является важным регулирующим фактором состава земной атмосферы, так как в результате ее метаболизма как образуются, так и потребляются различные газы. Ассимиляция неорганических форм элементов в клетках микроорганизмов в процессе их жизнедеятельности (иммобилизация) приводит к обеднению неорганического пула почвы и существенно ограничивает рост растений. Высвобождение доступных растениям форм элементов происходит при лизисе микробных клеток или при поедании их простейшими.

Почвы формируются в различных условиях окружающей среды. Там, где происходит выветривание нового геологического материала либо после извержения, либо после землетрясения, начинается колонизация его микроорганизмами. Пионерами здесь являются цианобактерии, способные к фотосинтезу и азотфиксации. Большую роль в формировании и функционировании почв играют грамположительные актинобактерии, имеющие разную степень ветвления и развития мицелия. Характерный почвенный запах зависит от выделяемого ими вещества геосмина. Эти группы играют важную роль в расщеплении углеводов, ископаемых растительных материалов и почвенного гумуса. Формирование того или иного типа почвы зависит от сдвига равновесия между образованием и разрушением органического материала. На него влияют такие факторы, как температура, влажность и другие климатические условия, материнская порода, состав растений и микроорганизмов. Например, во влажных тропических почвах, где более высокие температуры, органическое вещество быстро расщепляется, и подвижные неорганические питательные вещества могут выщелачиваться с поверхности, вызывая быструю потерю плодородия. Чтобы ограничить эти потери, многие тропические растения имеют корневую систему, которая проникает в быстро разрушающуюся подстилку, тем самым улавливая освобождающиеся питательные вещества. В более умеренных регионах, наоборот, скорости разложения медленнее, чем первичной продукции, что приводит к накоплению опада. Глубокое проникновение корней рас-

тений ведет к формированию плодородия почвы. В холодных зонах зимой влага доступна, но почва охлаждена, и это ограничивает разложение органики. Летом, когда почва теплая, наблюдается недостаток влаги. Органические кислоты образуются в холодном, мокром слое опада и вымываются в нижележащие слои. Они растворяют почвенные компоненты (например, соединения алюминия и железа), образуя иногда обесцвеченные зоны. Подстилка продолжает накапливаться, и нередко инструментом, возвращающим питательные вещества в глобальные циклы, становится огонь (лесной пожар). Болотистая почва представляет собой уникальный набор условий для микробного роста. Здесь скорость разложения снижена переувлажненностью и преобладанием неокислительных условий, что приводит к формированию торфа. Если такую область дренировать, она становится более аэробной, органический материал разрушается и уровень почвы опускается. В аэробных условиях лигнин-целлюлозные комплексы запасенного органического материала более успешно разрушаются нитчатыми грибами.

В почвах важны также взаимодействия микроорганизмов с растениями, формирование ризосферы, микоризы, клубеньков на корнях и стеблях и т.д.

Почвенные микроорганизмы оказывают положительное влияние на атмосферу, разрушая воздушные «загрязнители» такие, как метан, водород, СО, бензол, трихлорэтилен, формальдегид. Почвенные микроорганизмы влияют на глобальное содержание разных газов. Относительно стабильные газы (CO_2 , NO, N_2O , метан) называют **парниковыми газами**, так как они отражают тепловые лучи, не позволяя теплу уходить от поверхности земли, и вызывают глобальное потепление. Метан может потребляться метанотрофами, обитающими в почве и воде. Критическим фактором, влияющим на потребление метана почвой, является концентрация иона аммония. При увеличении содержания аммония в почве из-за сельскохозяйственной деятельности или вследствие загрязнения потребление метана снижается. Таким образом, почвенные и водные метанотрофы могут рассматриваться как своеобразный **бактериальный газовый фильтр**. Из «экзотических» явлений можно отметить способность *Pseudomonas syringae* синтезировать белок, который служит ядром формирования льда на поверхности листьев и снега в грозовых тучах. Такой снегоформирующий почвенный микроорганизм может влиять на погоду в глобальном масштабе.

Обработка почвы оказывает существенное влияние на жизнедеятельность почвенных организмов, прежде всего бактерий и грибов. После вспашки вследствие увеличения аэрации почвы и внесения дополнительного органического вещества (остатков растений) резко возрастает активность микроорганизмов в горизонтах почвы на глубину плуга. Бициды и химикаты, используемые для защиты растений, действуют (временно) и на микробную популяцию почвы. Наиболее чувствительной к химикатам группой микроорганизмов являются нитрификаторы. После обработки фунгицидами грибы, составляющие большую часть почвенной биомассы, отмирают, поставляя в почву значительное количество мертвого органиче-

ского вещества, пригодного для питания выживших почвенных микроорганизмов (бактерий), что в конечном итоге приводит к усилению почвенного дыхания. Внесение минеральных удобрений резко изменяет локальную концентрацию солей в части почвы. При благоприятных значениях физико-химических факторов происходят общее увеличение численности почвенной микробиоты и активизация микробного метаболизма. Однако высокая концентрация солей может приводить к солевому стрессу и росту химической токсичности. При повышении концентрации NH_3 резко снижается активность процесса азотфиксации. Наоборот, внесение соединений фосфора и калия в виде минеральных удобрений активизирует деятельность диазотрофов и так опосредованно обогащает почву связанным азотом.

При использовании в качестве минеральных удобрений физиологически кислых солей происходит угнетение актинобактерий и усиление роста грибов в почве. Одновременно снижение pH может стимулировать химическое высвобождение соединений тяжелых металлов (например, алюминия), токсичных для почвенной микробиоты. Наличие минеральных форм элементов (азота) благоприятно сказывается на процессах конверсии трудноразлагаемых растительных остатков в гумус, что повышает плодородие почвы. В хорошо аэрируемых почвах внесенный в почву аммоний превращается микроорганизмами в нитрат, который быстро вымывается из почвы в подпочвенные горизонты и может попадать в источники питьевой воды. Внесение в почву с высоким значением pH элементарной серы («серного цвета») стимулирует развитие эндогенной сероокисляющей микробиоты, которая быстро окисляет серу до иона сульфата, приводя к эффективному снижению pH щелочных почв. Большинство микроудобрений интенсифицирует метаболизм почвенных микроорганизмов, для которых микроэлементы являются кофакторами ферментов. При проведении агротехнических работ следует учитывать активность и в ряде случаев направленность микробных процессов, которые проводят разные группы эндогенных (аллохтонных) микроорганизмов, находящихся в почве и достигающих высокой численности при наличии значительного содержания питательных веществ. Так, при одновременном внесении органического вещества (навоза) и нитратных удобрений даже в хорошо аэрируемых почвах немедленно активизируется процесс анаэробного нитратного дыхания, приводящего к почти полному исчезновению нитрата из почвы в виде газообразного азота.

Микроорганизмы обнаруживаются также на значительной глубине в подпочвенном грунте и даже в толще горных пород. Микробный метаболизм здесь основан на использовании глубинных газов (метана, водорода, угарного и углекислого газов), соединений серы и захороненных органических веществ. Микроорганизмы на глубине 4–7 км физиологически активны, не зависят от продуктов фотосинтеза и способны осуществлять разнообразные реакции обмена веществ.

11.1.2. Водоемы

Вода — это естественное место обитания микроорганизмов, где они могут находиться как в физиологически активном состоянии, так и в виде

покоящихся форм. Водоемы различаются по содержанию органического вещества, концентрации минеральных солей и растворенных газов, pH, температуре, освещенности, мощности и структуре донных отложений и т.д. **Автохтонное органическое вещество** образуется непосредственно в водоеме, а **аллохтонная** органика попадает в него извне. По уровню первичной продукции водоемы делятся на дистрофные, олиготрофные, мезотрофные и евтрофные. В олиготрофных и бедных органическим веществом водах присутствуют скользящие и простековые микроорганизмы, способные прикрепляться к мелким частицам доступного субстрата, обрастать их, образуя тем самым хлопья (флоки).

Водные микроорганизмы осуществляют в водоемах замкнутые циклы основных элементов, так как в микробных сообществах представлены и первичные продуценты органического вещества (эу- и прокариотические фотоавтотрофы и прокариоты-хемоавтотрофы), и консументы (простейшие), и деструкторы (большинство гетеротрофных прокариот и грибов). Водные микроорганизмы присутствуют как в планктоне, так и в бентосе, прикрепляясь к плавающим частицам и обитая в донных осадках. Важнейшие группы прокариот, обитающих в водных экосистемах, представлены в табл. 11.1.

Таблица 11.1

Важнейшие группы прокариот, обитающих в водных экосистемах

Группа	Род
Фотоавтотрофы	<i>Chlorobium</i> <i>Chloroherpeton</i> <i>Chromatium</i> <i>Pelodictyon</i> <i>Thiodictyon</i> <i>Thiopodia</i>
Фотогетеротрофы	<i>Chloroflexus</i> <i>Heliobacterium</i> <i>Heliobacter</i> <i>Rhodocyclus</i> <i>Rhodomicrobium</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhodospirillum</i>
Хемогетеротрофы	<i>Blastobacter</i> <i>Caulobacter</i> <i>Flexibacter</i> <i>Flexithrix</i> <i>Gemmobacter</i> <i>Hyphomicrobium</i> <i>Leucothrix</i> <i>Sphaerotilus</i>
Хемолитоавтотрофы	<i>Beggiatoa</i> <i>Galionella</i> <i>Thioploca</i> <i>Thiothrix</i> <i>Thiovulum</i>

Простейшие представлены фораминиферами и радиоляриями. Среди водорослей преобладают диатомеи.

Отдельные представители микроскопических грибов приспособились к жизни в пресноводных и морских водоемах. Некоторые хитридиевые паразитируют на диатомовых водорослях. Другой важной группой нитчатых грибов являются гифомицеты, образующие под водой четырехлучевые споры. Их прорастание на упавших в воду листьях и проникновение гиф внутрь листа способствует переработке органического материала, который затем потребляется водными личиночными стадиями наземных насекомых. Вылет взрослых форм таких насекомых способствует переносу гиф грибов из их пищеварительного тракта на листья наземных растений.

Наиболее интересным открытием оказалось присутствие в морских местообитаниях большого количества вирусов и архей, причем около 1/3 пикопланктона (клетки < 2 мкм) составляют археи, традиционно приписываемые к экстремальным местообитаниям. В морях обнаружен сверхвысокий уровень ультрамикробактерий (нанобактерий), в основном рода *Sphingomonas*, которые могут проходить через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм. Кроме того, что они обладают поразительной устойчивостью к голоданию, они так малы, что не поедаются даже нанофлагеллятами.

Водоем поделен на множество экологических ниш. В поверхностной зоне преобладают микроорганизмы, обладающие способностью находиться во взвешенном состоянии: клетки, имеющие жгутики, простеки, прикрепительные диски, газовые вакуоли, или организмы малых размеров. Доминирующими формами здесь являются олиготрофы и простекобактерии родов *Hyphomicrobium*, *Planctomyces*, *Blastobacter*, *Pasteuria*, *Caulobacter*, *Asticacaulis*, *Prosthecomicrobium*, *Seliberia*, *Prosthecochloris* и др. и оксигенные фотосинтетики (водоросли и цианобактерии). К типично планктонным бактериям относятся спириллы. Из способов метаболизма преобладают фототрофия, метилотрофия и нитрификация.

Вся толща водной массы в зависимости от градиентов факторов поделена на ряд подзон: подзона фотосинтеза, подзоны продукции биомассы гетеротрофных и хемолитотрофных микроорганизмов, подзона деструкции органического вещества (рис. 11.2, 11.3).

В водоемах с повышенной соленостью наблюдается заметная первичная продукция органического вещества за счет хемоавтотрофии. Основная масса органического вещества (как синтезированного в водоеме, так и привнесенного извне) разлагается в аэробной водной толще (до 10 м глубины) и не достигает дна. Миксобактерии, а также представители родов *Flexibacter* и *Cellvibrio* способны лизировать живые клетки цианобактерий и зеленых водорослей. Биополимеры мортмассы микроорганизмов, фитопланктона и высших растений и животных разлагают миксобактерии и члены родов *Sporocytophaga*, *Lysobacter*, *Beneckea*, *Alginomonas*, *Vibrio*, *Cytophaga*.

В поверхностном слое ила обитают прикрепленные или скользящие микроорганизмы. Это микроаэрофильные организмы родов *Flexibacter*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, факультативно анаэробные цитофаги и бациллы, нитчатые бактерии *Pelonema*, *Peloploca*, *Leucothrix*, железобактерии *Metallogenium*, *Hyphomicrobium*, *Seliberia*, зеленые нитчатые бактерии. Анаэробный распад

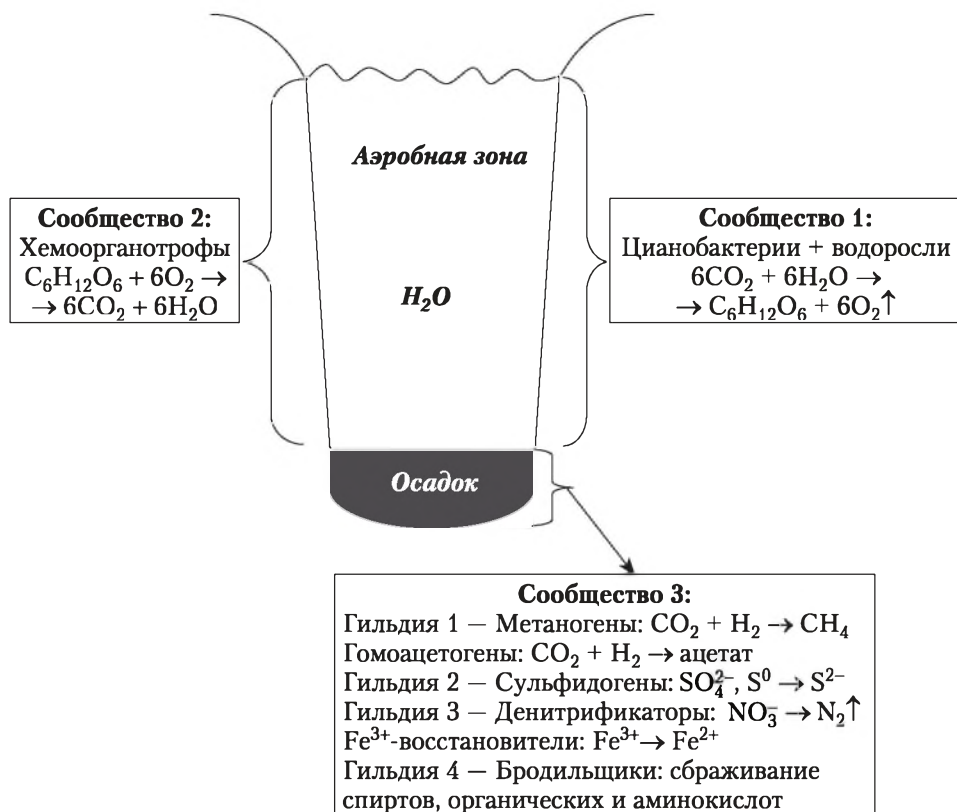


Рис. 11.2. Модель непроточного озера с указанием основных сообществ

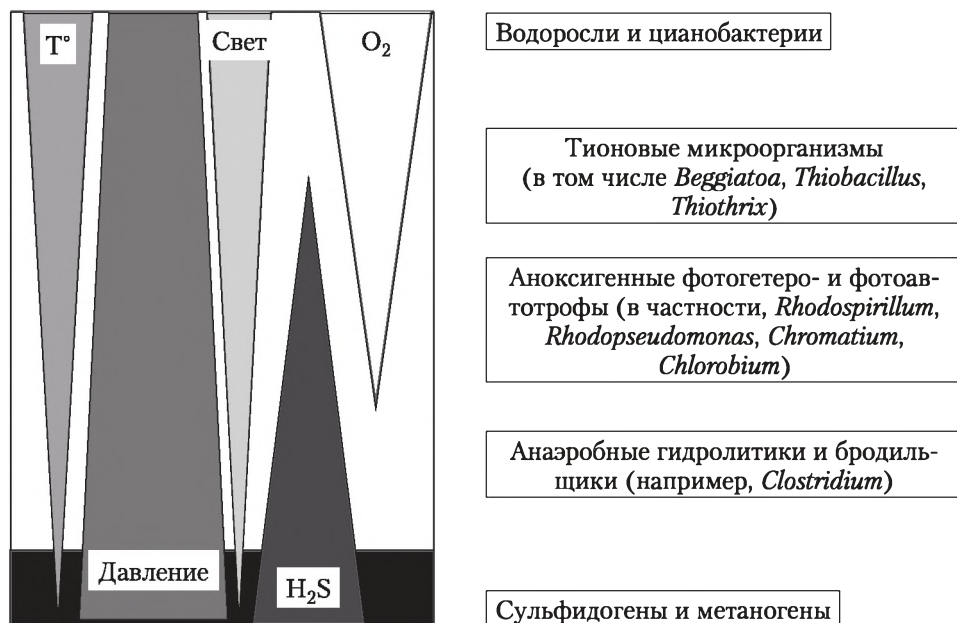


Рис. 11.3. Градиенты основных факторов водной экосистемы и распределение групп микроорганизмов

в приповерхностном слое донных осадков осуществляют клостридии и энтеробактерии. Нижние слои ила составляют сульфатредукторы и метаногены, завершающие анаэробную деструкцию упавших на дно растительных и животных остатков.

11.1.3. Воздух

Воздух как среда обитания микроорганизмов менее благоприятен из-за недостатка влаги и питательных веществ, колебаний температуры и действия ультрафиолетовых излучений. Микроорганизмы попадают в воздух из почвы, с атмосферными осадками, при разговоре, кашле, чихании и слущивании эпителия человека и животных, переносятся насекомыми и птицами. Воздушные потоки поднимают микробные клетки на значительные высоты (более 20 км). Физиологическая активность микроорганизмов в воздухе значительно ниже, многие из них находятся в состоянии покоя. Микробные клетки, в основном, присутствуют на мельчайших взвешенных частицах твердых веществ или жидкостей. В воздухе преобладают представители родов *Bacillus*, *Micrococcus* и споры микроскопических грибов.

11.1.4. Многоклеточные организмы

Микроорганизмы обитают как на поверхностях, так и во внутренних органах высших животных и растений. Отношения, возникающие между макроорганизмом и микробными клетками, основаны как на обмене продуктами метаболизма, так и на предоставлении жизненного пространства. Множество микроорганизмов постоянно присутствуют и размножаются в организме животного или растения, а другие могут проникнуть из окружающей среды. Взаимоотношения макро- и микроорганизмов могут складываться по-разному. Патогенные микроорганизмы наносят существенный вред своим развитием, вызывая инфекционные заболевания, а иногда и гибель организма-хозяина. Напротив, «дружественные» микроорганизмы играют важную роль в жизни животных и растений, снабжая их некоторыми питательными веществами и витаминами и подавляя патогенные формы. Макроорганизмы представляют собой хорошую среду обитания, так как обеспечивают достаточно постоянные условия для роста микроорганизмов. Их прижизненные выделения и отмершие части являются источником питания для микроорганизмов. В ряде случаев многоклеточный организм защищает микробную популяцию от внешних воздействий.

11.2. Способы существования микроорганизмов в среде обитания

11.2.1. Пространственное расположение микробных клеток

Повсеместное распространение микроорганизмов определяется разнообразием их свойств и способов взаимодействия с окружающей средой. Микробные клетки способны быстро размножаться: время генерации большинства прокариот исчисляется 30–40 мин. Микроорганизмы могут использовать в качестве источников углерода и энергии практически

любые вещества. Системы микробной регуляции позволяют эффективно управлять перестройкой метаболизма при изменении условий окружающей среды. Предельные значения физико-химических факторов для микроорганизмов существенно превышают такие показатели для макроорганизмов. Микроорганизмы могут быстро приспосабливаться к условиям окружающей среды, не только реализуя возможности, заложенные в собственном генетическом материале, но и обмениваясь генетической информацией с другими членами микробных сообществ. Возможность занимать определенное положение в пространстве и переживать неблагоприятные условия также способствует адаптации микроорганизмов во внешней среде.

В среде обитания микроорганизмы могут находиться как в свободном (взвешенном в воде), так и в прикрепленном состоянии. В свободном состоянии пребывают, в основном, молодые активно подвижные микроорганизмы в стадии расселения. В природных местообитаниях большинство микроорганизмов предпочитают расти в прикрепленном состоянии, так как на границе раздела фаз концентрация веществ обычно выше из-за их адсорбции. Прикрепление нитчатых форм к твердым поверхностям с образованием **косм** можно наблюдать в текущих водах. При этом один конец нити с помощью специальных структур закрепляется на твердом субстрате, а другой свободно колеблется в текущей воде. Более сложное образование называется **био пленкой**. Формирование биопленки начинается с образования монослоя из клеток одного вида, обладающего высокими адгезивными свойствами. Слизистые выделения этих клеток способствуют прикреплению других микроорганизмов. В зависимости от особенностей обитания микроорганизмов (свет, наличие питательных веществ и скорости диффузии) структура биопленки может усложняться с образованием слоев, представленных различными типами микроорганизмов, микроколоний, погруженных в общий полисахаридный матрикс, и смешанных клеточных агрегатов. Такая сложная пленка развивается как трехмерная структура, компоненты которой связаны внутренними порами и сквозными каналами (рис. 11.4).

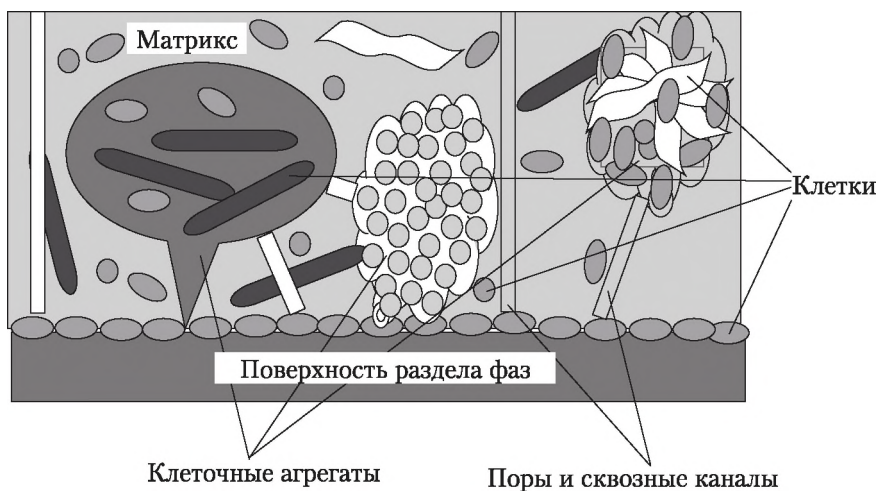
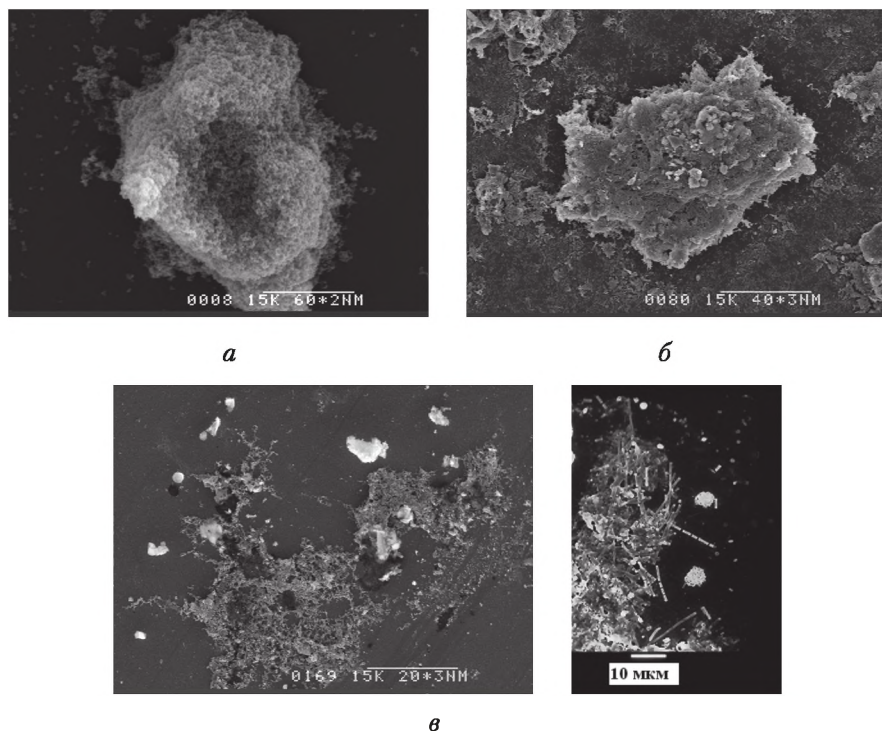


Рис. 11.4. Схематическое изображение сложной трехмерной биопленки

Биопленка может разрастаться до макроскопического размера, образуя микробный мат. Известным «бытовым» примером микробного мата является так называемый «чайный гриб». Основу этого сообщества составляют клетки уксуснокислых бактерий, образующих слизистый полисахарид. В слоях полисахарида располагаются также клетки пекарских дрожжей. Иногда слои микроорганизмов имеют различный цвет, и тогда структура мата видна невооруженным глазом. Такие маты часто формируются на поверхности камней или осадков в сверхсоленых и пресноводных озерах, лагунах, горячих источниках и морских прибрежных областях. В качестве **эдификаторов**, т.е. организмов, формирующих сообщество и определяющих его структуру, часто выступают нитчатые или крупные палочковидные микроорганизмы (нитчатые цианобактерии, тионовые бактерии рода *Beggiatoa*, метаногенные археи родов *Methanosaeta*, *Methanospirillum* и др.). Верхние слои мата, как правило, аэробные, а нижние — бескислородные. Еще одной формой структурной организации является образование **гранул** и **хлопьев** (рис. 11.5) — это модифицированные биопленки, образовавшиеся вокруг неживой микрочастицы или группы клеток. Гранулы представляют собой плотные мелкие агрегаты с четкими контурами, а хлопья имеют рыхлую структуру и могут долго находиться во взвешенном состоянии.



**Рис. 11.5. Агрегаты микробных сообществ
(метод сканирующей электронной микроскопии):**

а — гранула с внутренней полостью; *б* — угловатая гранула, обе из метаногенного ила;
в — хлопья активного ила

Эдификаторами в таких сообществах могут быть длинные палочки и нити, а также крупные кокки, образующие пористую псевдоткань (например, метаногены рода *Methanosarcina*). В виде гранул и хлопьев развиваются сообщества активных аэробных и анаэробных илов очистных сооружений. Исследование структуры таких сложных ассоциаций удобно проводить с помощью конфокального сканирующего лазерного микроскопа, позволяющего послойно (до 1 мкм) получать изображение клеток на разной глубине биопленки. Ее общий объемный вид реконструируют путем компьютерного анализа.

Физическое окружение и поведение свободных и прикрепленных микробных клеток значительно отличаются. Так, в составе агрегатов микроорганизмы находятся в тесном соседстве с клетками других систематических и функциональных групп и погружены в матрикс. **Матрикс** — это продукт жизнедеятельности микробного сообщества, состоящий из поверхностных клеточных структур и экзометаболитов, в основном, полисахаридной природы. Он является средой обитания клеток и выполняет определенные функции в сообществе. Физико-химические условия матрикса отличаются от условий в водных растворах. Матрикс ограничивает поступление из окружающей среды вредных факторов и концентрирует в себе питательные вещества, продукты обмена и сигнальные молекулы. Поступление веществ к клеткам осуществляется не только путем диффузии, но и через каналы и поры в матриксе. В разных частях агрегата, состоящего даже из микроорганизмов одного вида, клетки находятся в различном физиологическом состоянии из-за разницы в притоке питательных веществ. Ограниченность пространства и тесное соседство микробных клеток в составе агрегатов приводят к более быстрому обмену продуктами жизнедеятельности. Матрикс не только пространственно удерживает микробные клетки, но и связывает их между собой. Сохранение формы под действием внешних нагрузок позволяет ему защищать клетки от механических повреждений и «смягчать» колебания физико-химических факторов, обеспечивая стабильное микроокружение. Матрикс способствует дифференциации клеток внутри популяции и может обеспечивать «коллективные» реакции («чувство кворума»). По достижении определенной плотности клеток в ограниченном пространстве матрикса накапливается сигнальное вещество, действующее на все клетки популяции и приводящее к «коллективному» ответу. В сообществе, содержащем несколько видов микроорганизмов, реакции будут значительно более сложными.

11.2.2. Жизненные стратегии микроорганизмов

Стратегия роста — это совокупность реакций организма при взаимодействии с внешней средой. Для выживания организма важны такие показатели, как скорость роста при ограничении доступности питательных веществ, устойчивость к губительному действию внешних факторов и способность поддерживать постоянство внутренних структур. У микроорганизмов различают три типа жизненной стратегии. **r-Стратегия** характеризуется высокими скоростями роста и наличием больших концентраций питательных веществ. С. Н. Виноградский назвал такие микроорганизмы

аллохтонными (или **зимогенными**). Это микробы, быстро заселяющие природное местообитание при большом количестве доступного органического вещества (например, при листопаде). Значительное увеличение их численности наблюдается «всплесками». **К-стратеги** всегда растут медленно, с низкими скоростями роста независимо от количества питательных веществ в среде. К этой группе относятся **автохтонные** микроорганизмы, постоянно присутствующие в природном сообществе и растущие на продуктах медленного разложения труднодоступных соединений (например, гумуса в почве). Обычно копиотрофы растут как *r*-стратеги, а олиготрофы — как *K*-стратеги. Еще один тип стратегии (**L-стратегия**) основан на высокой устойчивости к факторам окружающей среды и способности микроорганизмов выжить в неблагоприятных условиях.

Деление микроорганизмов на гидролитиков и диссипотрофов на основании их способности гидролизовать биополимеры позволило составить представление о саморегуляции системы при разложении органического вещества в цепи гидролитики → копиотрофы → олиготрофы. Первая стадия гидролиза полимеров управляется концентрацией образующихся мономеров по типу обратной связи. Поскольку мономерные соединения образуются в системе быстрее, чем потребляются, синтез экзогидролаз подвергается катаболитной репрессии, и гидролитики переходят в покоящееся состояние. Копиотрофы, использующие *r*-стратегию роста, снижают содержание мономеров в среде и таким образом позволяют развиваться группе олиготрофов, которые и утилизируют остаточное органическое вещество.

11.3. Отношение микроорганизмов к абиотическим факторам внешней среды

11.3.1. Основные понятия

Абиотические факторы составляют совокупность физико-химических условий окружающей среды. Жизнедеятельность любого организма возможна в определенном интервале значений любого из факторов, крайние значения которого являются **пределами толерантности** организма. **Зоной лимитирования** называют область, в которой низкие значения фактора ограничивают его жизнедеятельность. Область значений, в которой жизненные показатели организма наилучшие и практически не меняются, является **оптимальной зоной**. Область избыточных значений фактора, где жизнедеятельность организма подавляется, носит название **зоны ингибирования**. Обычными, или нормальными, считают повсеместно распространенные условия существования. Условия, отличающиеся от нормальных крайними значениями одного или нескольких факторов, называют **экстремальными**, а организмы, живущие в таких условиях, — **экстремофилами**.

Микроорганизмы распространены повсеместно, поэтому условия их жизни чрезвычайно разнообразны. Некоторые из них способны существовать в широких пределах различных факторов, в том числе и там, где другие организмы существовать не могут. Основными абиотическими факторами для микроорганизмов являются активность воды, pH, температура,

гидростатическое давление, электромагнитные излучения, наличие кислорода. Группы микроорганизмов, характеризующиеся широкими пределами толерантности, широко распространены и способны переносить значительные колебания фактора. В то же время есть высокоспециализированные группы микроорганизмов, приспособившиеся в процессе эволюции к существованию в специфических местообитаниях с узкими интервалами изменения фактора. Как правило, в природе микроорганизмы испытывают на себе влияние не одного, а множества факторов сразу, поэтому необходимо учитывать их взаимодействие друг с другом.

11.3.2. Активность воды

Для осуществления метаболизма микроорганизмам необходима вода. Важным количественным показателем ее доступности является активность воды a_w . Она определяется как отношение давления паров раствора к давлению паров чистой воды. Этот показатель зависит как от самого наличия воды, т.е. от степени высушивания, так и от содержания в ней растворенных веществ. Некоторые микроорганизмы столь чувствительны к понижению активности воды, что не могут развиваться и давать колонии даже на агаризованных средах. Другие, называемые **ксерофилами**, предпочитают расти при низких значениях a_w . В табл. 11.2 приведены примеры местообитаний с разными значениями активности воды и характерные для них микроорганизмы.

Таблица 11.2

Микроорганизмы, обитающие в средах с разными значениями активности воды

a_w	Среда обитания	Микроорганизмы
1,000	Чистая вода	Бактерии родов <i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0,995	Кровь человека	Бактерии родов <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i>
0,980	Морская вода	Бактерии родов <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
0,950	Хлеб	Грамположительные палочки
0,900	Копчености, сиропы	Грамположительные кокки
0,800	Фруктовые джемы	Грибы рода <i>Penicillium</i>
0,750	Соленая рыба, соленые озера	Архей родов <i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
0,700—0,600	Кукурузные хлопья, сухофрукты, чай	<i>Xeromyces bisporius</i> и другие ксерофильные грибы

Существуют природные среды, где активность воды может резко меняться в течение суток (пустыни и горы). Там днем сухо, а в ночное время выпадает роса и $a_w \approx 1$.

Высокие концентрации разных солей в природе отмечены в соленых и содовых озерах, солонцах, солеварнях, в Мертвом море. Издавна значитель-

ные концентрации поваренной соли и сахара используются при заготовке продуктов. Микроорганизмы, способные существовать в растворах с высокой концентрацией веществ, называются **осмофилами**. Наиболее изучены среди них **галофилы**, которым необходимо повышенное содержание поваренной соли. Они подразделяются на несколько групп. Галотолерантные микроорганизмы (например, из рода *Streptococcus*) выдерживают до 10% (2,0 М) соли в среде, но предпочитают расти при низкой ее концентрации. Слабогалофильные представители, в частности из рода *Vibrio*, растут при содержании соли от 2 до 5% (0,2–0,5 М). Большинство морских обитателей относится к умеренным галофилам. Интервал солености для них составляет 5–15% (0,5–2,5 М) NaCl. Экстремальные галофилы (например, галоархеи) растут при содержании соли от 15% (2,5–5,2 М) и до насыщения (31%). Негалофильные (пресноводные) микроорганизмы развиваются при содержании соли не более 0,01%, а более высокие концентрации подавляют их рост.

В гипотонических растворах вода будет стремиться по градиенту концентраций растворенных веществ внутрь клетки, и нужно приложить определенную силу (осмотическое давление), чтобы предотвратить поступление воды в клетку. В гипертонических растворах имеет место обратное явление («отсасывание» воды из клеток), вызывающее плазмолиз. Для галофильных микроорганизмов основной проблемой становится удержание воды внутри клетки. Она решается путем синтеза **совместимых растворителей (осмолитов, осмопротекторов)**, метаболически инертных по отношению к клеточному содержимому. Иногда такие вещества образуются в значительных количествах. Например, одноклеточная водоросль *Dunaliella viridis* накапливает до 30% глицерола от массы клетки. Это свойство применяют для промышленного получения глицерола. Разные микроорганизмы образуют осмопротекторы различной природы (сахара, спирты, аминокислоты и более сложные вещества, табл. 11.3, рис. 11.6).

Таблица 11.3

Совместимые растворители, образуемые некоторыми группами микроорганизмов

Группа микроорганизмов	Совместимый растворитель	Минимальная a_w для развития этой группы микроорганизмов
Бактерии-нефототрофы	Глицин-бетаин, пролин (у грамм-положительных видов), глутамат (у грамотрицательных видов)	0,97–0,90
Пресноводные цианобактерии	Сахароза, трегалоза	0,98
Морские цианобактерии	α -гликозил-глицерол	0,92
Морские водоросли	Маннитол, пролин, гликозиды, диметилсульфон–пропионат	0,92
Цианобактерии соленых озер	Глицин-бетаин	0,90–0,75

Группа микроорганизмов	Совместимый растворитель	Минимальная a_w для развития этой группы микроорганизмов
Галофильные аноксигенные фототрофные бактерии рода <i>Ectothiorhodospira</i>	Глицин-бетаин, трегалоза, эктоин	0,90–0,75
Экстремально-галофильные археи	KCl (закачивается внутрь с обменом на NaCl)	0,75
Ксерофильные дрожжи	Глицерол	0,83–0,70
Ксерофильные нитчатые грибы	Глицерол	0,83–0,62

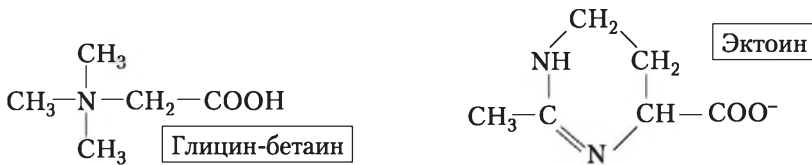


Рис. 11.6. Структурные формулы глицина-бетаина и эктоина

У галофилов выявлены и другие особенности, позволяющие им жить при высоких концентрациях солей. Известно, что многие внутриклеточные компоненты этих микроорганизмов нуждаются в высоких концентрациях Na^+ и K^+ . Белки галофилов отличаются повышенным содержанием аспартата и глутамата, т.е. они более «кислые». За счет гидрофобных взаимодействий они упакованы в более плотные глобулы. На поверхности клеток, как правило, находятся S-слои, служащие «белковым щитом». Экспонированные наружу COOH -группы аминокислот «белкового щита» удерживают ионы Na^+ , а также формируют «гидратированную» оболочку клеток за счет электростатического ориентирования диполей воды. Некоторые галофилы могут с помощью механизмов активного транспорта выбрасывать ионы Na^+ из клетки или заменять их на K^+ , таким образом, поддерживая некоторый «осмостаз» (табл. 11.4).

Таблица 11.4

Концентрации некоторых ионов внутри и вне клеток галофильных микроорганизмов (на примере *Halobacterium cutirubrum*)

Ион	Концентрация (М)	
	в среде	в клетке
Na^+	3,30	0,80
K^+	0,05	5,30
Mg^{2+}	0,13	0,12
Cl^-	3,30	3,30

Способность совместимых растворителей хорошо удерживать воду находит применение в косметической промышленности — их включают в состав увлажняющих кремов. Например, эктоин для этих целей может быть получен в значительных количествах при выращивании галофильных аноксигенных фототрофов на простой и дешевой среде.

Необходимо заметить, что часто невозможно разграничить эффекты, вызванные собственно снижением влажности и наличием высокой концентрации растворенных веществ, так как эти факторы взаимосвязаны.

11.3.3. Показатель кислотности среды (pH)

Значение pH среды рассчитывают как отрицательный логарифм концентрации ионов водорода. Теоретически оно может быть от 0 до 14. Концентрация водородных ионов воздействует на ионное состояние вещества и, следовательно, на доступность для клетки многих метаболитов, так как в незаряженном состоянии они легче проникают через мембрану. В табл. 11.5 указаны микроорганизмы, обитающие в средах с разными значениями pH.

Таблица 11.5

Распределение групп микроорганизмов в соответствии с кислотностью среды их обитания

Субстрат	pH	Микроорганизмы
Вулканические воды и почвы	0,5—1,0	Археи (обычно еще и экстремальные термофилы)
Желудочный сок	1,5	<i>Helicobacter pylori</i>
Шахтные воды	2,0—2,5	Термофильные водоросли, грибы родов <i>Cephalosporium</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , бактерии родов <i>Bacillus</i> , <i>Acidithiobacillus</i> , археи родов <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermoplasma</i> (многие используют восстановленные соединения серы)
Пищевые продукты с высокой кислотностью	2,0—5,0	
Кислая почва	4,0	
Кислотные дожди	5,3	
Слабокислые продукты	5,5—6,5	Большинство микроорганизмов
Чистая вода	7,0	
Морская вода	7,8	
Морские местообитания	7,8	Большинство цианобактерий
Щелочные почвы	8,8	
Щелочные озера	9,0—10,0	
Щелочные местообитания	8,5—10,0	Бактерии родов <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i> , гнилостные бактерии рода <i>Bacillus</i> , пурпурные бактерии рода <i>Ectothiorhodospira</i>
Мыльные растворы	10,5	
Нашатырь	11,0	
Насыщенный раствор извести	12,0	Уробактерии

По отношению к оптимальным для роста значениям рН микроорганизмы условно делят на ацидофильных (0–5,5), нейтрофильных (5,5–7,5) и алкалофильных (7,5–12,0). Большинство грибов и водорослей развивается при пониженных значениях рН, значительная часть цианобактерий относится к алкалофилам, а основная масса бактерий — нейтрофилы. Даже при экстремальных значениях рН окружающей среды внутри клетки поддерживается постоянная кислотность. У растительных клеток реакция цитоплазмы слабокислая (5,0–6,0), у животных $\approx 7,0$. Алкало- и ацидофильные микроорганизмы имеют рН цитоплазмы на уровне $\approx 7,5$. Поддержанию постоянного внутриклеточного рН способствует малая проницаемость ЦПМ для протонов и наличие механизмов их выброса из клетки. При небольшом закислении бактерии используют антипорт протонов с Na^+ и K^+ . При скачкообразном падении рН включается синтез специальных шаперонов (белков «кислотного шока»). Они предотвращают кислотную денатурацию белков и восстанавливают конформацию уже денатурированных белков.

рН-толерантные микроорганизмы могут в определенных пределах изменять рН среды, образуя кислые или щелочные продукты. Например, *E. coli* реагирует на повышение кислотности синтезом дезаминаз аминокислот. Образующиеся в результате амины подщелачивают среду. Наоборот, повышение рН среды стимулирует синтез декарбоксилаз аминокислот, что ведет к подкислению среды. Ярким примером регулирования рН среды бактериями является двухфазный процесс ацетоно-бутилового брожения.

11.3.4. Температура

Физиологическая активность микроорганизмов в значительной степени определяется температурой окружающей среды. Для каждого микроорганизма обычно указывают минимальную, оптимальную и максимальную температуры роста. Кривая зависимости скорости роста от температуры индивидуальна для конкретной микробной культуры. Обычно максимальное и минимальное значения температуры отличаются на 20–30°C. При возрастании температуры на 10°C скорость реакций увеличивается приблизительно в 2–4 раза. При переходе через оптимальную температуру рост существенно замедляется. Предел жизнеспособности микробных клеток определяется наличием жидкой воды. Если с помощью антифризов обеспечить жидкое состояние воды при минусовых температурах, то клетки некоторых микроорганизмов остаются жизнеспособными. Нижние пределы роста по температуре ограничены температурой «застывания» мембраны, когда она теряет свои функции, а верхние — тепловой денатурацией жизненно важных молекул. К низкотемпературным местам обитания относятся регионы Арктики, Антарктики, тундра, глубины океанов, где температура имеет постоянное значение, около +4°C. Высокая температура поддерживается в гейзерах, вулканических источниках, на выходах вулканических горячих газов из разломов земной коры в глубинах океанов, где температура при высоком давлении может достигать +360°C. Существуют и искусственно созданные, экстремальные по температуре места обитания (морозильные камеры, ферментеры, автоклавы и т.д.). Большинство зем-

ных организмов имеет низший температурный предел 0°C. Анализ состава жизненных форм при экстремально низких и высоких температурах показывает, что там преобладают более просто устроенные формы, а из них — прокариоты и нефототрофы.

По отношению к температуре все микроорганизмы условно подразделяются на несколько групп (табл. 11.6, рис. 11.7).

Таблица 11.6

Группы микроорганизмов с разными температурными пределами роста

Группа	Температура роста, °C		
	минимальная	оптимальная	максимальная
Психрофилы	–12	Менее +20	+25
Мезофилы	+15	+25...+37	+40
Термофилы	+40	+55...+65	+70...+80
Экстремальные термофилы	+60	+75...+85	+90
Гипертермофилы	+70	+80...+90	+113...+121

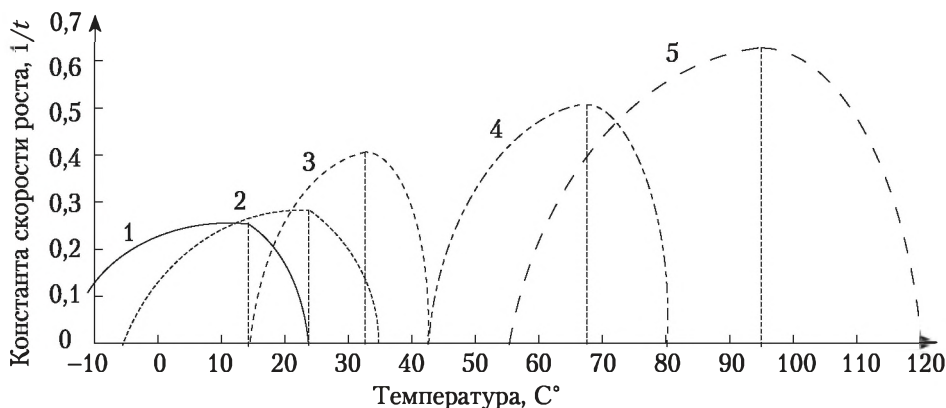


Рис. 11.7. Температурные пределы микробного роста:

1 — психрофилы; 2 — психротрофы; 3 — мезофилы; 4 — термофилы;
5 — экстремальные термофилы

Развивающиеся при умеренных температурах микроорганизмы называются **мезофилами**. Они наиболее широко распространены в природе. К психрофильным микроорганизмам относят представителей родов *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, дрожжей, мицелиальных грибов, некоторых групп водорослей (в Антарктике найдена *Chlamidomonas nivalis*, растущая при –12°C). У таких микроорганизмов обнаружен особый состав мембран с пониженной точкой замерзания. Они содержат больше ненасыщенных жирных кислот, короткоцепочечных и разветвленных и меньше циклических жирных кислот. У **психрофилов** белки теряют стабильность при температуре выше 20°C. Многие способны

синтезировать вещества — криопротекторы, предотвращающие замерзание содержимого клетки при минусовых температурах. Психрофилы живут в местообитаниях с постоянно низкими температурами. Выделяют также особую группу **психроактивных (психротрофных)** микроорганизмов, имеющих мезофильный оптимум роста, но обладающих значительной активностью и при низких температурах (около 0°C). Они обитают в местах со значительными сезонными колебаниями температуры. В быту именно они ответственны за порчу продуктов в бытовых холодильниках. Микроорганизмы-термофилы обнаружены в горячих источниках и саморазогревающихся кучах органического материала. В настоящее время выделены также группы экстремальных термофилов и гипертермофилов, обитающих в районах вулканической деятельности. **Термофильные микроорганизмы** содержат высокотемпературные стабильные белки, в их мембранах больше тугоплавких насыщенных жирных кислот и гликолипидов, нуклеиновые кислоты и рибосомы отличаются высокой термостабильностью. Следует отметить, что температурный предел роста эукариотических микроорганизмов не превышает +70°C, а жизнедеятельность животных и растений не наблюдается выше +50°C. Термофильные микроорганизмы представляют особый интерес для биотехнологии, так как это источник различных термостабильных соединений. При высокотемпературном культивировании уменьшается вероятность заражения, термофилы значительно быстрее растут, причем среди них есть автотрофные микроорганизмы, что позволяет использовать очень простые среды. В качестве примера успешного использования термофильного микроорганизма в биотехнологии можно назвать получение термостабильного фермента *Taq*-полимеразы, с высокой скоростью осуществляющего синтез нуклеиновых кислот. Этот фермент образует растущий при +70°C *Thermus aquaticus*, выделенный из горячего источника Йеллоустонского национального парка. Устойчивость микроорганизмов к низким и высоким температурам ставит вопрос об использовании специальных методов стерилизации и хранения продуктов и материалов.

11.3.5. Гидростатическое давление

Большинство микроорганизмов, живущих на поверхности земли или воды, никогда не подвергаются существенным изменениям давления и растут при давлении ≈ 1 атм. Но есть места, где давление значительно отличается от атмосферного. Повышенное давление в природе наблюдается в глубоких нефтяных скважинах и в глубинных зонах океанов, а в антропогенных системах — в барокамерах и автоклавах. Микроорганизмы, прекращающие рост при повышении давления, называют барочувствительными (пьезочувствительными). К баротолерантным (пьезотолерантным) относят микроорганизмы, растущие при обычном давлении, но способные переносить его повышение до 400 атм. **Барофилы (пьезофилы)** для нормального роста нуждаются в повышенном давлении (до 900 атм). Микроорганизмы, обнаруженные на дне Марианской впадины, где давление достигает 1016 атм, относят к экстремальным барофилам. Данных об их физиологии очень мало, поскольку работа с такими микроорганизмами требует очень

дорогостоящего оборудования для взятия и доставки проб в лабораторию и последующего поддержания культур. При этом необходимо решить проблему сохранения облигатно барофильных представителей при подъеме с глубины и существенном падении давления и не заразить глубинные пробы микроорганизмами из вышележащих слоев воды.

При повышении гидростатического давления происходит ряд изменений в протекании биологических процессов. Замедляются реакции, приводящие к увеличению объема (например, брожения с образованием газообразных продуктов). Наоборот, усиливаются реакции поглощения газов. Химические равновесия сдвигаются в сторону субстратов реакции. При повышенном давлении происходят денатурация биологических полимеров и диссоциация сложных агрегатов в клетках. Клетки после деления не расходятся и образуют длинные филаменты. При повышении давления выше 1 атм лопаются газовые вакуоли, определяющие плавучесть водных микроорганизмов. Обмен веществ у прокариот в таких условиях направлен, в основном, на получение энергии, а процессы образования новых клеточных структур значительно замедлены. Обнаружено, что скорость размножения экстремальных барофилов в десятки раз меньше, чем у барочувствительных микроорганизмов.

Самое высокое искусственно созданное давление, при котором еще сохраняются микроорганизмы, — это 1400 атм. Дальнейшее его повышение ведет к деструкции органических молекул. В то же время споры микроорганизмов могут выдерживать глубокий вакуум (10^{-10} – 10^{-12} атм). Для *Bacillus cereus* и *E. coli* показано, что они лучше растут при давлении ниже атмосферного.

11.3.6. Электромагнитные излучения

Электромагнитные излучения подразделяются в зависимости от длины волны на ионизирующее и ультрафиолетовое излучения, видимую область, инфракрасное излучение и радиоволны (рис. 11.8).

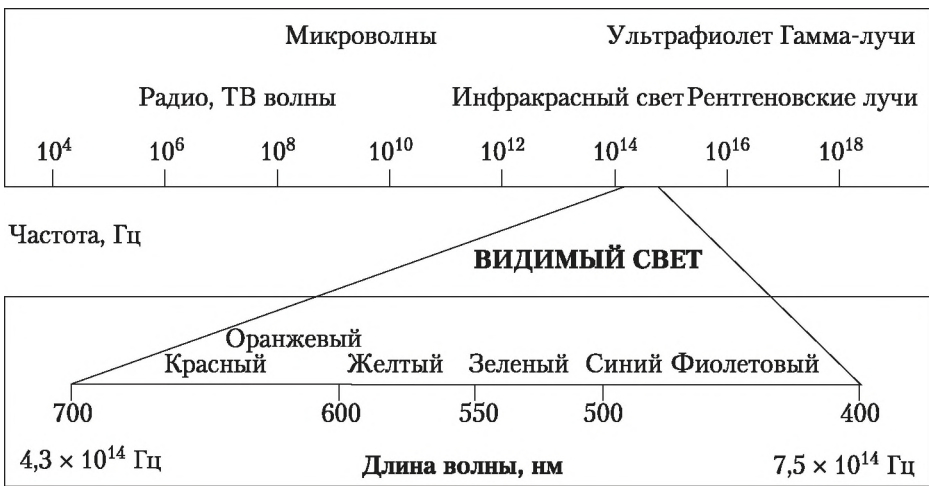


Рис. 11.8. Спектр электромагнитных излучений

В зависимости от длины волны и дозы излучения могут оказывать тепловое, механическое, физиологическое действие, вызывать мутации и гибель клеток. Ближний ультрафиолет, видимый свет и инфракрасные лучи являются движущей силой фотосинтеза. Разные фототрофные микроорганизмы поглощают свет различной длины волны в соответствии с максимумами поглощения их пигментов (350—400—800—1100 нм). Поскольку при **фотосинтезе** световая энергия преобразуется в энергию химических связей, то энергии излучения должно хватать на возбуждение молекулы фотосинтетического пигмента, но при этом она не должна быть избыточной, чтобы не повредить фотосинтетический аппарат. Электромагнитные волны важны для проявления фототаксиса. У некоторых микроорганизмов, не способных к фотосинтезу, обнаружены светозависимые синтезы. Например, микобактерии при росте в освещенном месте формируют колонии, окрашенные в яркие желто-красные цвета из-за синтеза каротиноидов.

Свет таких длин волн не всегда оказывает положительное действие. Под действием инфракрасных лучей может происходить перегрев клетки, а видимый свет в аэробных условиях приводит к образованию синглетного кислорода, повреждающего клеточные ферменты. Ультрафиолет в зависимости от длины волны и дозы может вызывать как летальный, так и мутагенный эффект у микроорганизмов. При этом наблюдается повреждение, прежде всего, молекул ДНК (особенно при 260 нм). В молекуле возникают тиминовые димеры, ингибирующие репликацию. Эти повреждения могут быть устранены двумя путями: фотореактивацией и темновой репарацией. При **фотореактивации** на поврежденное место «садится» фермент, активируемый синим (видимым) светом, и исправляет структуру ДНК, расщепляя тиминовые димеры. В случае **темновой репарации** свет не требуется. Ферментный комплекс, содержащий эндонуклеазу, полимеразу и лигазу, последовательно вырезает поврежденный участок, синтезирует правильную структуру по комплементарной цепи и сшивает синтезированные последовательности с молекулой ДНК. Воздействие ультрафиолета с длиной волны 325—400 нм приводит, наряду с образованием тиминовых димеров, к разрушению триптофана с образованием токсичных фотопродуктов, которые действуют как химические мутагены.

Ионизирующее излучение представлено очень короткими волнами с высокой энергией. Низкие уровни такого излучения могут вызывать у микроорганизмов мутации, а высокие — почти всегда приводят к гибели. Следствием такого облучения являются разрывы водородных связей, окисление двойных связей, разрушение кольцевых структур, полимеризация некоторых молекул. Присутствие кислорода усиливает эти эффекты, возможно, из-за генерации гидроксил-радикалов ($\text{OH}\cdot$). Но главная причина гибели, конечно, деструкция ДНК.

Микроорганизмы весьма существенно различаются по устойчивости к радиации. Так, для микроорганизмов, выделенных из облученных продуктов и из воды атомных реакторов (*Deinococcus radiodurans*, *Shizosaccharomyces pombe*, жгутикового простейшего *Boda marina*), смертельная доза радиации в десятки тысяч раз превышает дозу для высших организмов. Устойчивость, по-видимому, связана с высокой эффективно-

стью репарационных систем. Однако для большинства микроорганизмов ультрафиолет и ионизирующие излучения в определенных дозах губительны и поэтому могут использоваться для стерилизации. При этом следует помнить о возможности появления устойчивых к облучению форм. В свете этих данных перенесение микроорганизмов (особенно спор) через космическое пространство не кажется таким уж невероятным.

11.3.7. Присутствие молекулярного кислорода

По своему отношению к кислороду микроорганизмы условно делятся на несколько групп. **Облигатные аэробы** нуждаются в молекулярном кислороде для окисления питательных веществ и осуществления аэробного дыхания. Это значительная часть микроорганизмов, живущих на различных поверхностях и в верхних слоях почвы и водоемов (например, *Micrococcus luteus*). При культивировании аэробных микроорганизмов необходимо создать условия доступности молекулярного кислорода, так как его растворимость в воде невелика (при 20°C — 6,2 мл/л). Для этого применяют выращивание в тонком слое среды или обогащение ее кислородом различными способами (перемешивание, барботирование и т.д.).

Среди аэробов выделяют группу микроорганизмов — **микроаэрофилов**, которым кислород необходим, но в концентрации ниже атмосферной (менее 5%). Такие организмы встречаются на границе анаэробной и аэробной зон в естественных местообитаниях. К ним относятся многие тионовые и железоокисляющие бактерии (в том числе, представители родов *Beggiatoa*, *Galionella*), а также пресноводные спироиллы (*Spirillum volutans*).

Факультативные анаэробы способны переключать свой обмен веществ в зависимости от наличия или отсутствия кислорода с аэробного дыхания на анаэробные процессы. Как правило, в присутствии кислорода такие микроорганизмы растут быстрее и накапливают больше биомассы. К факультативным анаэробам относятся *Saccharomyces cerevisiae*, многие энтеробактерии (например, *E. coli*) и бациллы.

Облигатные анаэробы не нуждаются в кислороде для своей жизнедеятельности, более того, в его присутствии происходит угнетение или гибель клеток. В эту группу входят метанобразующие археи, гомоацетогенные бактерии, большинство сульфатредукторов, некоторые грибы и простейшие. При культивировании облигатных анаэробов используют специальные приемы. Кислород удаляют из среды кипячением, сосуды тщательно укупоривают резиновыми пробками с металлическими колпачками, газовую фазу культивационного сосуда заменяют азотом или аргоном. Для удаления следовых количеств кислорода в среду вносят восстановители (например, сульфид натрия и цистеин) и в дальнейшем поддерживают анаэробные условия, исключая попадание кислорода при пересевах.

Группа **аэротолерантных анаэробов** также не использует кислород в метаболизме, однако некоторое количество кислорода в среде не влияет на их жизнедеятельность. В эту группу входят молочнокислые бактерии и некоторые патогенные стрептококки (*Streptococcus pyogenes*).

Все типы отношения к кислороду встречаются среди прокариот и простейших. Грибы, в основном, аэробы, но некоторое количество видов, как правило,

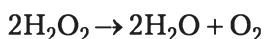
дрожжевые формы — факультативные анаэробы. Есть и небольшое количество строго анаэробных видов. Водоросли — почти всегда облигатные аэробы.

Значение кислорода определяется его ролью как:

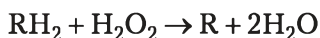
- 1) сильного окислителя для некоторых субстратов, например, метана или ароматических соединений;
- 2) конечного акцептора электронов при осуществлении аэробного дыхания;
- 3) одного из субстратов, например, при синтезе стероидов у дрожжей.

Токсическое действие O_2 на микроорганизмы заключается в инактивации чувствительных к окислению белков (например, сульфгидрильных групп нитрогеназы), а также в образовании сверхактивных производных кислорода. У микроорганизмов имеются определенные пути борьбы с активными формами кислорода. Наиболее часто образующие перекисный анион и супероксидрадикал удаляются специальными ферментами.

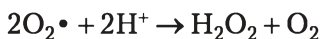
Каталаза разлагает перекись в реакции



а пероксидаза — в реакции



где R — окисленный субстрат пероксидазной реакции. Супероксидрадикал удаляется **супероксиддисмутазой** (СОД):



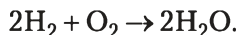
В присутствии света в аэробных условиях может также образовываться синглетный кислород. Возбужденный светом пигмент (фотосенсибилизатор) передает энергию на молекулу кислорода:



Функцию «тушения» синглетного кислорода в клетке выполняют каротиноиды. Именно поэтому нефотосинтезирующие микроорганизмы, растущие на свету, имеют интенсивную желто-оранжевую или красную окраску. Для фототрофов каротиноиды особенно важны, так как пигменты фотосинтеза являются активными фотосенсибилизаторами.

У аэробов и факультативных анаэробов в клетках присутствуют и СОД, и каталаза, и пероксидаза. У многих облигатных анаэробов этих ферментов нет. Однако некоторые метаногены и клостридии содержат каталазу и СОД. Эти ферменты имеют огромное значение при существовании организмов в условиях периодического попадания кислорода в анаэробные места обитания. Например, кислород попадает с пищей в верхнюю часть кишечника термитов, где обитают анаэробные микроорганизмы. При осушении рисовых полей анаэробный ил, в котором обитают метаногены, соприкасается с воздухом. Однако при затоплении и восстановлении анаэробнообразования метана начинается без лаг-фазы, что говорит о способности метаногенов выдерживать какое-то время аэробные условия. Более того, некоторые сульфатредукторы, использующие молекулярный водород, способны активно бороться с кислородом (рис. 11.9). Если к суспензии подвижных анаэробов, помещенной в плоский анаэробный проточный

капилляр Перфильева, добавить пузырек воздуха, то клетки через некоторое время выстраиваются на границе зоны диффузии кислорода, образуя вокруг пузырька воздуха «сферу». Затем клетки поочередно приближаются к пузырьку, разворачиваются и уплывают обратно. Размер пузырька воздуха постепенно уменьшается, как будто клетки активно поглощают кислород. Оказалось, что микроорганизмы в присутствии водорода могут проводить реакцию «гремучего газа»:



Данный процесс получил название «дыхание сульфидогенов».

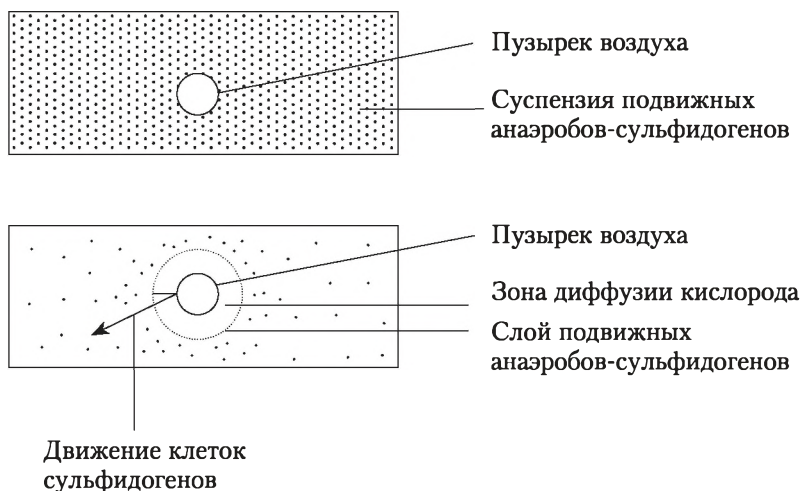


Рис. 11.9. Схематическое изображение опыта по «дыханию сульфидогенов»

Необходимо отметить, что аэробы также обладают некоторыми ферментами, чувствительными к кислороду (например, нитрогеназой). В таких случаях в клетках имеются различные способы их защиты.

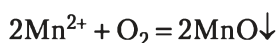
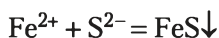
Облигатные анаэробы могут жить и в постоянно аэробных местообитаниях, но в сообществах с аэробными или факультативно анаэробными организмами, которые поглощают O_2 . Это, например, различные биопленки с аэробным верхним и анаэробным нижним слоями, гранулы активного ила, где анаэробные условия создаются во внутренней части. В ротовой полости человека облигатно анаэробный *Bacteroides gingivalis* обитает в прилегающих к зубам участках отложений зубного камня.

Показателем наличия кислорода в среде может служить **окислительно-восстановительный потенциал (ОВП)**, который меняется от -500 до $+800$ мВ. Чем больше его отрицательное значение, тем более восстановлена среда (анаэробные условия).

11.3.8. Микробные местообитания с несколькими экстремальными факторами

В природе микроорганизмы подвергаются действию не одного, а множества факторов сразу. Ярким примером местообитания, сочетающего экстре-

мальные значения нескольких факторов, представляются так называемые **«черные курильщики»** (рис. 11.10). Это разломы на дне океанов, из которых выходят очень горячие (до 400°C) вулканические газы и перегретый водяной пар. Они содержат большое количество сероводорода, водорода и метана, а также ионов двухвалентного железа и марганца. «Черные курильщики» получили свое название из-за клубящегося черного осадка из сульфидов металлов и других нерастворимых соединений, образующихся при соприкосновении с морской водой:



Место выхода газов окружено трубчатым жерлом, сложенным из нерастворимых солей.

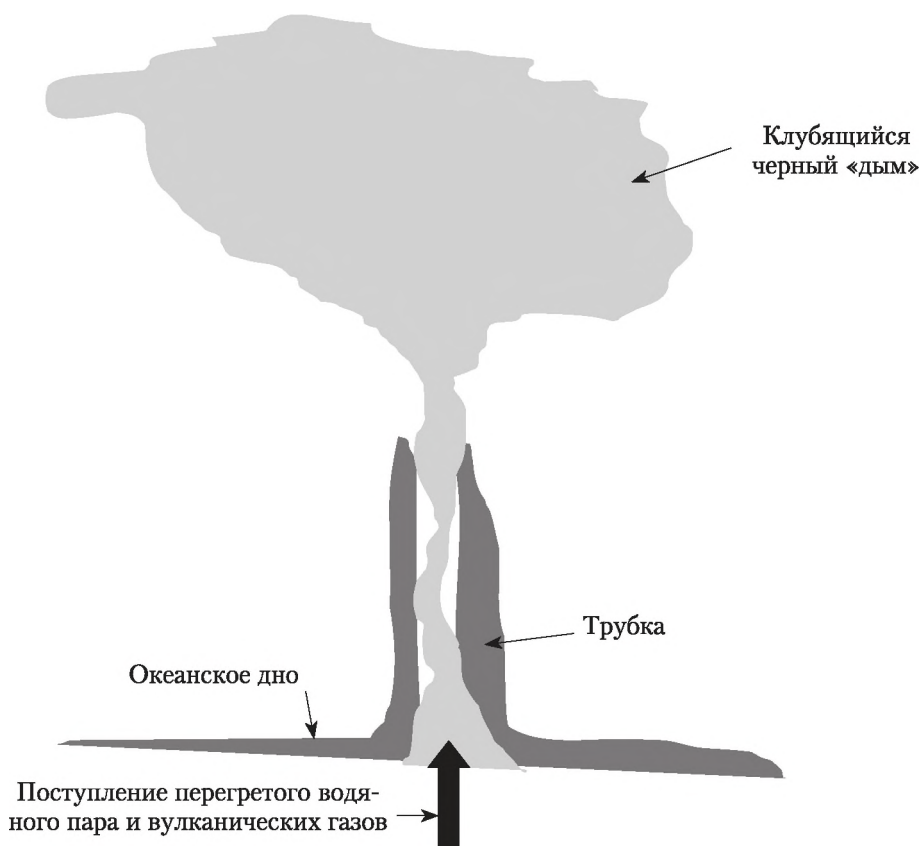


Рис. 11.10. Схематическое изображение «черного курильщика»

Находятся они на достаточно больших глубинах в несколько километров, куда не проникает свет, давление доходит до 265 атм, градиент температур составляет от 360–400°C в центре факела до 4–6°C в при-

донной воде. Водная толща здесь практически не содержит доступного органического вещества и характеризуется высоким содержанием сероводорода. Несмотря на целый набор экстремальных факторов, вокруг «черных курильщиков» сложилось уникальное сообщество живых организмов, основанное на образовании микроорганизмами первичного органического вещества из углекислого газа за счет энергии химических связей восстановленных неорганических соединений (хемолитоавтотрофии). В этом сообществе довольно высокая первичная продукция органического вещества, на основе которого существуют вторичные консументы: амфиподы, голотурии, креветки. Микроорганизмы, выделенные из таких местообитаний, способны использовать для получения энергии соединения серы, азота, молекулярный водород, угарный газ, метан, ионы двухвалентного железа и марганца (табл. 11.7). Они осуществляют как аэробный, так и анаэробный метаболизм.

Таблица 11.7

Основные физиологические группы микроорганизмов сообщества «черных курильщиков»

Физиологическая группа	Донор электронов	Акцептор электронов
Окисляющие восстановленные соединения серы	HS^- , S^0 , S_2O	O_2 , NO_3^-
Нитрификаторы	NH_4^+ , NO_3^-	O_2
Серу- и сульфатредуцирующие	H_2	S^0 , SO_4^{2-}
Метаногены	H_2	CO_2
Гомоацетогены	H_2 , CO	CO_2
Водородокисляющие	H_2	O_2 , NO_3^-
Железо- и марганецокисляющие	Fe^{2+} , Mn^{2+}	O_2
Метилотрофы	CH_4	O_2
Карбоксидобактерии	CO	O_2

Участки дна вокруг «черных курильщиков» покрыты бактериальными матами, образованными клетками нитчатых тионовых микроорганизмов, в основном, рода *Beggiatoa*. Микробное органическое вещество является основой жизнедеятельности многоклеточных животных: трубчатых червей, моллюсков, креветок. Занимая небольшие площади дна вокруг «черных курильщиков», эти организмы достигают значительных размеров и биомассы по сравнению с мелководными обитателями. При этом животные имеют специальные приспособления для питания в таких условиях. Так, гигантские трубчатые черви утратили собственную пищеварительную систему и питаются биомассой тионовых бактерий. Бактерии окисляют сероводород до сульфата и образуют органическое вещество из углекислого газа. Живут эти микроорганизмы в специальных структурах (трофосомах) внутри тканей животного. Часть микробных клеток разрушается и служит пищей трубчатому червю. У двустворчатых моллюсков тионовые

и метанотрофные бактерии развиваются в жаберной ткани. Креветки, обитающие в районе «черных курильщиков», имеют специальные конечности ротового аппарата для «выращивания» бактериальной пищи. Эти конечности густо покрыты нитчатыми тионовыми бактериями одного вида, часть которых животное соскребает и использует для питания. Членистоногие создают условия для развития своего «бактериального огорода», активно передвигаясь в те участки водной толщи или дна, где значения физико-химических факторов наиболее благоприятны для бактерий.

Другим примером сочетания нескольких экстремальных факторов являются придонные сообщества морских организмов, формирующиеся вокруг высачиваний метана или сероводорода из земных недр, где они содержатся в виде газогидратов. Для этих местообитаний характерны пониженная температура, отсутствие света, повышенное давление, низкая концентрация кислорода и доступного органического вещества, высокое содержание сероводорода и метана. Поверхность дна рядом с такими «метановыми/сероводородными сипами» покрыта толстыми бактериальными матами, основой которых являются нитчатые серобактерии родов *Thiothrix*, *Leucothrix*, *Thioploca*, *Beggiatoa*. Обитающие здесь трубчатые черви погонофоры в качестве эндосимбионтов несут в своих тканях клетки метанотрофов и тионовых бактерий. Первичными продуцентами органического вещества в сообществах сипов являются тионовые бактерии, способные к хемолитоавтотрофии. Ацетокластические метаногенные археи из рода *Methanosaeta* и сульфатредукторы, входящие в состав бактериальных матов, осуществляют анаэробное окисление метана, сопряженное с сульфатным дыханием. Выделяемый бикарбонат взаимодействует с ионами кальция в морской воде и откладывается на дне в виде причудливых карбонатных построек.

Наземные и мелководные местообитания, связанные с вулканической деятельностью, сочетают в себе такие экстремальные физико-химические факторы, как высокая температура, низкая концентрация кислорода и значительное содержание неорганических соединений (H_2 , H_2S , S^0 , CO , Fe^{2+} и др.). облигатные аэробы в таких областях существуют в зоне контакта гидротермальных вод с воздухом или на границе смешения гидротермального потока с морской водой. В мелких горячих ручьях (70–95°C) с быстрым течением микробные обрастания в виде косм формируют сероводородоокисляющие термофильные бактерии *Thermothrix thiopara*. В сильнонокислых (pH 1,5–2,0) горячих источниках доминируют термоацидофильные археи из порядка *Sulfolobales*. В мелководных зонах с выходом горячих источников на дне образуются **циано-бактериальные маты**. При температуре воды 40–70°C их каркас составляют термофильные нитчатые цианобактерии и зеленые несерные фототрофные микроорганизмы *Chloroflexus aurantiacus*.

Микробные сообщества мезофильных соленых и содовых озер существуют при щелочных значениях pH (9,0–11,0) и высокой минерализации. В таких сообществах обнаруживаются цианобактерии родов *Spirulina*, *Cyanospira*, *Chroococcus*, представители диатомовых водорослей, пурпурные серные бактерии рода *Ectothiorhodospira*, сульфатредукторы родов

Desulfonatronovibrio, *Desulfonatronum*, бродильщики из рода *Spirochaeta*, аэробные органотрофные археи родов *Natronococcus*, *Natronobacterium*, метанобразующий архей *Methanohalophilus zhilinae*. Из термофильных содовых озер выделены умеренно термофильная анаэробная бактерия рода *Anaerobranca* и гипертермофильный архей *Thermococcus alkaliphilus*.

Таким образом, широкие метаболические возможности микроорганизмов и их устойчивость в значительном диапазоне физико-химических факторов позволяет им не только успешно развиваться в областях, экстремальных по нескольким параметрам, но и создавать фундамент для жизнедеятельности более высокоорганизованных существ.

11.4. Отношение микроорганизмов к биотическим факторам внешней среды

11.4.1. Виды биотических связей и типы симбиозов

В природных условиях микроорганизмы сосуществуют с другими живыми существами, которые для них являются биотическими факторами. Влияние **биотических факторов** чрезвычайно разнообразно, но особенно-стью микроорганизмов можно считать их участие в биотических связях не в виде одной клетки, а в составе популяции. Любой организм для своего развития должен получать питательные вещества. В качестве основного показателя жизнедеятельности обычно рассматривают параметры роста организма, зависящие от природных условий, которые крайне редко бывают оптимальными, и ресурсов, которые поступают медленно, непостоянно и в небольших количествах. В связи с этим взаимоотношения с другими организмами возникают, прежде всего, при использовании доступных источников питания.

Если организмы вступают в борьбу за одинаковое питательное вещество, то складываются конкурентные взаимоотношения (**антибиоз**). Микроорганизмы в этом случае обычно вырабатывают специальные соединения для подавления жизнедеятельности конкурента (антибиотики, токсины, спирты, кислоты, щелочи и т.д.). Вид антибиоза, при котором одна группа организмов использует другую в пищу, называют **хищничеством**. В мире микробов к хищникам могут быть отнесены некоторые скользкие бактерии, обладающие способностью разрушать живые клетки других бактерий и одноклеточных эукариот, а также простейшие, питающиеся живыми клетками прокариот.

Взаимодействия, называемые **кооперацией**, могут возникать при совместном (коллективном) потреблении питательного вещества. При наличии такого сильного окислителя, как молекулярный кислород большинство аэробных микроорганизмов способно самостоятельно использовать субстрат, а факультативная кооперация может возникать при накоплении какого-либо источника питания в значительных количествах. В анаэробных условиях, когда питательный субстрат не может быть использован отдельными культурами микроорганизмов из-за энергетических барьеров, часто именно микробная ассоциация, объединенная

тесными трофическими связями, способна расщепить такой субстрат, и кооперация становится облигатной. Ассоциацию, скрепленную помимо трофических связей пространственными, защитными и иными взаимодействиями, называют совместным существованием, или **симбиозом**. Симбиозы классифицируют по ряду признаков. По входящим в них компонентам различают симбиозы, состоящие только из макроорганизмов, только из микроорганизмов и смешанные, включающие как микроорганизмы, так и многоклеточный организм. В последнем случае микробные клетки взаимодействуют с внешней средой через или при участии высшего организма. Сожительство микроорганизмов с высшими организмами имеет свои особенности. Микробные клетки могут обитать как на поверхностях, так и в различных полостях и тканях высших животных и растений. **Резидентные микроорганизмы** постоянно присутствуют и размножаются в организме животного или растения, а **транзитные** могут попадать туда из окружающей среды только на определенный временной интервал. Симбиотические отношения с макроорганизмом основаны прежде всего на обмене продуктами метаболизма и предоставлении жизненного пространства микробным популяциям. Источником питания для микроорганизмов являются прижизненные выделения и отмершие части высших организмов. Макроорганизм обеспечивает достаточно постоянные условия для роста микробов и в ряде случаев защищает микробную популяцию от внешних воздействий. При образовании симбиоза с высшим организмом микроорганизмы вступают во взаимодействие с защитными системами хозяина и с другими микроорганизмами — симбионтами этого макроорганизма.

По расположению партнеров относительно друг друга различают **экзо-(экто-)** и **эндосимбиозы**. В первом случае более мелкий компонент или множество таких компонентов располагаются на поверхности или вблизи более крупного организма. Экзосимбиозом можно считать **ризосферу**, т.е. пространство почвы вокруг корней растения, где количество микроорганизмов значительно выше, нежели в остальной почве. Эндосимбиозом считают ситуацию, когда более мелкий партнер находится внутри клеток или тканей более крупного, которого в этом случае называют **организмом-хозяином**. Например, **микоризу**, т.е. симбиоз между корнями растений и мицелием грибов, можно рассматривать как эндосимбиоз, поскольку гифы проникают внутрь корня. Некоторые простейшие содержат в клетках в качестве эндосимбионтов клетки цианобактерий или одноклеточных водорослей.

Характер взаимоотношений партнеров в симбиозе отличается чрезвычайным разнообразием, поэтому здесь будет приведена только самая общая классификация. Взаимовыгодное сожительство носит название **мутуализм**, а сосуществование, при котором один из партнеров получает выгоду, а другой подавляется или погибает, называют **паразитизмом**. В мутуалистическом симбиозе отношения основаны на взаимном улучшении обстановки друг для друга: защите от внешних воздействий, получении тех или иных питательных компонентов и преимуществ в узнавании половых партнеров и в размножении. Так, в кефирных зернах дрожжи помимо сбраживания сахаров синтезируют еще и комплекс витаминов, необходимый для раз-

вития молочнокислых бактерий, превращающих лактозу в лактат. Ассоциации фотосинтезирующих микроорганизмов с сульфидогенами основаны на циклическом использовании соединений серы. Паразитизм распространен среди патогенных форм. Например, внутриклеточными паразитами являются вирусы, в том числе бактериофаги, и агробактерии, вызывающие раковые разрастания у растений. **Нейтрализм** называют совместное существование партнеров, при котором не наблюдают никакого явного взаимовлияния. Кроме этих трех форм взаимоотношений выделяют и такие, при которых один из партнеров безразличен к присутствию второго, а второй может получать преимущества (**комменсализм**) или подавляться (**аменсализм**). Характер симбиозов макро- и микроорганизмов может быть разный. Например, болезнетворные микроорганизмы, вступая в паразитический симбиоз с макроорганизмом, наносят существенный вред своим развитием, вызывая инфекционные заболевания, а иногда и гибель организма-хозяина. Такой симбиоз как **носительство** означает способ существования паразита в организме хозяина, которое не приводит к его существенному подавлению и гибели. Напротив, при мутуалистическом симбиозе микроорганизмы играют важную роль в жизни животных и растений, снабжая их некоторыми питательными веществами и витаминами и подавляя патогенные формы. Ни один природный макроорганизм не может нормально существовать без «дружественных» симбиотических микроорганизмов, которые по сути являются его важным «сборным» органом.

Характер симбиоза может измениться при смене условий. Например, нормальная микробиота существует с человеком в мутуалистическом симбиозе, однако при понижении иммунного статуса некоторые микроорганизмы желудочно-кишечного тракта и кожных покровов могут вызывать серьезные заболевания, и их называют **условно патогенными**, или **оппортунистами**. В симбиозах реализуется две возможности питания. При **сапротрофии** микроорганизм-симбионт, как и свободноживущие формы, использует органические соединения, образуемые в процессе жизнедеятельности других организмов, или продукты разложения их мертвых остатков. При **паратрофии** (облигатном паразитизме) микроорганизм полностью зависит от хозяина, потребляя его собственные и образованные им сложные органические вещества и часто изменяя его метаболизм в соответствии со своими потребностями.

Симбиоз может быть **облигатным**, когда один партнер, обычно эндосимбионт, не может существовать без другого. Например, самостоятельное развитие риккетсий — облигатных паразитов животных клеток невозможно, так как они утратили часть клеточных структур и функций. Пример **факультативного симбиоза** демонстрируют клубеньковые бактерии и растения, способные существовать друг без друга. В то же время объединение этих организмов для совместного существования значительно увеличивает эффективность процесса азотфиксации.

В настоящее время представления о количестве партнеров, необходимых для создания и функционирования устойчивых симбиозов, претерпели существенные изменения. Наряду с признанными компонентами хорошо изученных симбиозов (лишайников, актино- и микориз, бактериальных

матов, кефирных зерен) из таких сообществ постоянно выделяются бактерии-хелперы, способствующие формированию симбиоза и постоянно присутствующие в дальнейшем. Это ряд грамположительных бактерий и представители родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*. В качестве партнеров целлюлозоразрушающих микроорганизмов почвы выявлены разные по морфологии простекобактерии.

11.4.2. Микробное сообщество. Синтрофия

В природе микроорганизмы прежде всего взаимодействуют с другими микроорганизмами, являясь компонентами **микробного сообщества**. Микробное сообщество — это совокупность микроорганизмов с разными функциями, взаимодействующих между собой в течение длительного времени в определенном месте. Для микробного сообщества характерен определенный видовой состав, хотя количественные соотношения членов сообщества могут меняться во времени в зависимости от складывающихся условий. Среди микроорганизмов — функциональных дублеров будут численно преобладать те группы, физиологические параметры которых наиболее соответствуют данным конкретным условиям существования сообщества. Такое закономерное изменение структуры, сопровождающееся сменой доминирующих видов и колебаниями численности микроорганизмов разных групп, называется **сукцессией** микробного сообщества.

Основой взаимодействия в микробном сообществе являются трофические связи, позволяющие одним организмам питаться продуктами жизнедеятельности других и обеспечивающие потоки вещества и энергии внутри сообщества. При этом каждая стадия цепи последовательно проводимых химических реакций окисления начального питательного субстрата в сообществе должна обеспечивать необходимой энергией другие микроорганизмы. Тесная кооперация партнеров, как правило, имеет следствием формирование **консорциума** — архитектурно оформленного микробного сообщества, в котором складываются прочные пространственные связи, выражающиеся в физическом контакте клеток и образовании матрикса как интегрирующей структуры. По современным представлениям именно микробное сообщество является функциональной единицей, взаимодействующей с окружающей средой.

Примером тесных трофических связей может служить природное пресноводное анаэробное сообщество, разлагающее целлюлозу (рис. 11.11).

Целлюлоза расщепляется внеклеточными ферментами бродильщиков I стадии (очень часто это члены рода *Clostridium*). Образовавшиеся сахара сбраживаются микроорганизмами, осуществляющими разные виды брожений, до органических кислот, спиртов и газов. На II стадии жирные кислоты с более чем двумя атомами углерода и спирты с атомами углерода более одного превращаются в ацетат и молекулярный водород. Такие реакции термодинамически не выгодны и для своего протекания обязательно требуют отвода H_2 . В пресноводных местообитаниях водород потребляют метаногены, а в морских — сульфидогены. При этом осуществляется межвидовой перенос водорода (а иногда также формиата и ацетата) и возникает **синтрофия** — полная взаимозависимость микроорганизмов друг

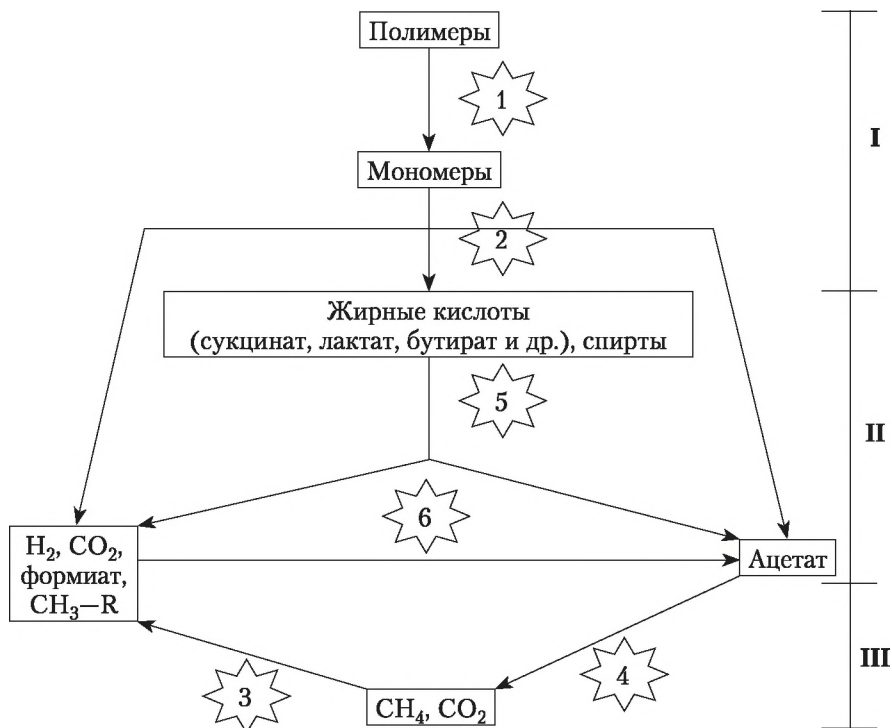


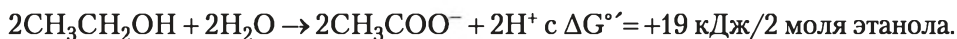
Рис. 11.11. Анаэробная трофическая цепь разложения полимерных соединений:

I, II, III — ацидогенная, ацетогенная и метаногенная стадии процесса; группы микроорганизмов, участвующие в процессе: 1 — гидролитики; 2 — броидильщики; 3 — водородиспользующие метаногены; 4 — ацетокластические метаногены; 5 — синтрофные микроорганизмы; 6 — гомоацетогены

от друга в пищевых потребностях. В таких сообществах синтрофами являются облигатные восстановители H^+ , выделяющие молекулярный водород, поскольку они не могут существовать без микроорганизмов, удаляющих его из зоны реакции. Всегда присутствующие в сообществе представители группы гомоацетогенных бактерий также способны использовать H_2 , но их вклад в подобных ассоциациях, как правило, невелик, поскольку они в обычных условиях не достигают значительной численности. Роль гомоацетогенов может повышаться при падении температуры ниже $20^\circ C$ и снижении значения pH среды до 5,0. В пресноводных местообитаниях расщепление целлюлозы происходит в три стадии и заканчивается образованием **биогаза** (метана в смеси с углекислым газом). Заключительное звено пищевой цепи представлено водородотрофными и ацетокластическими метаногенами. При вбросе большого количества доступного органического вещества в анаэробную метаногенную систему (например, в рубец жвачных животных) происходит разбалансировка цепи реакций. Из-за быстрого образования кислот значение pH снижается до $< 6,0$ и метаногены «выключаются». Следствием этого является нарушение пищеварения (ацидоз) у жвачных животных.

Сульфатзависимое разложение биополимеров (в морских местообитаниях) происходит в две стадии с участием первичных бродильщиков и сульфидогенов (сульфат- и серуредукторов) и заканчивается образованием CO_2 и H_2S как обязательных конечных продуктов.

Известным примером синтрофных взаимодействий является бинарная микробная ассоциация «*Methanobacillus omelanskii*», которая вначале была выделена и названа как чистая культура. Впоследствии оказалось, что она состоит из двух трудноразделяемых партнеров, один из которых осуществляет реакцию



Второй микроорганизм потребляет молекулярный водород в соответствии с реакцией:



Развитие первой культуры (представителя рода *Pelobacter*) было возможно только в ассоциации со вторым партнером (водородотрофным метаногеном из родов *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*), поскольку первая реакция может проходить исключительно при эффективном удалении водорода. Еще одним примером осуществления межвидового переноса интермедиата является развитие ассоциации *Acetobacterium woodii* и *Methanosarcina barkeri*, в которой первый организм (гомоацетоген) превращает фруктозу в ацетат, а метаноген осуществляет ацетокластический метаногенез. Синтрофной может быть ассоциация двух микроорганизмов, где реакцию Стикленда проводят два партнера.

11.4.3. Примеры микробных симбиозов

Микроорганизмы в природе часто создают устойчивые **мутуалистические симбиозы**, в которых сочетаются метаболические возможности партнеров и многие процессы проходят с большей эффективностью. Некоторые такие симбиозы рассмотрены в предыдущих главах. Многие неподвижные фотосинтезирующие микроорганизмы постоянно обитают на поверхности подвижных сульфатредуцирующих партнеров. Помимо циклического использования соединений серы, такие ассоциации дают возможность фототрофам изменять положение в пространстве. У некоторых простейших в клетках в качестве эндосимбионтов присутствуют клетки цианобактерий и зеленых или золотистых одноклеточных водорослей. Строго анаэробные реснитчатые простейшие *Trimyema compressum*, *Metopus striatus*, *Pelagiofila nasuta* и *P. frontata* часто составляют мутуалистический симбиоз с метаногенами *Methanobacterium formicum* и *Methanoplanus endosymbiosus*. При этом в одной клетке простейшего может содержаться до 700 клеток прокариот-эндосимбионтов, которые занимают до 10% объема простейшего. Клетки метаногенов-эктосимбионтов (эпибионтов) также ассоциированы с поверхностью клетки простейшего (рис. 11.12).

Существование в симбиозе приводит к более эффективному получению энергии и усилению роста простейшего на 30%, поскольку быстрая утилизация метаногенами молекулярного водорода, образующегося в гидрогено-

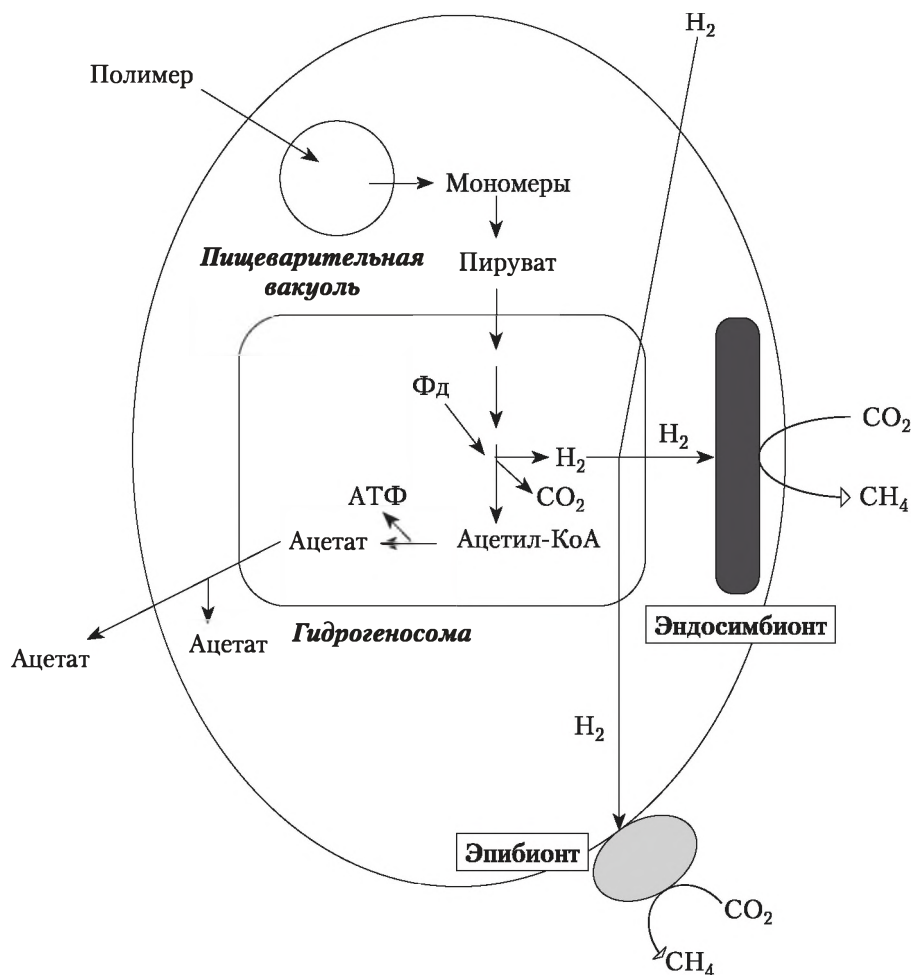


Рис. 11.12. Мутуалистический симбиоз простейшего с метаногенами

сое, значительно увеличивает скорость реакций катаболизма питательных субстратов и образования ацетата.

При производстве такого полезного и питательного продукта, как кефир, издавна используется сложная, естественно сложившаяся микробная ассоциация, находящаяся в агрегированном состоянии, которую называют «кефирным грибком», или кефирными зернами (рис. 11.13).

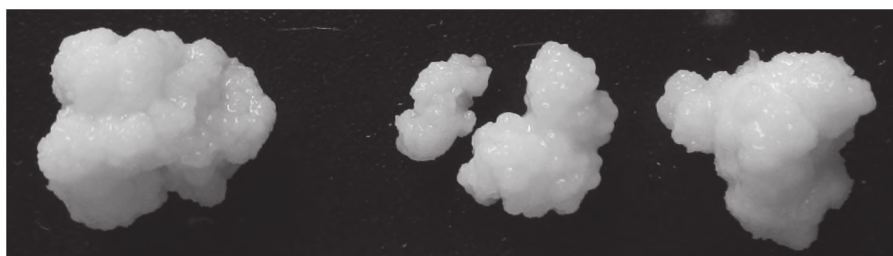


Рис. 11.13. Активные кефирные зерна, увеличение в пять раз

Микробный состав кефирного зерна зависит от его происхождения и условий использования, но в нем всегда представлены молочнокислые микроорганизмы и дрожжи. Доминирующими среди бактерий являются виды родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, в меньших количествах могут присутствовать микроорганизмы рода *Leuconostoc*. В кефирных зернах из разных источников преобладают, как правило, члены родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*, а в качестве минорных отмечены виды родов *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Cryptococcus* и *Torulopsis*. В состав одного кефирного грибка могут входить несколько штаммов одного и того же вида бактерий и дрожжей. Также небольшой по численности, но неотъемлемой частью сообщества кефирных зерен ряд исследователей считает представителей уксуснокислых бактерий рода *Acetobacter*.

Из кефирного зерна в процессе изготовления закваски и затем кефира переходят в молоко клетки из поверхностных слоев агрегата, которым наиболее комфортны условия инкубации (свободное состояние, богатая молочным белком и лактозой среда, присутствие воздуха), отличающиеся также способностью быстро размножаться. При этом преимущество в развитии получают те функциональные дублеры — разные штаммы одного вида, метаболические возможности которых наиболее соответствуют складывающимся физико-химическим условиям. Из-за дальнейшего изменения условий культивирования в процессе приготовления кефира из закваски (снижения pH, образования спирта) некоторые виды лактобацилл могут замещаться более ацидофильной *Lb. kefir*.

Дрожжевые клетки накапливаются в молоке за счет взаимовыгодных отношений с молочнокислыми бактериями. Дрожжи, входящие в состав кефирных зерен, и в частности *Saccharomyces cerevisiae*, обладают высокой устойчивостью как к понижению pH среды, так и к высокому содержанию в ней молочной кислоты. Молочнокислые бактерии «кефирного грибка», в свою очередь, проявляют значительную устойчивость к этанолу, производимому дрожжами. Накопление в продукте молочной кислоты и спирта при совместном развитии дрожжей и молочнокислых бактерий препятствует развитию в кефире посторонних микроорганизмов. Дрожжи синтезируют витамины, которые необходимы для развития молочнокислых бактерий. Клетки этих микроорганизмов часто входят в тесный физический контакт с дрожжами, получая недостающие факторы роста. Считают также, что этанол снижает скорость деления и старения популяции молочнокислых бактерий при их развитии в сообществе кефирных зерен. Таким образом, развитие кефирных зерен в молоке можно рассматривать как сукцессию микробного сообщества, выражающуюся в изменении его состава и соотношений компонентов в нем. При этом лактобациллы и лактококки превращают лактозу в молочную кислоту и снижают pH, что приводит к частичной кислотной денатурации молочного белка, а дрожжи вырабатывают этанол и синтезируют витамины. В образовании матрикса кефирного зерна, а также в создании вязкости готового кефира могут участвовать виды бактерий, способные продуцировать большие количества экзополисахаридов (например, *Lactobacillus kefiranofaciens* и *Leuconostoc pseudomesenteroides*).

Аналогичным мутуалистическим симбиозом является **чайный гриб**, используемый для домашнего приготовления тонизирующего напитка из подслащенного чая. Основными его компонентами служат дрожжи родов *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces* и уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter* (обычно *A. xylinum*). Это сообщество оформлено в виде толстой слоистой слизистой биопленки, располагающейся на поверхности жидкости в широкогорлом сосуде. Верхние слои биопленки, соприкасающиеся с воздухом, имеют плотную кожистую консистенцию, а нижние, находящиеся в жидкости, — более рыхлые. Матрикс сообщества образован полисахаридом, вырабатываемым *A. xylinum* при соприкосновении с кислородом. В качестве субстрата обычно используют 4–6%-й раствор сахара в некрепком настое черного чая. Сосуд со сладким чаем и «чайным грибом» выдерживают несколько суток при комнатной температуре. Дрожжи сбраживают сахар в спирт и углекислый газ, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт в ацетат, придавая напитку кисло-сладкий вкус. Наряду с основными веществами сообщество обогащает получившийся слегка газированный напиток смесью кислот (глюконата, лактата, сукцината, цитрата, малата и др.), сложными изопреноидами, витаминами и ферментами.

Примерами **комменсализма** являются многочисленные ассоциации аэробных и анаэробных микроорганизмов, где аэробы, потребляя кислород, обеспечивают условия для развития анаэробов, а сами при этом выгоды не получают. Гнилостные бактерии образуют аммиак, используемый нитрифицирующими бактериями. В этом случае имеет значение поддержание постоянного значения pH. Связь микроорганизмов, осуществляющих две фазы нитрификации, основана на том, что вторая культура превращает токсичную азотистую кислоту в менее токсичную азотную.

В качестве **паразитических симбиозов**, состоящих только из микрокомпонентов, необходимо отметить сожительство представителей различных групп прокариот с бактерио-, актино- и цианофагами, приводящее в конечном итоге к гибели (**лизису**) микроорганизма-хозяина. Внутриклеточными паразитами прокариот являются также бактерии из родов *Bdellovibrio* и *Campylobacter*. Так, распространенный в водоемах *Bdellovibrio bacteriovorus* проникает в периплазму грамотрицательных бактерий, превращается в нить и постепенно лизирует протопласт хозяина. Затем нить претерпевает множественное деление с образованием молодых вибрионов, которые после разрушения клеточной стенки хозяина выходят в окружающую среду в поиске новых жертв. Микроорганизмы рода *Campylobacter* подобным образом поражают клетки зеленых микроводорослей.

Резюме

Микроорганизмы повсеместно распространены на нашей планете. В почве микроорганизмы особенно многочисленны, поскольку здесь всегда присутствуют вода и питательные вещества. Микробиота играет значительную роль в поддержании и развитии почвы как экосистемы. Органическое вещество растительных и животных остатков преобразуется с участием микробов в гумус. Большинство бактерий и архей расположено на поверх-

ности почвенных частиц в виде микроколоний или внутри мелких пор в виде суспензии в почвенном растворе. Мицелиальные формы микроорганизмов способны расти на или между почвенных агрегатов, оплетая их. В почве находится множество спор. Простейшие обитают в водной пленке и поедают микробные клетки. При продвижении вглубь почвы обычно плотность микробной популяции снижается. Увеличение числа микроорганизмов наблюдают в пространстве почвы вокруг корней растений. Почва обеспечивает устойчивый обмен веществом и энергией между всеми компонентами биосферы. Вода — это естественное место обитания микроорганизмов, где они могут находиться как в активном состоянии, так и в виде покоящихся форм. Физиологическая активность микроорганизмов в воздухе значительно ниже, многие из них находятся в состоянии покоя и присутствуют на мельчайших взвешенных частицах твердых веществ или жидкостей. Микроорганизмы обитают как на поверхностях, так и во внутренних органах высших животных и растений. Отношения, возникающие между макроорганизмом и микробными клетками, основаны как на обмене продуктами метаболизма, так и на предоставлении жизненного пространства.

Повсеместное распространение микроорганизмов обусловлено огромным разнообразием их свойств и способов взаимодействия с окружающей средой. В среде обитания микроорганизмы могут находиться в свободном (взвешенном в воде) и прикрепленном состоянии. Прикрепленные клетки значительно отличаются от свободноживущих. Интегральной структурой для них является матрикс. При взаимодействии с внешней средой любой микроорганизм использует определенную стратегию роста.

Основными абиотическими факторами для микроорганизмов являются активность воды, рН, температура, гидростатическое давление, электромагнитные излучения, наличие кислорода.

В окружающей среде микроорганизмы взаимодействуют с другими организмами, прежде всего, по отношению к использованию доступного питания. Крайними формами таких взаимодействий являются антибиоз и кооперация. Если отношения между организмами обусловлены не только пищевыми связями, то говорят о симбиозе, или совместном существовании. Отношения в симбиозах могут основываться на трофических, пространственных, защитных и других функциях. Симбиозы подразделяют на несколько групп по входящим в них компонентам, по их расположению относительно друг друга и по характеру взаимодействия. Характер симбиоза может меняться при смене условий.

В микроразонах симбиотические взаимоотношения микроорганизмов осуществляются в рамках микробного сообщества. Полная взаимозависимость микроорганизмов друг от друга в пищевых потребностях носит название синтрофии.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Чем отличаются физико-химические условия существования микроорганизмов в почве, воде, воздухе и внутри макроорганизма?

2. Почему почва оказывает значительное влияние на биосферу Земли?
3. Можно ли предсказать положение конкретного микроорганизма в пространстве водоема, зная его морфологию и физиологические свойства?
4. Проанализируйте преимущества и недостатки пребывания микроорганизмов в прикрепленном состоянии.
5. Перечислите особенности микроорганизмов, способствующие их повсеместному распространению.
6. Приведите классификации микробов по отношению к различным абиотическим факторам и сравните возможности прокариот и эукариот.
7. Вспомните разные местообитания, где несколько физико-химических факторов имеют экстремальные значения.
8. Приведите примеры симбиозов, включающих только микроорганизмы.

Семинар 1

Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Образование биопленок в различных условиях

Цель работы: выполняя данную работу, студенты узнают, что микроорганизмы предпочитают расти в прикрепленном состоянии, образуя различного вида биопленки, внешний вид и мощность которых зависят от характера поверхности, к которой прикрепляются микроорганизмы. Студенты овладеют методикой постановки эксперимента по выявлению покрытий, препятствующих развитию микроорганизмов на заданной поверхности, и будут уметь моделировать условия образования биопленок.

Любой объект, погруженный в водоем, быстро покрывается слизистым слоем микроорганизмов. После этого и более крупные организмы могут начать колонизировать подводные поверхности. Прикрепление играет важную роль в жизни ряда микроорганизмов, поскольку позволяет им развиваться в условиях достаточно стабильного микроокружения. Микробные обрастания рабочих поверхностей приводят к большим проблемам. Например, обрастания погруженных в воду морских и речных судов снижают их скорость и увеличивают потребление топлива, а микробные биопленки на внутренних поверхностях промышленных и муниципальных водопроводов уменьшают просвет труб. Для борьбы с образованием биопленок применяют различные препараты, как правило, отличающиеся высокой токсичностью (биоциды). В городском водоснабжении воду специально хлорируют, применяют фунгициды и альгициды для снижения процессов обрастания. Днища судов покрывают специальными красками.

В обрастаниях из природных водоемов часто обнаруживаются простейшие, прикрепленные к поверхностям и фильтрующие воду вокруг себя для заглатывания и переваривания отмерших частичек растений и животных.

Необходимые материалы: пробы осадков из различных источников, пластиковые или пластмассовые объекты, из которых можно нарезать круги (например, прозрачные пластиковые бутылки объемом 1,5–2 л), ножницы, дырокол или шило, ведра глубиной не менее 40 см, палочки длиной 40–45 см, не разбухающая в воде веревка (30–40 м), грузила весом 30–50 г, разнообразные материалы для покрытия поверхностей (например, быстросохнущая алкидная эмаль, лак для ногтей, вазелин, острый соус «чили», лосьон и т.д.), мягкие кисточки или ватные палочки для нанесения покрытий, бумажные салфетки, лотки или кристаллизаторы, лупы, световой микроскоп, предметные и покровные стекла, несколько чистых прозрачных пробирок.

Для эксперимента готовят «искусственный пруд», набирая по 10 л водопроводной или колодезной воды в ведра и опуская в них 1–2 чашки (200–300 мл) осадка из пруда, реки или другого источника. Водопроводную воду перед внесением осадка необходимо отстаивать 24 ч. После внесения осадка ведра инкубируют в течение 2 недель при комнатной температуре. За 1 сут. перед постановкой эксперимента вырезают нужное количество кружков из пластика диаметром 5 см. В центре кружков дыроколом или шилом прокалывают отверстие, чтобы можно было протянуть веревку. Один из 6 кружков, составляющих каждую повторность опыта, с обеих сторон окрашивают эмалевой краской и кладут на просушку при комнатной температуре.

Для постановки эксперимента на один конец веревки (1 м) укрепляют грузило, затем, отступя 5 см, завязывают узелок (больше, чем диаметр прокола на кружке) и продевают первый кружок. На расстоянии 3 см делается другой узелок и на него надевается второй кружок. Так последовательно надеваются все 6 кружков, причем вторым сверху должен быть кружок, предварительно окрашенный эмалью. Самый верхний кружок служит контролем, поэтому его не покрывают ничем. Обе поверхности остальных кружков по очереди смазывают тонкими слоями различных покрытий (например, вазелина, лосьона, соуса «чили», лака для ногтей). При этом веревка с укрепленными кружками должна быть свободно подвешена либо ее должен держать на весу другой студент. Порядок расположения кружков со смазками и контрольного необходимо зафиксировать в лабораторном журнале. Веревки с кружками опускают в ведро с заготовленной водой вертикально, чтобы верхний кружок был погружен на 5 см. На этом уровне конец веревки прикрепляют к палочке, лежащей поперек ведра. В одно ведро можно опустить до 8 веревок с кружками (по 4 на одной палочке). При этом кружки не должны касаться друг друга.

Далее набирают воду из ведра в чистую пробирку и описывают культуральные признаки пробы, обращая внимание на имеющиеся в воде мельчайшие организмы. Готовят препарат «раздавленная капля» и микроскопируют его при увеличениях 10X и 40X. Описывают и зарисовывают морфотипы микроорганизмов, наблюдаемых в воде. Если применяли разные типы воды, то сравнивают микробиоту таких проб.

Ведра с веревками инкубируют в статичных условиях при комнатной температуре в течение 2 недель. По окончании инкубации веревки с круж-

ками переносят в стеклянные лотки или кристаллизаторы, наполненные водой из ведра, чтобы кружки с обрастаниями не подсыхали. Кружки просматривают с помощью лупы, описывают видимые признаки обрастаний (цвет, структуру поверхности, блеск и т.д.) и оценивают степень обрастания в баллах от 1 до 5 по сравнению с контрольным кружком, который считают за 3 балла. Отложив по оси абсцисс использованные покрытия кружков (например, 1 — контроль, 2 — эмаль, 3 — лак для ногтей, 4 — вазелин и т.д.), а по оси ординат — степень обрастания на соответствующем покрытии в баллах, получают диаграмму, позволяющую сделать вывод, какое покрытие препятствует, а какое способствует образованию микробных биопленок.

Можно усложнить эксперимент, инкубируя каждый вариант «искусственного пруда» при разных значениях температуры, освещенности и других физико-химических факторов, а также при внесении в воду биоцидов (например, хлорсодержащих дезинфектантов). Он позволит сделать выводы о влиянии этих факторов на скорость формирования и мощность обрастаний и выявить условия, способствующие и препятствующие образованию биопленок.

Семинар 2

Взаимодействия микроорганизмов. Трофическая цепь. Симбиозы

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Глава 12

СИМБИОЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ С ЖИВОТНЫМИ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- принципы создания и существования симбиозов микроорганизмов с животными в природе;

уметь

- выявлять различные симбиотические отношения микробов с животными;

владеть

- навыками контроля роста микроорганизмов в симбиозах с животными.

12.1. Мутуалистические симбиозы

12.1.1. Симбиозы водных животных с микроорганизмами

В известных и подробно описанных **мутуалистических симбиозах** микроорганизмов и животных партнеры по отношению друг к другу могут выполнять самые разные функции. Многоклеточный организм, как правило, создает относительное постоянство условий микробного местобитания и смягчает действие неблагоприятных факторов внешней среды на микроорганизмы. Мутуалистическая микробиота, в свою очередь, повышает эффективность использования питательных веществ хозяином, защищает его от токсических соединений и препятствует внедрению патогенных микроорганизмов. В таких симбиозах жизнедеятельность и размножение партнеров часто происходит скоординированно. В то же время мутуалистические взаимоотношения строятся на балансе между агрессивными и защитными функциями партнеров, например, когда часть клеток микробной популяции лизирована и используется как питание макроорганизмом, у которого микропартнеры, в свою очередь, могут «отбирать» часть метаболитов для собственных нужд.

Для многих малоподвижных водных животных (асцидий, губок, коралловых полипов и др.) сожительство с фото- и хемоавтотрофными микроорганизмами расширяет их возможности получения органического питательного вещества и избавления от агрессивных продуктов метаболизма (производных мочевой кислоты, мочевины). Например, в симбиозе асцидии и живущей вокруг ее ротовой полости цианобактерии рода *Prochloron*, клетки последней фиксируют CO_2 и образуют органические вещества, получая от макроорганизма защиту от внешних воздействий и дополнительное азотное питание. Для пресноводных гидр и губок микросимбионтами часто являются одноклеточные зеленые водоросли, а морские кораллы, актинии и плоские черви обычно вступают в симбиозы с бурыми

микроводорослями. Макропартнер при таком сожительстве предоставляет микроорганизмам убежище и «делится» с ними продуктами обмена, а водоросли, в свою очередь, снабжают животное продуктами фотосинтеза.

Трубчатые черви и двусторчатые моллюски, обитающие в сообществах **«черных курильщиков»** и **метановых сипов**, получают органическое вещество, лизируя часть популяции содержащихся в их тканях симбиотических **тионовых** и **метанотрофных микроорганизмов**. Океанические креветки, обитающие в районах «черных курильщиков», используют в пищу некоторое количество клеток симбиотических нитчатых тионовых бактерий, соскребая их со своих ротовых конечностей, к которым микробные клетки прикреплены одним концом. Бактерии осуществляют синтез первичного органического вещества за счет окисления восстановленных неорганических соединений серы. Креветки, передвигаясь в водной толще, доставляют свой «бактериальный огород» в область морской воды, где физико-химические факторы наиболее оптимальны для роста микроорганизмов.

Фотобактерии, находящиеся в мутуалистическом симбиозе с некоторыми моллюсками, глубоководными рыбами и другими водными животными, входят у них в состав специальных светящихся органов. Для животных свечение играет важную роль в привлечении объектов охоты, половых партнеров, а иногда способствует защите и маскировке. Микроорганизмы в составе такого симбиоза получают защиту, питание и благоприятные условия проживания. Так, у более 50 видов рыб имеется специальный орган — **бактериофор**, эпителий которого выделяет секрет, поддерживающий жизнедеятельность **светящихся бактерий**. Инокуляция этого органа бактериальной культурой из морской воды и последующее удаление продуктов метаболизма и погибших клеток осуществляется через выводной проток, соединенный с внешней средой напрямую или через кишечник. Бактериофор часто снабжен особыми приспособлениями (отражающими слоями кристаллического гуанидина, участками прозрачных тканей, выполняющими функцию светособирающих линз или светофильтров, различными проводящими свет структурами) для управления интенсивностью и направленностью света. Иногда светящийся орган имеет похожее на глазное веко образование и мышцы, поворачивающие бактериофор темной стороной наружу.

Использование симбиотических морских фотобактерий для защиты от нападения хищных рыб описано для ночного тропического кальмара, который активен в лунные ночи. Каждый раз с наступлением сумерек кальмар засасывает в специальный орган морскую воду, содержащую светящиеся бактерии. Канальцы светящегося органа начинают пульсировать со скоростью несколько раз в секунду, каждый раз засасывая 1–2 мкл морской воды с планктонными бактериями *Vibrio fischeri*. Установлено, что колонизировать светящийся орган способны лишь подвижные клетки, способные к свечению. У неподвижных и «темных» мутантов это свойство отсутствует. Подвижные в морской воде клетки фотобактерий, попав внутрь органа, прикрепляются к его внутренним стенкам, теряют жгутики и начинают быстро размножаться, используя для питания белки, вырабатываемые слизистой оболочкой светящегося органа животного. Когда

микробная популяция достигает определенной плотности (обычно через 20–40 мин), интенсивность свечения многократно возрастает (до 100 раз в расчете на одну клетку) и остается на этом уровне в течение ночи. Светящийся орган кальмара расположен возле чернильного мешка и устроен так, что свет от светящихся бактерий отражается специальным рефлектором и усиливается линзой. Отбрасываемый по направлению ко дну, он делает кальмара менее заметным на фоне лунного неба. Утром светящийся орган кальмара сокращается и выбрасывает клетки фотобактерий наружу. Тем самым животное не тратит ресурсы на поддержание бактерий, способствует активному расселению фотобактерий в толще воды и постоянному обновлению их популяции в светящемся органе. В то же время под действием колонизирующих бактерий у кальмаров-симбионтов по сравнению со стерильными особями быстрее экспрессируются белки мукоидной оболочки.

12.1.2. Примеры симбиозов насекомых с микроорганизмами

Такие общественные насекомые, как термиты, могут питаться целлюлозой только в мутуалистическом симбиозе с **целлюлозоразрушающим микробным сообществом**, которое населяет их кишечник, достигая самой высокой плотности в задней кишке. Из целлюлозы оно образует ацетат, который является основным энергетическим субстратом насекомого. Микробиота кишечника высших термитов представлена, в основном, прокариотами, у низших термитов значительную часть составляют жгутиковые простейшие. Кишечник термитов подразделяется на анаэробную и аэробную зоны, причем последняя прилегает к внутренней слизистой поверхности кишки, распространяясь до 100 мкм вглубь.

Бактериальный компонент кишечника термитов представлен значительным количеством **молочнокислых бактерий** и организмами родов *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Sporomusa*, *Microbacterium*, *Edwardsiella*, *Micromonospora*, *Seibaidella*, *Cristispira*, *Acetobacterium*, осуществляющими разные виды брожений. В сообществе задней кишки термитов обнаружены также актиномицеты и риккетсии, образующие вещества, обеспечивающие нормальное развитие и размножение насекомых. Анаэробы, в том числе строгие, представлены метаногенными археями родов *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, *Methanosphaera* и бактериями родов *Treponema*, *Bacteroides*, сульфатредуцирующими и азотфиксирующими микроорганизмами. Многие анаэробные микроорганизмы являются компонентами синтрофных ассоциаций. Конечным продуктом термитного целлюлозолитического сообщества является **биогаз**, выделение которого вносит существенный вклад в эмиссию метана в атмосферу из-за значительной численности термитов на Земле.

Другой вид мутуалистического симбиоза, основанный на поведенческих реакциях насекомых, обнаружен в муравейниках муравьев-листорезов, относящихся к высшему разряду из родов *Atta* и *Acromyrmex*. Оказалось, что муравьи издавна разводят в муравейниках так называемые **грибные сады**, специально культивируя грибы родов *Leucocoprinus* и *Leucoagaricus* из семейства *Lepiotaceae* (агариковые). Муравьи сначала готовят субстрат

для выращивания грибов: они приносят листья в муравейник, смачивают их слюной и пережевывают на мелкие кусочки размером 1–2 мм. Тем самым происходит увеличение доступной поверхности субстрата и удаление большей части микробиоты. Свежеприготовленные листья муравьи удобряют собственными экскрементами для обогащения ферментами и соединениями азота и укладывают поверх существующей кучи грибного сада. Часть старой грибной колонии служит инокулятом для новой порции субстрата. Рабочие муравьи постоянно следят за «садом», поддерживая оптимальными воздушный режим, влажность и температуру путем открытия и закрытия вентиляционных отверстий в муравейнике. Через 6 недель активного развития нового мицелия свежий субстрат полностью разлагается грибами. Часть подросшего мицелия грибов рабочие муравьи скормливают личинкам, а более старый субстрат, оказавшийся внизу кучи, помещают в «помойную яму». Она может находиться как внутри, так и вне муравейника. Рабочие муравьи также равномерно распределяют протеазы по поверхности кучи. Эти ферменты образуются самими грибами и выделяются личинками с фекалиями при переваривании гриба. Кроме этого муравьи специально разрывают гифы грибов для стимулирования их роста.

Грибные сады могут инфицироваться патогенным грибом из рода *Escovopsis* (*Ascomycota*), для которого выполняются постулаты Коха. Если рабочих муравьев удаляют из сада, то паразит быстро (иногда за 12–24 ч) обгоняет в росте культивируемые в «саду» грибы, что приводит к гибели «сада», а затем обычно и муравейника. Оказалось, что рабочие муравьи, выращивающие грибные сады, покрыты (иногда полностью) беловатыми гранулами, представляющими собой плотные комочки нитчатых актинобактерий. Эти актиномицеты образуют мощный антибиотик, подавляющий рост патогенного гриба. Антибиотик защищает от инфекции и самих муравьев. В то же время рабочие муравьи могут в определенный период усиливать развитие актиномицета на поверхности кутикулы, вероятно, путем образования стимулирующих веществ их специальными железами. При искусственном внедрении паразита в «сад» уже через 8 дней тела рабочих муравьев покрывались гранулами актиномицетов.

Посевной материал передается из поколения в поколение: молодая самка, отправляясь в брачный полет, берет с собой кусочек грибницы. На ее кутикуле от муравейника к муравейнику переносятся также антибиотикообразующие актиномицеты. До появления в новом муравейнике рабочих муравьев самка сама ухаживает за грибным садом и подкармливает грибами появившиеся личинки.

12.1.3. Микробиота рубца жвачных животных

Микробиота полостей тела животных и человека считается экзосимбионтом, поскольку занимает внешнее положение по отношению к тканям хозяина. К таким экзосимбиозам относят ассоциации, населяющие **желудочно-кишечный тракт (ЖКТ)**, ротовую полость и слизистые оболочки мочеполовой системы млекопитающих.

Жвачные млекопитающие (крупный рогатый скот, козы, овцы, жирафы, верблюды) имеют ЖКТ, включающий сложный четырехкамерный желу-

док (рис. 12.1). Одна из его секций, **рубец**, содержащий огромное количество микроорганизмов, обеспечивает животным возможность питаться практически безбелковой пищей.

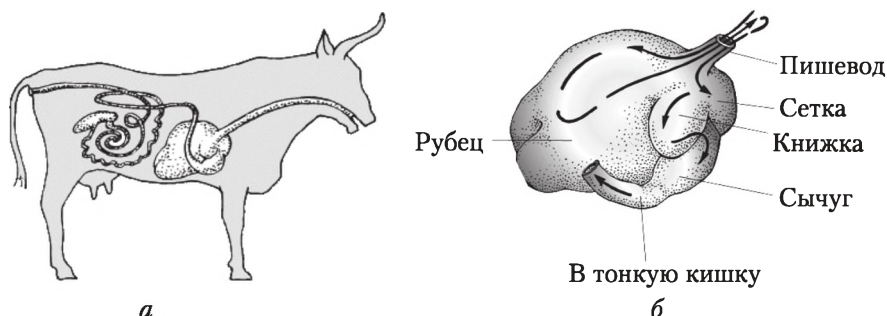


Рис. 12.1. Строение:

а — пищеварительной системы коровы; б — сложного желудка коровы

Сам рубец и слюна животного не содержат целлюлаз, и только в результате деятельности целлюлозоразрушающего микробного сообщества рубца образуются жирные кислоты (формиат, ацетат, пропионат, бутират), которые усваиваются животными. Микроорганизмы утилизируют также выделяющиеся CO_2 и H_2 . **Метаногены** превращают их, а также часть ацетата и формиат в метан, который выделяется в атмосферу. Если бы в рубце вместо метаногенов присутствовали гомоацетогены, то было бы меньше потерь углерода в виде газов, так как образованный ацетат также всасывался бы в кишечнике животного.

Из аминокислот при разложении биомассы микроорганизмов в дальних отделах кишечника строится белок жвачных животных (рис. 12.2).

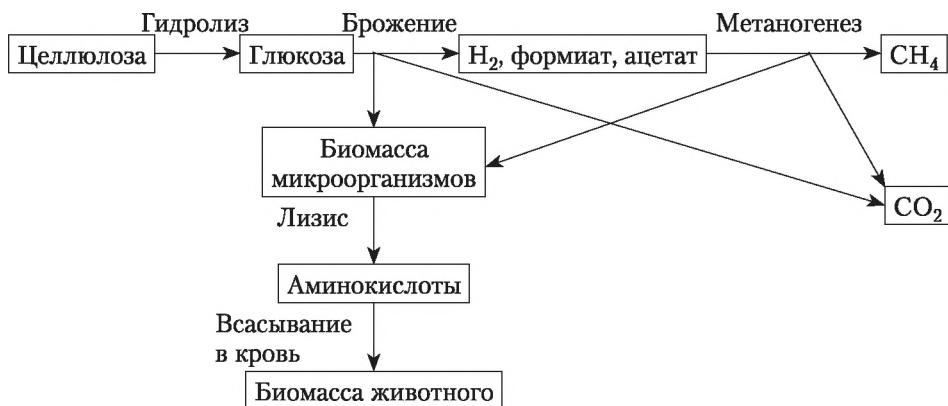


Рис. 12.2. Путь превращения целлюлозы в белки животного через белки микроорганизмов

В ротовой полости животного растительная пища смачивается слюной и заглатывается. Дополнительное смачивание и механическое измельчение непереваренных остатков осуществляется при отрыгивании пищевого

комка и его длительном пережевывании. Путем отрыгивания удаляются также образовавшиеся газы. Основное расщепление целлюлозосодержащего корма происходит в рубце, который является идеальным местом для роста анаэробных микроорганизмов, обеспечивая их «непрерывное культивирование» при постоянной температуре (37–39°C) и pH $\approx$ 6,5–7,0. Объем рубца у коровы составляет от 80 до 100 л. Нормальная микробиота рубца содержится в рубцовой жидкости и выстилает поверхность слизистой оболочки. Рубец населен разнообразными бактериями и археями, а также простейшими и грибами. Подсчитано, что в 1 г содержимого рубца присутствует до $\approx 10^{12}$ клеток прокариот. Небольшое количество кислорода, попадающего в рубец с пищей, быстро потребляется имеющимися в сообществе факультативно анаэробными микроорганизмами. Поддержанию оптимального значения pH способствует бикарбонат слюны, однако, быстрое накопление жирных кислот, например, лактата, может приводить к значительному закислению. Рубцовые прокариоты существенно различаются по чувствительности к изменениям pH. Целлюлозолитические бактерии и метаногенные археи очень чувствительны к понижению pH, тогда как бактерии, расщепляющие крахмал, обычно pH-резистентны. Некоторые рубцовые прокариоты являются высокоспециализированными группами, а другие обладают широкой субстратной специфичностью. Показано, что значительной численности ($\approx 10^7$ клеток на 1 г содержимого) в рубце достигают представители 20 видов прокариот, однако, биоразнообразие бактерий и архей этого уникального местообитания оценивается значительно выше. Молекулярные методы и прямое микроскопическое наблюдение свидетельствуют, что видов прокариот в рубце в 10–100 раз больше, чем удается получить путем культивирования в лабораторных условиях. В рубце постоянно присутствуют представители таких родов, как *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Butirivibrio*, обладающие высокоактивными целлюлазами, *Ruminobacter*, *Selenomonas*, *Prevotella*, *Succinimonas*, *Streptococcus*, способные расщеплять крахмал, *Lachnospira*, участвующие в переваривании пектина, *Clostridium*, обладающие широкими возможностями разложения полисахаридов и пептидов. Микроорганизмы родов *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Peptostreptococcus*, *Wolinella*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Micromonospora*, *Syntrophococcus*, *Escherichia*, *Syntrophomonas* и др. способны сбраживать большое количество сахаров, спиртов, аминокислот и жирных кислот. В рубце обнаружены сульфатредуцирующие бактерии рода *Desulfovibrio*, а из метаногенных архей преобладают *Methanobrevibacter ruminantium* и *Methanospirillum hungatei*.

Грибы, обитающие в рубце, осуществляют гидролиз лигнина и ксилана и в меньшей степени целлюлозы. Выделенные из рубца грибы родов *Neoxallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Oprinomycetes*, *Anaeromyces*, *Sphaeromyces* являются вторичными анаэробами, имеющими гидрогеносомы и содержащими гидрогенотрофных метаногенов в качестве эндосимбионтов. Как правило, они имеют сложный жизненный цикл с образованием зооспор.

Содержание клеток простейших в рубце достигает 10^5 на 1 мл. Простейшие — важный компонент сообщества рубца, так как они способны наряду

с разложением растительных компонентов гидролизовать клеточные стенки грибов, поглощать их зооспоры, заглатывать и переваривать частицы пищи и клетки прокариот. Анаэробные жгутиковые простейшие рубца относятся к родам *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium*, *Orphryoscolex*. Использование простейшими крахмала модулирует кислотность содержимого рубца и предотвращает ацидоз.

Под действием сложного сообщества рубца расщепление грубой растительной пищи происходит в течение 0,5–2 сут. Микробиота рубца наряду с осуществлением процессов расщепления сложных целлюлозосодержащих биополимеров до легко усваиваемых соединений обеспечивает животное витаминами, веществами-регуляторами и факторами роста, защищает внутренние органы от прикрепления и развития патогенных микроорганизмов, стимулирует иммунную систему животного. При рождении детеныша жвачного животного компоненты нормальной микробиоты рубца передаются ему со слюной матери, с ее кожных покровов при кормлении и с кормом. Связи между симбионтами устанавливаются в первые дни после рождения.

12.1.4. Нормальная микробиота человека

Многочисленная и разнообразная **нормальная микробиота человека** населяет все внешние (кожные покровы, волосы, ногти) и внутренние (слизистые оболочки пищеварительной, дыхательной и мочеполовой систем) поверхности тела. По современным представлениям у здорового человека не содержат микроорганизмов только кровь и лимфа. Осуществлять нормальную жизнедеятельность человек может только в мутуалистическом симбиозе с своей нормальной микробиотой, поэтому совокупность постоянно присутствующих микроорганизмов (**резидентов**) человеческого существа можно считать его сложным «сборным органом».

Микробное население кожи состоит из представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Sarcina*, пропионовых кислотных бактерий и других актинобактерий, а также низших грибов. Открытые части человеческого тела наиболее подвержены воздействию микроорганизмов окружающей среды. Из воздуха при соприкосновении с почвой, различными предметами и другими людьми на кожу могут попадать споры различных микроорганизмов (клостридий, бацилл, грибов), представители семейства *Enterobacteriaceae* и грамположительные кокки, в том числе, болезнетворные и условно патогенные. В определенных условиях они способны вызывать развитие заболеваний. Микробиота кожных покровов питается выделениями жировых, сальных и потовых желез и продуктами распада отмерших клеток эпителия.

Верхние дыхательные пути человека содержат несколько групп резидентных микроорганизмов. В основном, это виды родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, некоторые грамотрицательные диплококки и палочки (например, из рода *Proteus*), актинобактерии и дрожжи. Многие вирусы также длительно присутствуют в дыхательных путях. Большинство микробных клеток и спор, вдыхаемых человеком вместе с воздухом и частицами пыли, задерживается слизистыми оболочками верхних дыха-

тельных путей, особенно полости носа, и в норме не проникают в мелкие ветви бронхов и альвеолы легких. Нормальные обитатели дыхательных путей и привнесенные извне микроорганизмы при ослаблении защитных сил человека могут вызывать различные заболевания (ангины, пневмонии, катары, бронхиты и т.д.). При кашле, чихании, разговоре человек с выдыхаемым воздухом и каплями слизи выделяет во внешнюю среду большое количество микробных клеток. Поэтому при оценке качества воздуха закрытых помещений всегда определяют содержание в нем характерных обитателей верхних дыхательных путей (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus* и *S. pyogenes*).

Слизистые оболочки глаз заселены некоторыми видами родов *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и микоплазмами. Многие из них способны вызывать заболевания при ослабленных состояниях организма.

Качественный и количественный состав микробиоты ротовой полости конкретного человека зависит от особенностей макроорганизма и используемой пищи. В норме ротовая полость содержит множество микроорганизмов, поддерживаемых постоянным наличием питательных веществ, высокой влажностью, околонейтральными значениями pH и благоприятной температурой 37°C. Основная масса микроорганизмов образует микробную пленку, покрывающую слизистую оболочку, язык и зубы. Прикрепление клеток происходит с помощью образуемых микроорганизмами полисахаридов и белковых соединений слюны. При микробном разложении пищи кислые и щелочные продукты распада могут растворять твердые вещества зубов и способствовать формированию зубного камня, взаимодействуя с ионами кальция и фосфатами. Повреждение зубов и слизистых оболочек усугубляется чрезмерным развитием микробного зубного налета в труднодоступных для чистки местах, что приводит к затруднению оттока агрессивных микробных метаболитов. Резидентными обитателями полости рта считаются факультативно анаэробные стрептококки и облигатно анаэробные представители родов *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*. Ротовая полость населена также сапротрофными нейссериями, спирохетами, микоплазмами. Актинобактерии представлены некоторыми видами родов *Actinomyces*, *Nocardia*, *Corynebacterium*. Из простейших обычно присутствуют амёбы и трихомонады. Случайно занесенные в полость рта из внешней среды с воздухом, водой и пищей микроорганизмы могут быстро приспособиться к этому местообитанию. Такая способность присуща стафилококкам, стрептококкам, коринебактериям, некоторым вирусам, дрожжам рода *Candida*. Некоторые обитатели ротовой полости относятся к условно патогенным микроорганизмам. В норме ведущие сапротрофный образ жизни, они при изменении условий способны вызывать различные заболевания.

Для разных отделов пищеварительного тракта человека характерен свой видовой состав и численность микробиоты. Вместе с пищей изо рта в желудок могут попадать молочнокислые бактерии, кокки, бациллы и дрожжи, а также некоторые патогенные микробы. Проникновению посторонней микробиоты в кишечник препятствует желудочный сок, обладающий бактерицидными свойствами. В самом желудке микробная популяция пред-

ставлена ацидотолерантными видами рода *Helicobacter*. **Нормальная микробиота** нижних отделов ЖКТ представлена, в основном, энтеробактериями и строгими анаэробами рода *Bacteroides*. В отличие от рубца, простейшие в этом сообществе в норме отсутствуют. В тонком кишечнике длиной 12–14 м пищевой комок находится 2–4 ч, а содержание клеток микроорганизмов не превышает 10^5 на 1 г. В конечных отделах толстого кишечника длиной 1,5 м и объемом 0,9–1,7 л насчитывается уже свыше 10^{12} клеток прокариот на 1 г содержимого, и пищевой комок задерживается там от 12 до 24 ч. В прямой кишке поддерживаются температура 36–37°C и ОВП –200 ... –300 мВ. В каловых массах содержится 20–30% сухого вещества, обнаружены летучие (ацетат, пропионат, бутират) и нелетучие (лактат, сукцинат) жирные кислоты, газы (CO_2 , CH_4 , H_2 , H_2S , N_2 , NH_3 и пристеночно – O_2), существенные количества ионов Na^+ и Cl^- , целлюлозы, гемицеллюлозы и мукополисахаридов, которые слущиваются с эпителия ЖКТ, а также следовые концентрации аминокислот и пептидов. Каловые массы на 90% состоят из клеток микроорганизмов, поэтому их исследования позволяют судить о микробном составе сообщества толстого кишечника. У взрослого человека преобладают представители анаэробного рода *Bacteroides* (до 70%). В значительных количествах (до 10^{10} клеток на 1 г) выявляются виды родов *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*. Еще около 400 видов микроорганизмов присутствуют в значительно меньших количествах. Это виды родов *Staphylococcus*, *Proteus*, *Clostridium*, различные дрожжи и метаногенные археи. Характерным обитателем толстого кишечника является *E. coli*, поэтому ее наличие в образцах говорит об их фекальном загрязнении. Основная масса резидентных для кишечника прокариот развивается в прикрепленном состоянии, образуя **биопленки** на слизистой оболочке ЖКТ. В большом количестве в кишечнике обитают **латентные вирусы**, которые могут активизироваться в неблагоприятных условиях. Микробное сообщество кишечника человека существенно изменяется с возрастом. Особая микробиота имеется у грудных детей. В течение первых суток жизни ЖКТ младенцев заселяется преимущественно энтеробактериями (в частности, *E. coli*) и стрептококками из окружающей среды и при кормлении грудным молоком. В дальнейшем при грудном вскармливании начинают доминировать микроорганизмы рода *Bifidobacterium*. При взрослении и переходе на смешанное питание количество **бифидобактерий** в сообществе значительно снижается. Нормальная микробиота ЖКТ играет основную роль в синтезе витаминов и детоксикации некоторых веществ, подавляет развитие патогенных форм за счет образования кислых метаболитов и антимикробных веществ, а также препятствует прикреплению болезнетворных микробов к стенкам кишечника. Ряд симбиотических микробов-**оппортунистов** ЖКТ при попадании в несвойственные им органы и системы, а также при снижении иммунного статуса макроорганизма может вызывать серьезные инфекционные заболевания. Например, *Fusobacterium neurophorum* при прободении кишечника поселяется в клетках печени, вызывая некротизацию ее тканей.

Нарушение видового состава и количественных соотношений компонентов кишечного микробного сообщества под действием различных фак-

торов (**дисбактериоз**) приводит к снижению усвояемости пищи, изменению течения многих реакций, появлению вредных продуктов обмена и развитию возбудителей заболеваний. Так, при длительном или неграмотном использовании антибиотиков возникает состояние, при котором резко уменьшается общее число микробных клеток. При уменьшении количества микроорганизмов, образующих витамины, наблюдаются авитаминозы и нарушения обмена веществ. Изменение соотношения видов микроорганизмов может приводить к доминированию условно патогенных форм и бактерий, образующих вредные соединения (шлаки). Так, при резком падении числа молочнокислых бактерий, являющихся антагонистами болезнетворных микроорганизмов, велика вероятность развития инфекционных заболеваний. Значительное увеличение содержания *E. coli*, стафилококков, дрожжей рода *Candida* и других условно патогенных микроорганизмов может привести к развитию вторичных инфекций. Предотвращению состояния дисбактериоза способствует целенаправленное назначение лекарственных средств и комбинирование их с препаратами, повышающими защитные силы организма, и поливитаминами.

Микробиота мочеиспускательных путей человека в норме представлена небольшим количеством непатогенных грамположительных кокков, грамотрицательных палочек, микоплазмами и микобактериями. Для микробного сообщества влагалища здоровых женщин характерно доминирование молочнокислых бактерий, поддерживающих кислотность на уровне pH 4,0–5,5, и наличие небольшого числа грамположительных кокков. Существенное уменьшение популяции молочнокислых бактерий приводит к повышению pH до слабощелочных значений и развитию разнообразных микробных форм, что свидетельствует о протекании воспалительного процесса.

12.2. Паразитические симбиозы

12.2.1. Основные понятия

Паразитическим симбиозом называют сожительство, при котором один из партнеров (**паразит**) живет за счет другого (**хозяина**) и может наносить ему повреждения. Паразитизм распространен среди патогенных форм. Значительная часть паразитических симбиозов содержит микроорганизмы, обладающие способностью вызывать болезнь, или **патогенностью**. Болезнетворные (патогенные) представители имеются среди вирусов, бактерий, грибов и простейших. Микроорганизмы-возбудители одного вида могут различаться по степени патогенности (**вирулентности**). Авирулентные штаммы могут не причинять вреда организму хозяина, тогда как высоковирулентные представители, отличающиеся значительной агрессивностью, всегда вызывают заболевание. Для большинства болезнетворных микроорганизмов характерна специфичность действия: определенный вид возбудителя обычно вызывает конкретное инфекционное заболевание. Для осуществления агрессии паразит должен обладать особыми соединениями и структурами — **факторами патогенности**, каждый из которых отвечает

за конкретную стадию развития инфекционного процесса. Прикрепление паразита к клеткам макроорганизма, последующие размножение и расселение возбудителя обеспечиваются факторами адгезии и колонизации, представленными поверхностными структурами микробной клетки или вирусной частицы. С помощью факторов инвазии, часто являющихся белками наружной мембраны возбудителя, осуществляется его проникновение в ткани и клетки хозяина. За «сдерживание» иммунных реакций хозяина ответственны защитные факторы, способствующие уменьшению фагоцитоза и обеспечивающие молекулярную мимикрию возбудителя путем имитации некоторых метаболитов и структур клеток макроорганизма. Факторы агрессии (ферменты, токсины) разрушают защитную систему хозяина, ослабляют макроорганизм и способствуют распространению возбудителя. Для бактерий одним из основных факторов патогенности является синтез **токсинов**. Экзотоксины, образуемые возбудителями раневых инфекций, дифтерии, чумы, сибирской язвы, — это вещества белковой природы, обладающие свойствами ферментов. Они чрезвычайно активны и, как правило, действуют избирательно, поражая клетки определенных органов и тканей хозяина. Экзотоксины инактивируются при нагревании и при обработке рядом химических соединений, например, формалином. Некоторые экзотоксины (столбнячный, дифтерийный и т.д.) расщепляются пищеварительными ферментами, другие (ботулинический, стафилококковый) устойчивы в желудочно-кишечном тракте. Гены, кодирующие образование экзотоксинов, часто расположены на плазидах или в нуклеиновых кислотах латентных фагов. Эндотоксины, прочно связанные с бактериальной клеткой и не выделяющиеся наружу, вызывают поражения при попадании клеток в организм в больших дозах и обладают более общим действием. Это сложные в химическом отношении и достаточно устойчивые к нагреванию и действию формалина комплексы, липополисахаридная часть которых обладает токсичностью и вызывает повышение температуры тела, а белковая — отвечает за антигенные свойства. Эндотоксины являются воспалительными агентами, увеличивающими проницаемость капилляров и вызывающими разрушение клеток хозяина. Эндотоксины производят, например, возбудители брюшного тифа, гонореи, риккетсиозов. Некоторые микробные метаболиты также могут обладать токсическими свойствами. Например, при разложении белка происходит образование ядовитых аминов. Накопление таких соединений в пищевых продуктах может вызывать отравления.

Паразиты различаются степенью зависимости от хозяина. **Облигатные паразиты** наиболее тесно связаны с хозяином, который служит для них единственной средой обитания. Они наиболее тесно связаны с хозяином и никогда не осуществляют жизнедеятельность во внешней среде. Например, вирусы, в том числе бактериофаги, хламидии и риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами. **Факультативные паразиты** способны определенное время существовать во внешней среде в процессе смены хозяина или в некультивируемом состоянии. Так, *Vibrio cholerae* может длительно сохраняться в водоемах. Для **случайных паразитов** (бацилл сибирской язвы, легионелл и др.) внешняя среда является обяза-

тельной и обычной средой обитания, а при попадании в макроорганизм они могут вступать в паразитический симбиоз и убивать хозяина. Для сохранения в природе таких микроорганизмов наличие паразитической стадии не играет существенной роли.

12.2.2. Инфекционный процесс

Инфекционным процессом называют процесс взаимодействия паразита и хозяина, а происходящие при этом патологические изменения макроорганизма — инфекционным заболеванием. Протекание инфекционного заболевания — это паразитический экто- или эндосимбиоз болезнетворных микроорганизмов с многоклеточным организмом. При первой **стратегии паразитизма** развитие возбудителя приводит к выздоровлению либо к гибели хозяина. Болезнь характеризуется небольшим **инкубационным** (скрытым) **периодом** и непродолжительным течением. Длительность инфекционного процесса ограничивается защитной системой макроорганизма. Для **облигатных паразитов** в этом случае существует необходимость сохранения жизни макроорганизму на определенный срок, а передача возбудителей к новому хозяину обуславливается высокой вирулентностью. При возможности использования **переносчиков инфекции** зависимость возбудителя от живого хозяина уменьшается. При **факультативном паразитизме** высокая «заразность» не является фактором выживания и распространения возбудителя в окружающей среде, поэтому вирулентность возбудителя может колебаться, что проявляется в периодических вспышках тяжелых форм заболевания. Для **случайных паразитов** сохранение жизни хозяина не имеет значения, так как они эпизодически присутствуют в макроорганизмах. Именно поэтому инфекционный процесс, вызванный такими возбудителями, сопровождается высокой смертностью. При второй стратегии паразитизма продолжительность инфекционного процесса ограничена временем жизни макроорганизма. Хозяин не погибает и не выздоравливает. Возбудители при этом могут долго оставаться в латентном состоянии и не распознаваться защитными системами многоклеточного организма. Высоковирулентные паразиты вызывают заболевания без четкой клинической картины. Это может быть, например, неконтролируемое размножение клеток макроорганизма, как при раковых заболеваниях, значительное снижение сопротивляемости хозяина любым другим болезням или имитация неинфекционных заболеваний (язвенных, сосудистых, психических).

Причиной инфекционных заболеваний, в отличие от других болезней, являются живые возбудители. Таким заболеваниям свойственна заразность и наличие инкубационного периода развития, когда патологические изменения хозяина не имеют видимых проявлений. Возникновение и течение инфекционного процесса определяются, во-первых, присутствием патогенного микроорганизма или вируса и, во-вторых, проникновением его в восприимчивый макроорганизм и нанесением повреждений хозяину. Возбудитель, развиваясь в клетках тканей хозяина, изменяет строение и свойства клеточных структур, что может привести клетки к гибели. Отмирание клеток отдельных тканей, как правило, отражается на всем организме. Напри-

мер, вирус полиомиелита, размножаясь в нервных клетках спинного мозга, вызывает их гибель, что приводит к нарушению работы двигательных центров, параличам и атрофии мускулатуры. Характер повреждающего действия конкретного возбудителя будет зависеть от количества проникших в макроорганизм клеток и от имеющегося арсенала факторов патогенности. Например, *Corynebacterium diphtheriae* вырабатывает настолько сильный и быстро диффундирующий токсин, что даже ограниченное инфицирование возбудителем ткани глотки приводит к поражению всего организма, часто с летальным исходом. Другие возбудители оказывают повреждающее действие только при интенсивном размножении и достижении значительной плотности клеток внутри организма хозяина. Так, заболевание сибирской язвой характеризуется достижением значительной численности клеток *Bacillus anthracis* в крови больных.

Для развития инфекционного процесса необходимы также определенные условия окружающей среды. Это комплекс физико-химических параметров, биологических и социальных факторов. Наличие других микроорганизмов и вирусов, находящихся в различных отношениях с восприимчивым макроорганизмом, — это важнейший биологический фактор. Например, нормальная микробиота человека при благоприятных физиологических условиях будет препятствовать инфицированию макроорганизма. Однако ослабление хозяина при переутомлении, интоксикации, переохлаждении и т.д. может привести к тому, что условно патогенные ее представители станут способны вызывать заболевания и усугублять течение инфекционного процесса. На скорость распространения и тяжесть течения инфекционных заболеваний значительное влияние оказывают и социальные условия жизни людей.

Болезни делят на быстрые (острые) и медленные (хронические) в зависимости от продолжительности инфекционного процесса. В первом случае макроорганизм либо погибает, либо побеждает возбудителя (часто с помощью лекарств). Медленные болезни характеризуются наличием вялотекущего инфекционного процесса с периодическими обострениями, иногда в течение всей жизни организма-хозяина. Макроорганизм не погибает и не выздоравливает, однако его защитная способность постоянно понижена. Длительное **носительство** возбудителя без проявления симптомов болезни рассматривают как особую форму паразитизма. В этом случае паразит быстро распространяется в популяции хозяев. Носительство способствует выживанию тех возбудителей, которые не приводят своих хозяев к гибели.

Эпидемией называют быстрое распространение инфекционного агента среди совокупности организмов данной территории и вызванное этим существенное превышение обычного уровня заболеваемости. Если распространение инфекционного заболевания захватывает большие регионы (страны, континенты, всю планету), то говорят о **пандемии**.

12.2.3. Механизмы защиты макроорганизма от инфекции

Развитие болезни является обоюдным процессом, в котором значительную роль играет подвергшийся инфицированию макроорганизм. Он отве-

чает на воздействие паразита изменением своей жизнедеятельности. Высокоорганизованные макроорганизмы обладают целым набором способов реагирования на повреждающие воздействия. Система, противостоящая агрессии чужеродных биологических агентов, носит название **иммунитета**. Болезнь протекает тяжелее и повреждения более выраженные, если микро-организм обладает высокой патогенностью, а защитные силы хозяина ослаблены.

Защитные факторы высших животных подразделяются на три основные группы. К **неспецифическим факторам** причисляют различные защитные реакции, направленные на поддержание постоянства внутренней среды организма. Эти факторы присутствуют у макроорганизма постоянно и не зависят от наличия возбудителя. Барьерными свойствами обладает нормальная неповрежденная кожа, которая механически препятствует проникновению возбудителей. Кислые потовые выделения оказывают бактерицидное действие на многие микроорганизмы. Слизистые оболочки высших животных противостоят инфекционным агентам механически и с помощью выделяемых ими жидкостей (слюны, слизи, слезной жидкости, мокроты и т.д.). В них содержатся различные антимикробные соединения, например, лизоцим, растворяющий многие виды микробов. Значительным бактерицидным действием обладает желудочный сок, имеющий высокую кислотность. Мощным барьером для посторонних микроорганизмов является нормальная микробиота слизистых оболочек высших животных. Возбудители конкурируют с ней за питательные вещества и места прикрепления, а также подвергаются действию ее агрессивных метаболитов и антимикробных соединений. Инфекционный агент, закрепившийся на поверхности слизистых оболочек, может вызывать местные повреждения или воздействовать на другие ткани и органы путем диффузии токсических веществ. Если патогенному микроорганизму удастся проникнуть через кожу и слизистые оболочки, следующим препятствием становятся лимфатические узлы и биохимическая среда тканей организма. Так, клетки тканей выделяют особые вещества — **сидерофоры**, связывающие ионы железа и делающие его недоступным для микробных клеток. Клетки разных тканей и органов способны образовывать особые соединения, оказывающие ингибирующее действие на микроорганизмы и активирующие защитные реакции макроорганизма. Например, сыворотка крови содержит сложный комплекс белков (**комплемент**), лизирующий некоторые виды бактерий и клеток. Кроме того, комплемент принимает участие и в специфических иммунных реакциях. Бактерицидным действием в отношении разных групп микроорганизмов обладают белковые и небелковые вещества, циркулирующие в крови и тканевых жидкостях (лизины, пропердин, лейкины, абластин и др.). Проявлением неспецифической защиты служит выделительная функция различных органов, освобождающая организм от вредных факторов.

Мощной формой неспецифической защиты организма является **фагоцитоз** — процесс активного поглощения и лизиса чужеродных частиц клетками организма. Клетки, способные к фагоцитозу, находятся в крови и тканях организма и делятся на микрофагов и макрофагов (табл. 12.1).

Виды и функции фагоцитов

Вид	Подвид	Локализация	Развитие	Функция
Микрофаги	Моноциты	Циркулируют в крови	Перемещаются в очаг воспаления, превращаются в тканевые макрофаги	Фагоцитоз
	Гранулоциты	Циркулируют в крови	Перемещаются в очаг воспаления	Фагоцитоз
Макрофаги	Подвижные	Циркулируют в крови и в очаге воспаления	Образуются из моноцитов и гранулоцитов в очаге воспаления	Повышенная фагоцитарная активность
	Покоящиеся	Печень, селезенка, костный мозг, лимфатические узлы	Образуются из моноцитов и гранулоцитов	Повышенная фагоцитарная активность, структурная и выстилающая роль

Микрофаги (моноциты и гранулоциты) циркулируют в крови и входят в группу белых клеток крови (лейкоцитов). Это подвижные клетки, которые перемещаются к местам проникновения в ткани инфекционного агента благодаря хемотаксису. Хемотаксис вызывается веществами, выделяемыми тканями в ответ на повреждение. В тканях гранулоциты осуществляют фагоцитоз, а моноциты увеличиваются в размере и превращаются в макрофаги с повышенной фагоцитарной активностью. Неподвижные (покоящиеся) макрофаги выстилают полости и образуют структурную сеть в печени, селезенке, кровеносных сосудах, костном мозге и лимфатических узлах. Значительная часть возбудителей, проникших в организм, уничтожается этими фагоцитами. Процесс фагоцитоза включает несколько стадий (рис. 12.3, а). Сначала чужеродный агент прикрепляется к мембране фагоцита. Затем фагоцит формирует псевдоподии, обволакивающие частицу и сливающиеся с образованием вакуоли. Фагоцитарная вакуоль соединяется с лизосомами, содержащими литические ферменты и ферменты, способствующие образованию активных форм кислорода. Их действие приводит к полному разрушению микробных клеток. Такое развитие событий называют **завершенным фагоцитозом**.

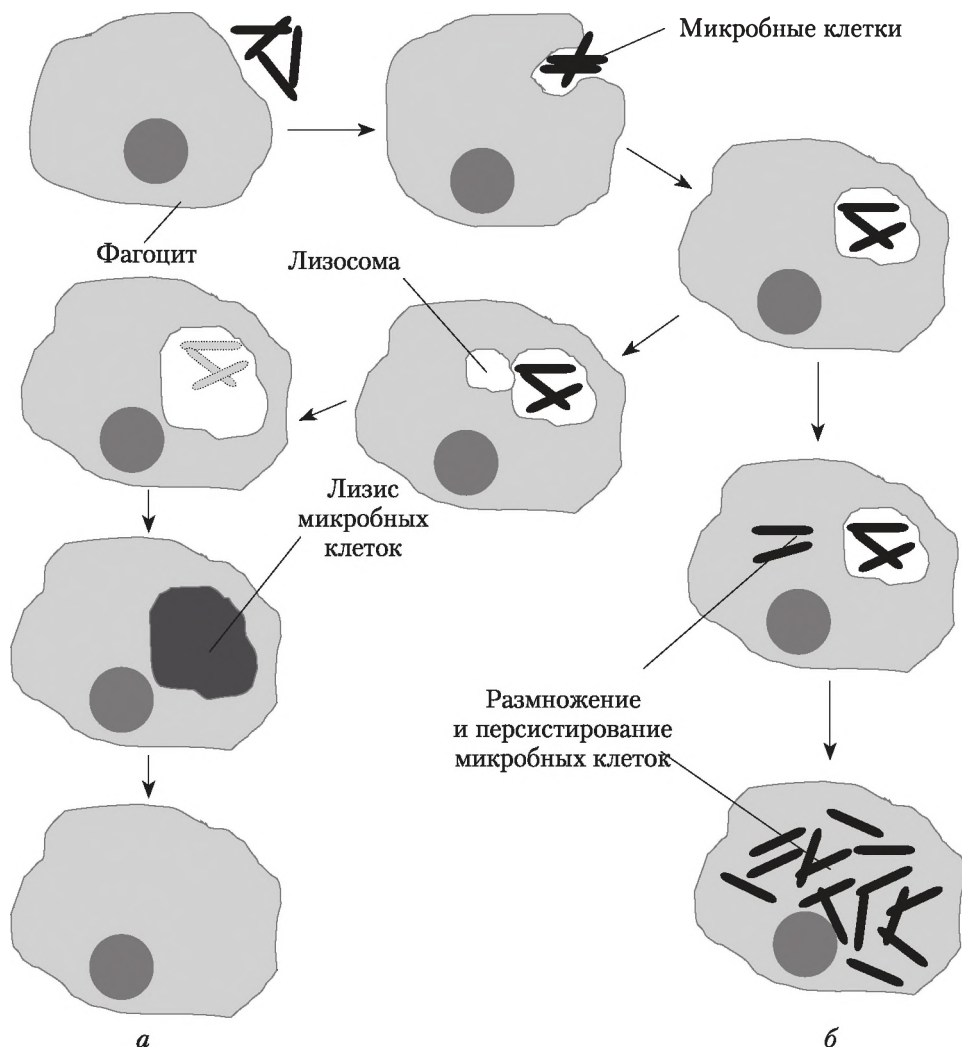


Рис. 12.3. Процессы фагоцитоза:

а — завершено; б — незавершено

При **незавершенном фагоцитозе** некоторые возбудители после поглощения фагоцитом не только не перевариваются, но и могут размножаться внутри него (рис. 12.3, б). Такой способностью обладают, например, возбудители гонореи, проказы, лейшманиоза, брюшного тифа (*Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium leprae*, *Leishmania tropica*, *Shigella typhi*) и др. Некоторые патогенные микроорганизмы устойчивы к фагоцитозу за счет образования веществ, блокирующих разные его стадии или убивающих фагоцитарные клетки. Активировать фагоцитоз могут некоторые вещества неспецифической защиты (комплемента, гистамин, серотонин), соединения, повышающие температуру организма, а также специфические иммунные реакции.

Вторую группу защитных механизмов составляют видовые факторы устойчивости к определенным возбудителям, передающиеся по наслед-

ству, или **врожденный иммунитет**. Он выражается в невосприимчивости организмов одного вида к патогенам, вызывающим болезнь у представителей других видов. Например, животные устойчивы ко многим заболеваниям человека (ветряной оспе, кори, вирусному гепатиту и др.), а человек, в свою очередь, не болеет чумой собак, куриной холерой и т.д. Врожденный иммунитет зависит от анатомо-физиологических особенностей организмов конкретного вида и сформировался в процессе эволюции самого вида и его взаимоотношений с болезнетворными микроорганизмами. Устойчивость к инфекции в этом случае обусловлена отсутствием в клетках макроорганизма рецепторов, необходимых для прикрепления и размножения возбудителя, и выработкой соединений, блокирующих разные стадии заражения.

К **специфическим факторам** защиты относятся реакции **приобретенного иммунитета**. При контакте хозяина с проникшим возбудителем запускается каскад специфических защитных реакций, именуемых **иммунным ответом**. Одной из форм иммунного ответа является **гуморальный иммунитет**. Это выработка **антител** (иммуноглобулинов) — особых белков плазмы крови, способных связывать антигены (рис. 12.4).

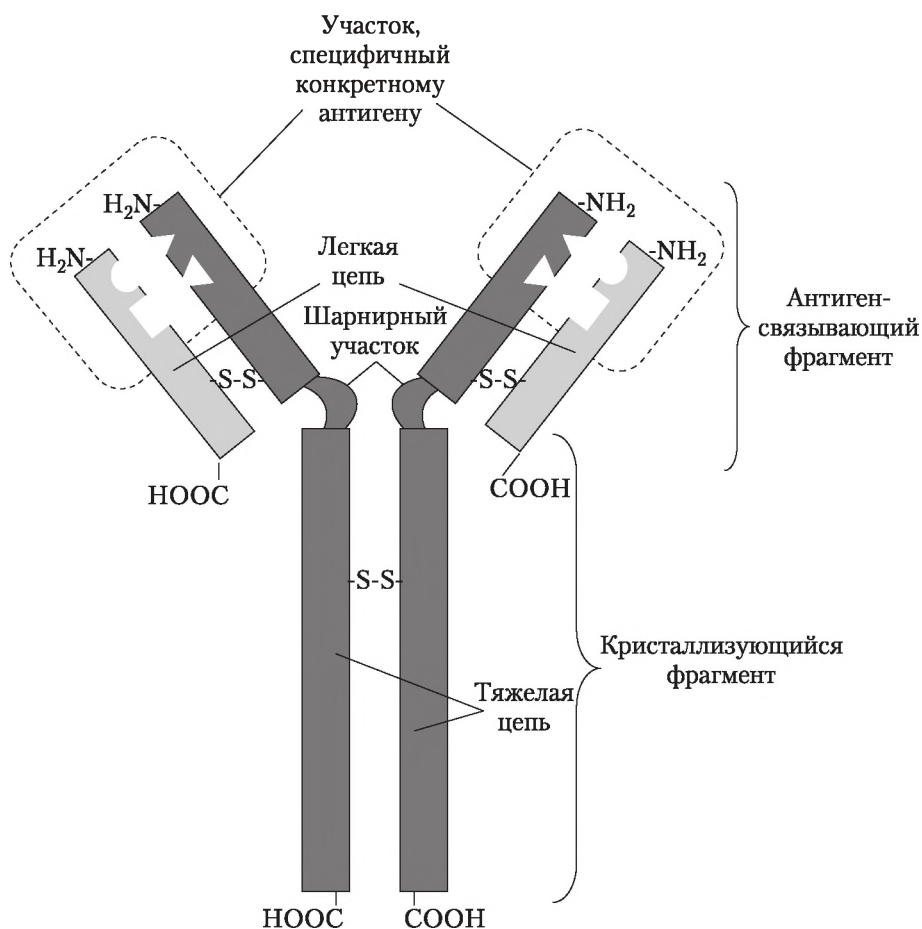


Рис. 12.4. Принципиальное строение молекулы иммуноглобулина

Антигеном называют любой генетически чужеродный фактор, обычно содержащий какой-либо белок или полисахарид. Антигены и антитела обладают строгой специфичностью, т.е. при введении в организм определенного антигена образуются антитела, способные вступать в реакцию только с ним. Второй формой иммунного ответа является **клеточный иммунитет**, т.е. образование специфических чувствительных клеток.

За иммунный ответ организма отвечает лимфоидная система, представленная многочисленными органами и тканями и распространенная по всему телу. Центральными органами человека являются костный мозг и вилочковая железа (тимус), а к периферическим относятся селезенка, лимфатические узлы, кровь и др. В костном мозге образуются лимфоидные стволовые клетки, которые дают начало предшественникам В- и Т-лимфоцитов. Лимфоциты — это один из типов белых клеток крови.

В-лимфоциты ответственны за образование антител разных классов, но с общим принципиальным строением (см. рис. 12.4). В их молекуле имеется два одинаковых участка связывания, к которым молекула антигена «подходит» как ключ к замку. Конкретный антиген, впервые попадая в организм и адсорбируясь на мембране В-лимфоцита, вызывает его размножение и образование однородной группы В-лимфоцитов, способных «узнавать» именно этот антиген. Часть таких клеток увеличивается в размерах, прекращает расти и начинает производить антитела, связывающие антигены. Эти клетки живут всего несколько дней. Связывание антител с вирусными частицами или токсинами препятствует их адсорбции на мембранах клеток хозяина. Микробные клетки в комплексе с антителами становятся значительно чувствительнее к фагоцитозу и к лизису под действием комплемента. Связывание антител с инфекционным агентом многократно активизирует неспецифические реакции хозяина. Другая часть В-лимфоцитов длительно сохраняется в лимфатических узлах и отвечает за иммунологическую память организма. Если тот же антиген попадает в организм повторно, то благодаря этим клеткам иммунная реакция развивается быстрее и эффективнее. На некоторые инфекции (натуральную оспу, корь, свинку и др.) иммунная память сохраняется пожизненно.

Т-предшественники, попадая в тимус, превращаются в **Т-лимфоциты** четырех типов, которые участвуют в регуляции выработки антител В-клетками, а также отвечают за клеточный иммунитет. При поглощении инфекционного агента макрофагами его антигены не гидролизуются, а остаются связанными с мембраной макрофага. Этот комплекс «узнают» Т-хелперы и синтезируют особые вещества, активирующие В-лимфоциты. Т-супрессоры угнетают В-лимфоциты и Т-хелперы, снижая антителообразование и замедляя иммунный ответ. Т-киллеры, связываясь с антигеном, выделяют токсические соединения, убивающие клетки, несущие этот антиген. Таким образом, развитие иммунного ответа организма — это комплексный процесс с участием трех типов лейкоцитов (рис. 12.5).

Макрофаги, захватывая инфекционный агент, помещают его антигенные части на своей поверхности и вступают в контакт с Т- и В-лимфоцитами. В-лимфоциты образуют соответствующие антитела, а Т-лимфоциты управляют скоростью антителообразования и уничтожают клетки, содержащие антиген.

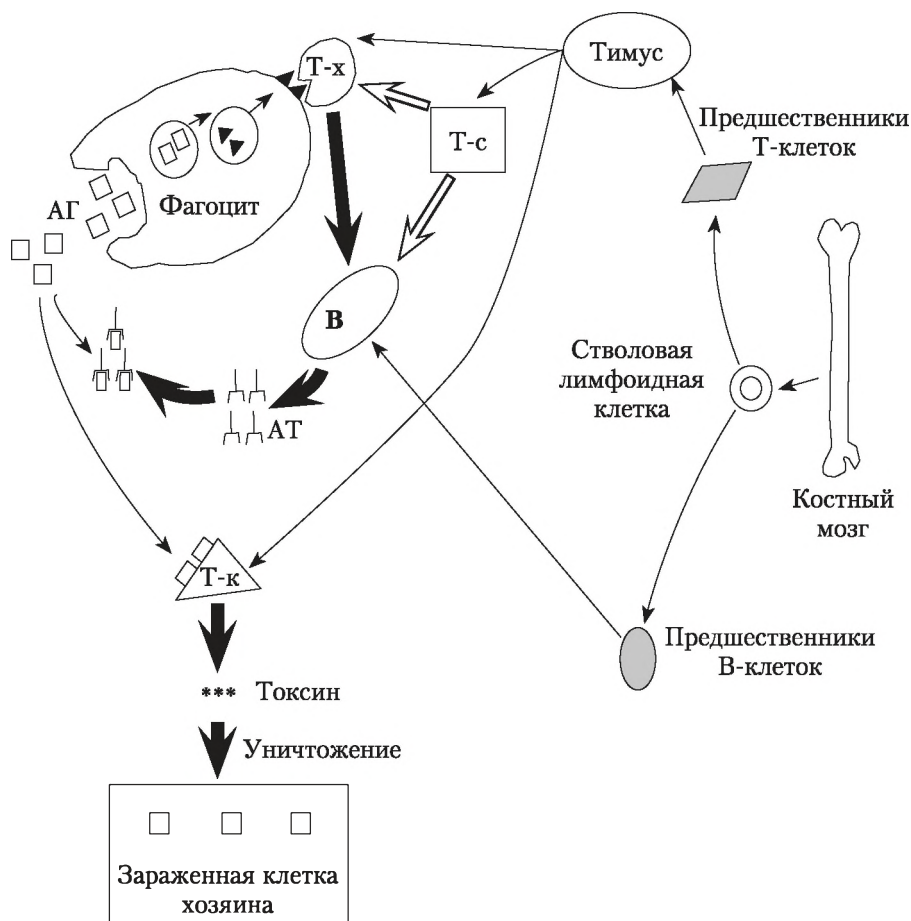


Рис. 12.5. Упрощенная схема иммунного ответа:

АГ — антигены; АТ — антитела; В — В-клетки; Т-х — Т-хелперы; Т-с — Т-супрессоры; Т-к — Т-киллеры; пояснения см. в тексте

Приобретенный иммунитет подразделяют на естественный и искусственный. Активный естественный иммунитет формируется после перенесенной болезни, а его пассивная форма приобретается новорожденным от матери в период внутриутробного развития. Активная форма искусственного иммунитета вызывается введением в организм антигенных препаратов (**вакцин**), а пассивная — готовых антител (**сывороток**).

Наиболее часто встречающимся видимым проявлением действия защитных сил организма в ответ на повреждающий фактор является воспалительный процесс (**воспаление**). Картина воспаления характеризуется возникновением красноты, отека, повышением температуры и болевыми ощущениями. К покраснению приводит расширение кровесносных капилляров и увеличение тока крови, а отек вызывается притоком жидкости в ответ на выход из сосудов растворимых белков. Поврежденные клетки выделяют особые вещества (в частности, гистамин и серотонин), привле-

кающие гранулоциты и моноциты к месту повреждения (очагу инфекции). Эти фагоциты выделяют лизосомные ферменты, разрушающие клетки поврежденных тканей. Макрофаги поглощают и переваривают микробные клетки и мертвые клетки хозяина. Лимфоциты также мигрируют к месту повреждения, при этом В-клетки образуют антитела, а Т-клетки синтезируют клеточные токсины, вызывающие некроз близлежащих тканей. Т-лимфоциты также выделяют вещества, активирующие макрофаги. Комплексы «антиген—антитело» активизируют комплемент, способный лизировать микробные клетки и клетки хозяина, несущие антигены. Отмершие ткани характеризуются пониженным содержанием кислорода и увеличенной концентрацией молочной кислоты, что для многих возбудителей является неблагоприятным. Масса мертвых клеточных остатков образует гной. Действие защитных факторов в очаге инфекции в виде возникновения воспаления в ряде случаев помогает предотвратить процесс дальнейшего распространения возбудителя внутрь организма хозяина.

Макроорганизм может обезвреживать не только сами бактериальные клетки, но и их токсины. При полном освобождении от возбудителя формируется стерильный иммунитет (например, после кори, натуральной оспы, коклюша). При некоторых длительно протекающих заболеваниях невосприимчивость связана с присутствием в организме клеток возбудителя. Такой нестерильный иммунитет отмечен при туберкулезе, проказе, сифилисе и некоторых других заболеваниях.

Иммунная система хозяина способна «узнавать» многие структуры и соединения микробной клетки, поэтому у микроорганизмов в процессе эволюции выработались механизмы «ухода» от факторов иммунитета. Образование капсул — это один из путей экранирования клеточной стенки: полисахаридные и белковые капсулы прокариот закрывают пептидогликан и липополисахариды, препятствуя активации комплемента сыворотки крови хозяина. Путем образования покрытия из некоторых сывороточных белков хозяина на поверхности своих клеток микроорганизмы могут избегать фагоцитоза. Иммунный ответ хозяина снижается, если прокариоты включают особый механизм **антигенного варьирования**, который позволяет им быстро заменять компоненты в некоторых поверхностных структурах (жгутиках, липополисахаридах, пилих, капсулах, белках клеточной стенки и т.д.). Микроорганизмы образуют ряд полифункциональных экзопродуктов, инактивирующих защитные соединения хозяина (ферменты, разрушающие комплемент, лизоцим, некоторые иммуноглобулины). Микроорганизмы могут «обманывать» иммунитет хозяина с помощью **антигенной мимикрии**, образуя молекулы, сходные с молекулами макроорганизма. Некоторые возбудители становятся менее узнаваемыми защитной системой хозяина из-за утраты или дефектности своих клеточных стенок.

У бактерий гены, кодирующие факторы патогенности и системы их выделения, располагаются тесными группами (**«островами патогенности»**) на кольцевой хромосоме. Для большинства возбудителей высказывается предположение, что «острова патогенности» являются результатом латерального переноса генов, однако механизм обмена данными участками хромосомы между бактериями остается неясным.

12.2.4. Нарушения защитных реакций макроорганизма

Ответные реакции макроорганизма на чужеродные вещества могут изменяться под влиянием различных неблагоприятных факторов. Неадекватную защитную реакцию на вещества, содержащиеся в окружающей среде, пище и лекарственных препаратах, называют **аллергией**. Последствия аллергических реакций могут быть очень опасными и приводить к значительным повреждениям организма. Часто аллергию у человека вызывает домашняя пыль, пыльца растений, шерсть и частички кожи выших животных, цитрусовые, клубника, яйца, мед, антибиотики и т.д. Антигены, способные провоцировать ненормальный иммунный ответ, носят название **аллергенов**. Обычно при первом контакте с аллергеном болезненные проявления могут быть незначительными, но формирование иммунологической памяти приводит к бурному иммунному ответу при повторном попадании в организм того же аллергена. В зависимости от механизма аллергические реакции подразделяют на несколько типов. **Гиперчувствительность замедленного типа** связана с клеточным иммунитетом, когда Т-клетки обладают повышенной активностью выделения токсинов. При этом они активируют макрофаги и привлекают их к месту проникновения аллергена в ткани. Макрофаги теряют подвижность и выбрасывают лизосомные ферменты. Токсины Т-киллеров и ферменты макрофагов вызывают обширное отмирание (некроз) тканей. Такой тип аллергии может развиваться в ответ на введение растворимых белков, некоторых инфекционных агентов (например, микобактерий туберкулеза и проказы), при пересадке органов и тканей. **Гиперчувствительность немедленного типа** проявляется сразу после введения антигена и основывается на реакции «антиген—антитело» в тканях и жидкостях организма (рис. 12.6). В развитии такого вида гиперчувствительности основную роль играет гуморальный иммунитет.

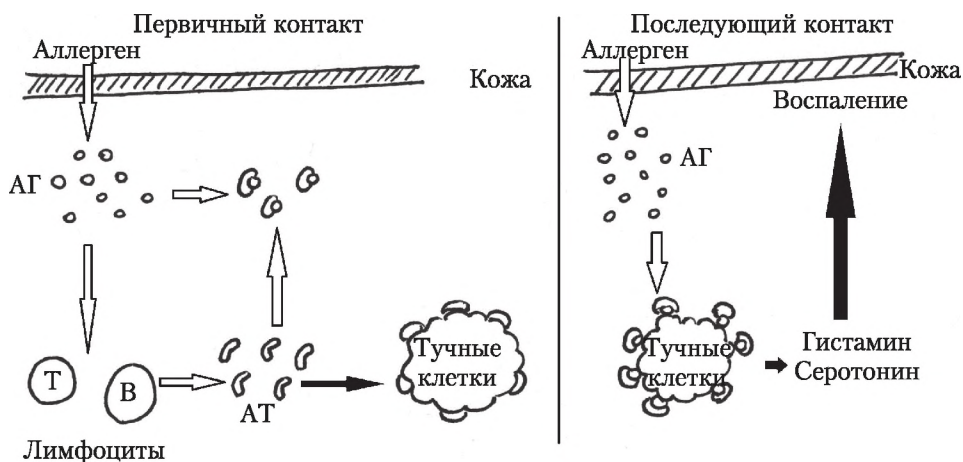


Рис. 12.6. Упрощенная схема развития гиперчувствительности немедленного типа:

АГ — антигены; АТ — антитела

В результате первичного контакта с аллергеном защитная система «запоминает» его и вырабатывает специфические антитела. Часть таких антител остается в организме, прикрепляясь к поверхности так называемых тучных клеток. При следующем контакте с тем же аллергеном он соединяется с антителами на тучных клетках, которые выбрасывают избыточные количества гистамина и серотонина. Эти вещества приводят к развитию чрезмерного воспалительного процесса. В зависимости от места аллергической реакции ее последствия могут быть разными. На коже появляется крапивница, на слизистой глаза — конъюнктивит, при поражении верхних дыхательных путей и бронхов возникают аллергический насморк, кашель и бронхиальная астма. Значительные патологические изменения у человека затрагивают сердечно-сосудистую и нервную системы, когда наблюдается картина **анафилактического шока**, при котором появляется одышка, падает температура тела, снижается артериальное давление и учащается пульс. При накоплении в крови и лимфе комплексов «антиген—антитело» к ним присоединяется комплемент, что приводит к выбросу гидролаз, повреждающих мелкие кровеносные сосуды, ткани почек и сердца. Раздражение нервных окончаний вызывает судороги и спазмы мускулатуры и дыхательной системы, в некоторых случаях заканчивающиеся смертью. Другой часто встречающейся формой гиперчувствительности немедленного типа являются **атопии**, которые зависят от выработки особых, повышающих чувствительность кожных покровов, антител, способных закрепляться на клетках различных органов человека. К atopиям относятся поллинозы (реакция на пыльцу), отек Квинке (отек лица, губ, век и гортани), крапивница (появление на коже волдырей разного размера), детская экзема (высыпания, шелушение, покраснение и кожный зуд на разных частях тела) и т.д.

Аллергические реакции имеют наследственную предрасположенность. Часто близкие родственники страдают аллергиями на одинаковые вещества.

12.2.5. Резервуары и пути проникновения возбудителей в макроорганизм

Инфекционные заболевания подразделяются на группы по вызывающим их возбудителям, природным резервуарам, способам заражения и особенностям взаимодействия возбудителя с хозяином. **Природным резервуаром** инфекционного агента называют естественную среду его обитания, обеспечивающую выживание в природе, и определяют как совокупность физико-химических и биотических факторов. В почвенном и водном резервуарах возбудители могут быть как свободноживущими, так и симбиотическими партнерами представителей почвенной и водной биоты. Природным «хранилищем» таких опасных возбудителей, как *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, представители рода *Salmonella*, считают почвенный резервуар, откуда их передача животным и человеку происходит при помощи растений, выносящих возбудителей в наземные местообитания. Болезнетворные агенты из водного резервуара (например, *Vibrio cholerae*, патогенные виды рода *Mycobacterium* и *Yersinia pseudotuberculosis*) передаются хозяевам при

потреблении воды, выносятся через водные растения и водные личинки наземных насекомых. В наземном резервуаре инфекционный агент пребывает на любой стадии развития в организме наземных животных. Связь возбудителя, хозяина, переносчика и носителя имеет устойчивый, обязательный характер. В своих природных резервуарах многие патогенные микроорганизмы могут существовать в некультивируемом состоянии.

Антропогенные преобразования многих природных экосистем привели к появлению новых **техногенных резервуаров**, которые оказались пригодными для обитания и циркуляции ряда возбудителей. Первоначально они заселяются возбудителями из природных резервуаров, однако в городах часто становятся основными. Техногенный резервуар включает системы кондиционирования воздуха, централизованного хранения и переработки продуктов, общественного питания, медицинского обслуживания и т.д. К существованию в техногенном резервуаре приспособились возбудители таких болезней, как легионеллез, микозы, кишечные, стафилококковые и стрептококковые инфекции, гепатит В, СПИД и др.

В процессе эволюции возбудители выработали специфические пути проникновения в организм хозяина (рис. 12.7).

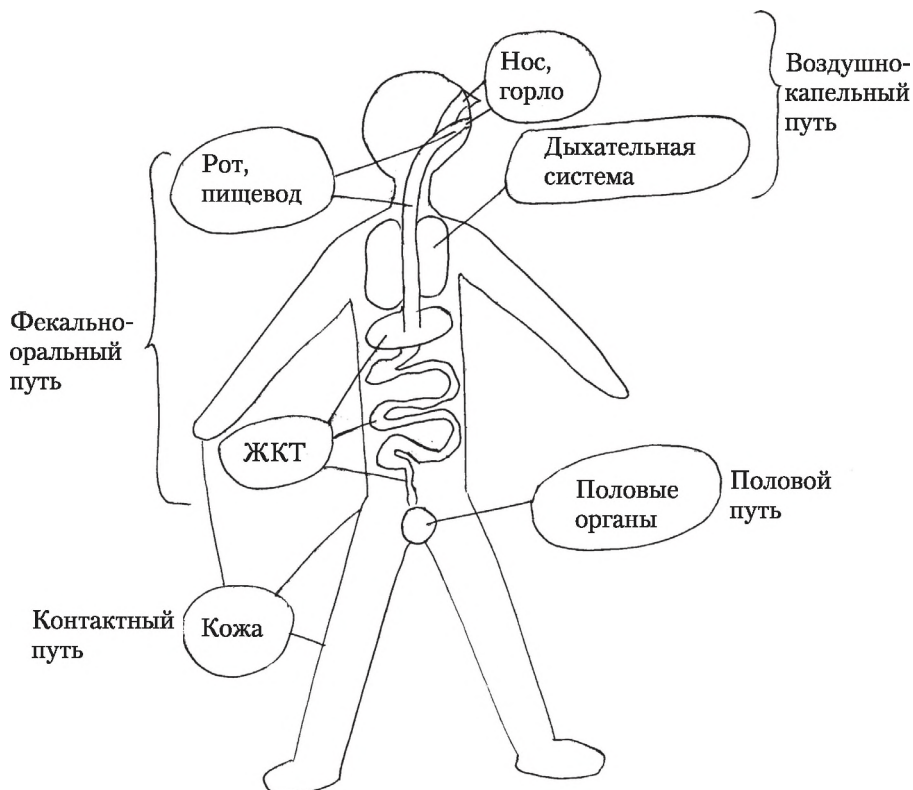


Рис. 12.7. Основные пути проникновения инфекции в организм человека

Фекально-оральный путь подразумевает выведение инфекционных агентов в окружающую среду из организма больного с фекалиями и попа-

дание к новому хозяину через рот. Такой путь проникновения характерен для возбудителей брюшного тифа, дизентерии, холеры, сальмонеллеза, пситтакоза, кандидоза, гепатита и др. При сбросе сточных канализационных вод в водоемы, из которых осуществляется снабжение питьевой водой, заражение происходит при применении этой воды для пищевых целей. Больные со стертыми симптомами болезни или здоровые носители передают возбудителей новым хозяевам через продукты или воду. Особенно опасно носительство у работников общественного питания, торговли, водоснабжения и медицинского обслуживания, так как попадание инфекционного агента от них на пищевые продукты, воду или лекарственные средства может привести к заражению большого количества людей. Существенно снизить вероятность передачи возбудителя фекально-оральным путем помогает соблюдение правил личной гигиены (в частности, мытье рук с мылом после посещения туалета, борьба с переносчиками — комнатными мухами, перелетающими с фекалий на пищевые продукты). К заражению человека сальмонеллезом может привести употребление в пищу неправильно обработанного мяса крупного рогатого скота, домашней птицы и яиц, если животные являются носителями сальмонелл. Отдельную группу кишечных заболеваний составляют **токсикоинфекции** (пищевые отравления), которые возникают при употреблении в пищу продуктов, содержащих токсины микроорганизмов. В этом случае заболевший человек не является заразным, так как распространение заболевания связано с распространением содержащих токсины продуктов. Например, развитие *Clostridium botulinum* в неправильно приготовленных консервах приводит к образованию сильнейшего ботулинического токсина, попадание которого в организм с пищей может в зависимости от дозы вызвать тяжелое отравление, слепоту и смерть человека. Частой причиной пищевых токсикоинфекций становится токсин стафилококка *Staphylococcus aureus*, попавшего в продукты с рук персонала предприятий пищевой промышленности.

Воздушно-капельный путь передачи возбудителя предполагает выброс инфекционных агентов в воздух с капельками слюны при разговоре, кашле и чихании больного и проникновение в организм окружающих при дыхании. Этим путем распространяются возбудители чумы, дифтерии, туберкулеза, менингита, гриппа, кори, свинки и некоторых системных микозов. Простым приемом, замедляющим распространение воздушно-капельных инфекций, служит ношение фильтрующих воздух масок.

Некоторые инфекционные агенты могут проникать через кожу или слизистые оболочки при непосредственном контакте с больным человеком или животным. Например, заражение сибирской язвой, туляремией и бруцеллезом происходит через поврежденные кожные покровы при работе с домашними и дикими животными. Грибы-возбудители дерматомикозов, вирусы герпеса, краснухи, оспы проникают в организм через кожу при непосредственном контакте с больным. Частным случаем **контактной** передачи патогенных микроорганизмов является **половой путь**, когда возбудители венерических заболеваний (гонореи, сифилиса, трихомониаза) проникают через слизистые половых органов или при внутриутробном развитии.

Инфекционные агенты, передающиеся контактным способом, не способны длительно существовать вне организма хозяина.

Возбудители чумы, туляремии, сыпного тифа, трипаносомозов, лейшманиозов, малярии, вирусы бешенства и некоторых лихорадок, проникающие в организм **через укусы** животного-переносчика, могут существовать в двух и более хозяевах. Основными переносчиками служат вши, клещи, блохи, комары. Контролируя распространение животных-переносчиков, не допускают дальнейшего развития болезни.

Попадание возбудителей в **открытые раны** является обычным, но нерегулярным способом их проникновения в организм. Раневая поверхность представляет собой благоприятную среду для развития многих, в том числе болезнетворных микроорганизмов, которые становятся для человека случайными паразитами. В раны могут попадать почва, вода, куски одежды, загрязненные почвенными и водными микроорганизмами — представителями родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* и членов семейства *Enterobacteriaceae*. В глубоких ранах при затруднении доступа кислорода часто развиваются протеолитические клостридии — возбудители столбняка и газовой гангрены, синтезирующие сильные экзотоксины. Так, нейротоксин *Clostridium tetani* поражает нервные окончания и вызывает спазм всей мускулатуры, приводящий к смерти. Растворимые токсины *Clostridium histolyticum* способствуют отмиранию тканей вокруг раны, что приводит к активизации маслянокислого и ацетонобутилового брожения с обильным выделением водорода. Дальнейшее размножение клостридий вызывает распространение процесса некротизации тканей вплоть до гибели организма.

Резюме

В природных условиях микроорганизмы вступают в различные взаимодействия с животными. Высший организм становится для микробных клеток особой экологической нишей, через которую они взаимодействуют с внешней средой. При взаимовыгодном мутуалистическом симбиозе макроорганизм предохраняет внутреннюю и полостную микробиоту от неблагоприятных условий внешней среды и создает постоянство физико-химических параметров микробного местообитания. Микробиота помогает хозяину эффективней использовать питательные вещества, защищает его от ядовитых соединений и препятствует внедрению патогенных микроорганизмов. Часто мутуалистический симбиоз основывается на балансе между агрессивными и защитными функциями партнеров, когда часть клеток популяции симбионтов лизируется и используется как питание. Примерами эволюционно сложившихся мутуалистических симбиозов являются ассоциации водных животных с фотобактериями, муравьев-листорезов с актиномицетами и плесневыми грибами, термитов с целлюлозолитическим микробным сообществом, жвачных животных с микробиотой рубца и человека с его нормальной микробиотой. В процессе совместной эволюции партнеров в большинстве случаев отношения в этих симбиозах сложи-

лись настолько тесные, что животные не могут полноценно существовать без микропартнеров, которые практически представляют собой особый «сборный орган» макроорганизма.

Паразитизм распространен среди патогенных форм. Процесс взаимодействия паразита и хозяина называют инфекционным процессом. Для реализации патогенных свойств паразит должен обладать факторами патогенности. При первой стратегии паразитизма развитие паразитов, характеризующееся небольшим инкубационным периодом и непродолжительной болезнью, приводит к выздоровлению либо к гибели хозяина. Вторая стратегия паразитизма характеризуется инфекционным процессом, при котором хозяин не погибает и не выздоравливает. Его продолжительность ограничена временем жизни макроорганизма.

Инфекционные заболевания вызваны живыми возбудителями. Этим болезням свойственны заразность и наличие инкубационного периода развития. Микроорганизм, размножаясь в клетках тканей хозяина, изменяет строение и свойства клеточных молекул и структур. В зависимости от арсенала факторов патогенности конкретного возбудителя характер его повреждающего действия будет зависеть от количества проникших в макроорганизм клеток. Для взаимодействия возбудителя и хозяина требуются также определенные физико-химические параметры, а также биологические и социальные факторы. Социальные условия жизни людей оказывают значительное влияние на скорость распространения и тяжесть течения инфекционных заболеваний. Нормальная микробиота человека при благоприятных физиологических условиях будет препятствовать инфицированию макроорганизма патогенными микроорганизмами. Болезнь протекает тяжелее и повреждения более выраженные, если микроорганизм обладает высокой патогенностью, а защитные силы хозяина ослаблены.

Система высшего организма, противостоящая агрессии чужеродных биологических агентов, носит название иммунитета. К неспецифическим факторам причисляют различные защитные реакции, направленные на поддержание постоянства внутренней среды организма. Эти факторы присутствуют у макроорганизма постоянно и не зависят от наличия возбудителя. Мощной формой неспецифической защиты организма является фагоцитоз. Значительная часть возбудителей, проникших в организм, уничтожается фагоцитами. При незавершенном фагоцитозе некоторые возбудители после поглощения фагоцитом не только не перевариваются, но и могут размножаться внутри него. Некоторые патогенные микроорганизмы устойчивы к фагоцитозу за счет образования веществ, блокирующих разные его стадии или убивающих фагоцитарные клетки. Вторую группу защитных механизмов составляет врожденный иммунитет. К специфическим факторам защиты относятся реакции приобретенного иммунитета. При контакте хозяина с проникшим возбудителем запускается каскад специфических защитных реакций (иммунный ответ). Одной из форм иммунного ответа является гуморальный иммунитет (выработка антител). Антигены и антитела обладают строгой специфичностью. Второй формой иммунного ответа является клеточный иммунитет (образование специфических чувствительных клеток). За иммунный ответ организма отвечает лимфоидная система.

В-лимфоциты ответственны за образование антител разных классов. Связывание антител с инфекционным агентом многократно активизирует неспецифические реакции хозяина. Т-лимфоциты участвуют в регуляции выработки антител В-клетками, а также отвечают за клеточный иммунитет. Развитие иммунного ответа организма — это комплексный процесс с участием трех типов лейкоцитов. Макрофаги, захватывая инфекционный агент, помещают его антигенные части на своей поверхности и вступают в контакт с Т- и В-лимфоцитами. В-лимфоциты образуют соответствующие антитела, а Т-лимфоциты управляют скоростью антителиобразования и уничтожают клетки, содержащие антиген. Активный естественный иммунитет формируется после перенесенной болезни, а его пассивная форма приобретает новорожденным от матери в период внутриутробного развития. Активный искусственный иммунитет вызывается путем введения в организм антигенных препаратов, а пассивный — готовых антител.

Неправильную защитную реакцию на вещества, содержащиеся в окружающей среде, пище и лекарственных препаратах, называют аллергией. Обычно при первом контакте с аллергеном болезненные проявления могут быть незначительные, но формирование иммунологической памяти приводит к бурному иммунному ответу при повторном попадании в организм того же аллергена. Гиперчувствительность замедленного типа связана с клеточным иммунитетом, когда Т-клетки обладают повышенной активностью выделения токсинов. В развитии гиперчувствительности немедленного типа основную роль играет гуморальный иммунитет. Аллергические реакции имеют наследственную предрасположенность.

Природным резервуаром болезнетворного агента называют совокупность физико-химических и биотических факторов, являющихся естественной средой обитания патогена и обеспечивающих его выживание в природе. Различают четыре основных типа природных резервуаров: почвенный, водный, наземный и техногенный. Многие патогены могут пребывать в своем природном резервуаре в некультивируемом состоянии. Инфекционные агенты сформировали особые формы переноса и проникновения в организм хозяина. Возбудители могут выходить в окружающую среду из организма больного с фекалиями, а попадать к новому хозяину через рот с пищей или водой, загрязненными фекалиями. Переносчиком возбудителей часто служит комнатная муха, перелетающая с фекалий на пищевые продукты. Токсикоинфекции возникают при употреблении в пищу продуктов, содержащих токсические вещества микроорганизмов. При этом заболевший человек не является источником инфекции, распространение заболевания связано с распространением несущих токсины продуктов. При передаче возбудителя воздушно-капельным путем инфекционные агенты выбрасываются в воздух в капельках слюны больного и попадают в организм окружающих при дыхании. Некоторые инфекционные агенты способны проникать через кожу или слизистые при непосредственном контакте с больным человеком или животным. Возбудители заболеваний, проникающие в организм через укус животного — носителя, могут существовать в двух и более хозяевах. Нерегулярным способом проникновения возбудителей в организм является их случайное попадание в открытые раны.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Как вы думаете, могут ли микробные сообщества существовать на Земле без более высокоорганизованных живых существ и почему?
2. Какой способ питания характерен для облигатных паразитов?
3. Какие функциональные группы микроорганизмов населяют рубец жвачных?
4. Какая группа микроорганизмов в норме отсутствует в сообществе ЖКТ человека по сравнению с микробиотой рубца?
5. Для чего служит отрыгивание пищевого комка у жвачных животных?
6. Чем питаются микроорганизмы, населяющие кожу человека?
7. Что может происходить с патогенными микроорганизмами, попавшими извне в ЖКТ в норме и при патологии?
8. Чем опасно явление дисбактериоза?
9. Сравните факторы, влияющие на сохранение облигатных, факультативных и случайных паразитов.
10. Какая стратегия паразитизма более опасна в современной ситуации? Обоснуйте свой ответ.
11. Назовите факторы возникновения и развития инфекционного процесса.
12. Как взаимодействуют неспецифические и специфические факторы иммунитета?
13. Почему фагоцитоз относится к неспецифическим факторам защиты?
14. Как взаимодействуют В- и Т-лимфоциты при иммунном ответе?
15. Почему воспаление считают полезным явлением?
16. Чем опасна аллергия?
17. Почему в городах техногенные резервуары возбудителей приобретают наибольшее значение?
18. Предложите мероприятия, предотвращающие распространение болезней, возбудители которых передаются фекально-оральным, воздушно-капельным и контактным путями.

Семинар 1

Нормальная микробиота, дисбактериоз и способы коррекции нарушений микробных сообществ человека

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Моделирование распространения инфекции воздушно-капельным путем

Цель работы: путем имитации процессов, происходящих при чихании или кашле, студенты могут узнать, как микроорганизмы, в том числе патогенные, распространяются по воздуху. При выполнении работы они докажут, что даже самые простые гигиенические приемы (прикрытие рта рукой или платком, ношение респираторных масок) эффективны для снижения количества выбрасываемых в воздух микроорганизмов.

Общим путем передачи таких инфекций, как грипп, ангина и другие простудные заболевания, является формирование аэрозолей, которые возникают при кашле или чихании. По данным английских исследователей, скорость выдыхания воздуха при чихании может достигать 200 км/ч. Чихание возникает при раздражении нервных окончаний, проходящих через мукозные оболочки полости носа, и является рефлекторным способом очистить носовые ходы от раздражающих их объектов (пыли, клеток микроорганизмов, спор грибов, мелких неживых частиц). В данном эксперименте в качестве модельного объекта используют пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), которые непатогенны для человека. Для воспрепятствования распространению микроорганизмов воздушно-капельным путем следует прикрывать рот. Действенность этого приема также продемонстрирует предлагаемый эксперимент.

Необходимые материалы (количество рассчитывается в зависимости от числа студентов в группе): культура пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на скошенном сусло-агаре (СА), микробиологические петли, стерильная водопроводная вода в колбах, чашки Петри со стерильным СА, приготовленные лаборантом, пульверизаторы, резиновые перчатки, рулетка, маркеры, бумажная липкая лента.

В начале опыта готовят густую суспензию дрожжей в теплой стерильной воде, которую тщательно перемешивают и помещают в стерильный пульверизатор. Чашки Петри со стерильным СА помечают маркером в соответствии с их позициями на схеме (рис. 12.8).

Площадь пола для эксперимента размечают с помощью бумажной липкой ленты и помещают подписанные закрытые чашки с СА на предназначенные им места. Далее снимают с каждой чашки крышку и кладут ее в перевернутом виде рядом с чашкой (с чашки, стоящей в 60 см позади точки разбрызгивания, крышку нужно снять первой). После этого нужно быстро, но осторожно вернуться за периметр разметки. Затем встают на точку разбрызгивания, хорошо перемешивают суспензию дрожжей в пульверизаторе и, держа его на уровне груди, разбрызгивают суспензию путем одного полного нажатия в прямом направлении (к точке 8 на рис. 12.8). Через 10–15 с (для осаждения клеток из аэрозоля) чашки закрывают находящимися рядом крышками (на чашку, стоящую в 60 см позади точки 0, крышку нужно положить последней). На одну чашку с СА (контроль 1) делают тест-разбрызгивание с расстояния 20–30 см. Чашки помещают на инкубацию при комнатной температуре на 24 ч.

Следующую партию чашек Петри со стерильным СА подписывают, добавляя к обозначению позиции слово «перчатка». Чашки помещают на предназначенные им места, снимают с них крышки и кладут их рядом в перевернутом виде. С чашки, стоящей в 60 см позади точки разбрызгивания, снимать крышку нужно первой. После этого быстро, но осторожно возвращаются за периметр разметки и встают на точку разбрызгивания. Помещают руку в резиновой перчатке на 5–7 см впереди пульверизатора, имитируя прикрытие рта при чихании. Хорошо перемешав суспензию дрожжей и держа пульверизатор на уровне груди, разбрызгивают суспензию путем одного полного нажатия в прямом направлении (к точке 8

Таблица 12.2

Рост дрожжей при распылении суспензии без перчатки

Положение чашки, см (°, номер на рис. 12.8)	Число колоний на чашке
30 – центр (2)	
60 – центр (3)	
90 – центр (4)	
120 – центр (5)	
150 – центр (6)	
180 – центр (7)	
210 – центр (8)	
60 – 45 направо (9)	
90 – 45 направо (10)	
60 – 45 налево (11)	
90 – 45 налево (12)	
60 – 90 направо (13)	
90 – 90 направо (14)	
60 – 90 налево (15)	
90 – 90 налево (16)	
60 – назад от точки разбрызгивания (1)	

Таблица 12.3

Рост дрожжей при распылении суспензии с перчаткой

Положение чашки, см (°, номер на рис. 12.8)	Число колоний на чашке
30 – центр (2)	
60 – центр (3)	
90 – центр (4)	
120 – центр (5)	
150 – центр (6)	
180 – центр (7)	
210 – центр (8)	
60 – 45 направо (9)	
90 – 45 направо (10)	
60 – 45 налево (11)	
90 – 45 налево (12)	
60 – 90 направо (13)	

Положение чашки, см (°, номер на рис. 12.8)	Число колоний на чашке
90 — 90 направо (14)	
60 — 90 налево (15)	
90 — 90 налево (16)	
60 — назад от точки разбрызгивания (1)	

Эксперимент можно усложнить, показав, что ладонь, которой прикрывают рот при чихании и кашле, становится источником заражения при контакте с другими объектами. Разделившись на группы по 10 человек, студенты надевают резиновые перчатки на правую руку. После прикрытия пульверизатора рукой в перчатке и распыления суспензии дрожжей первый студент должен пожать этой рукой руку в перчатке одному из оставшихся девяти человек. Этот студент пожат руку следующему, и так до девятого. Студенты должны крепко прижимать ладони друг к другу. После обмена рукопожатиями руки в перчатках прижимают к поверхности СА в чашках Петри большого диаметра (20—25 см) и нумеруют их от 1 до 9. После инкубации при комнатной температуре в течение 1—2 сут. чашки просматривают и делают вывод, насколько далеко распространяется инфекция после рукопожатия с «зараженной» ладонью и что после прикрытия рукой рта при чихании руки надо немедленно вымыть с мылом или протереть дезинфицирующими салфетками во избежание распространения возбудителей через рукопожатия.

Лабораторная работа 2

Моделирование распространения инфекции контактным путем

Цель работы: путем имитации процессов, происходящих при рукопожатиях или прикосновениях, студенты могут узнать, как микроорганизмы, в том числе патогенные, распространяются контактным путем. При выполнении работы они докажут, что даже самые простые гигиенические приемы (мытьё рук с мылом, протирание антибактериальными салфетками) эффективны для снижения количества передаваемых через рукопожатие микроорганизмов.

Многие болезни передаются в результате прямого контакта между больным и здоровым человеком (через рукопожатия, поцелуи, сексуальные контакты), а также через зараженную пищу, общие столовые приборы и другие объекты, к которым прикасался больной человек. В данном эксперименте использована модельная система, где в качестве «возбудителя» применены пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), которые не вызывают болезни человека, и показано, как рукопожатия с инфицированным человеком приводят к быстрому распространению инфекции. Продемонстрировано также, каким образом мытьё рук может препятствовать передаче возбудителя в группах людей.

Необходимые материалы (количество рассчитывается в зависимости от числа студентов в группе): культура пекарских дрожжей *Saccharomyces*

cerevisiae на скошенном сусло-агаре (СА), микробиологические петли, стерильное сусло по 100 мл в качалочных колбах, стерильная водопроводная вода в колбах, чашки Петри со стерильным СА, приготовленные лаборантом, ватные тампоны или ватные палочки, маркеры, газовые горелки (спиртовки), мыло, дезинфицирующие салфетки.

Перед постановкой эксперимента стерилизуют в автоклаве при 1,0 ати ватные тампоны или ватные палочки, помещенные в жестяные пеналы или стеклянные банки. В начале опыта готовят густую суспензию дрожжей в теплой стерильной воде, которую тщательно перемешивают. Можно предварительно подрастить культуру дрожжей, посеяв клетки петлей со скошенного СА в качалочные колбы со 100 мл стерильного сусла и инкубируя колбы на качалке при 30°C в течение 1–2 сут.

Студенты должны тщательно помыть руки с мылом и разбиться на группы по четыре человека с номерами от 1 до 4. Первый студент из каждой группы смачивает стерильный тампон (ватную палочку) в суспензии дрожжей и протирает им ладонь своей правой руки. Затем он должен пожать правую руку студенту под номером 2 из своей группы, тот, в свою очередь, должен пожать правую руку студенту под номером 3, который пожимает правую руку студенту под номером 4 из своей группы. Рукопожатия должны быть крепкими, с полным прижатием ладоней друг к другу.

Затем каждый студент протирает ладонь своей правой руки смоченным в стерильной воде стерильным тампоном (ватной палочкой), держа его в левой руке, и сразу же около пламени газовой горелки (спиртовки) открывает крышку чашки Петри со стерильным СА и проводит по поверхности агара непрерывный зигзагообразный штрих (рис. 12.9).

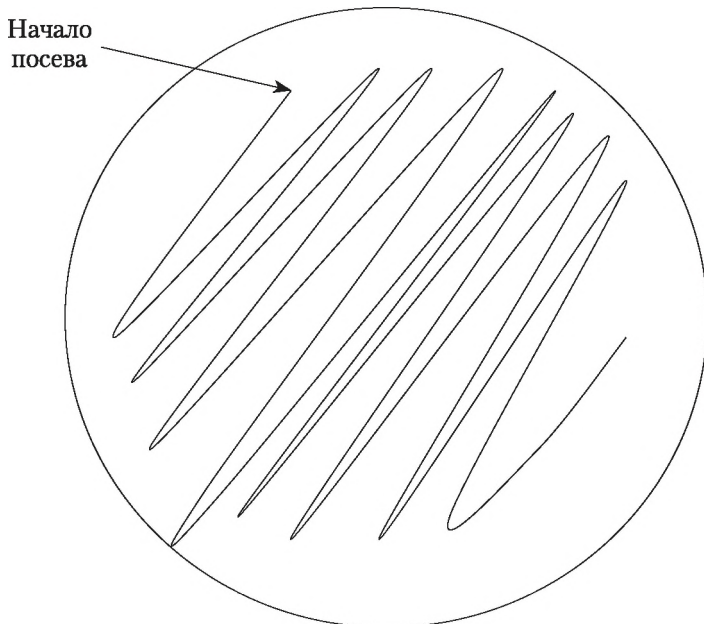


Рис. 12.9. Движение тампона (ватной палочки) при посеве на поверхность СА в чашке Петри

После этого руки тщательно моют с мылом. Чашки с посевами закрывают, маркируют и ставят на инкубацию на 1—2 сут. при 30°C.

Во второй части опыта повторяют процедуру рукопожатий в группе, однако после них нужно правые руки студентов тщательно вымыть с мылом или протереть дезинфицирующими салфетками и только после этого брать смывы с правых рук стерильными тампонами (ватными палочками) и осуществлять посев на СА в чашках Петри, как описано ранее. Вторую партию чашек с посевами также маркируют и ставят на инкубацию на 1—2 сут. при 30°C.

После инкубации сравнивают рост дрожжей в чашках от 1 до 4 в обеих партиях, а также одноименные чашки в первой и второй партии. Делают выводы о возможности распространения «инфекции» контактным путем и об эффективности мытья рук для пресечения передачи «возбудителя». Отмечают наличие в некоторых чашках колоний, отличающихся от дрожжевых.

Глава 13

МИКРООРГАНИЗМЫ И РАСТЕНИЯ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- принципы создания и существования симбиозов микроорганизмов с растениями;

уметь

- выявлять различные симбиотические отношения микробов с растениями;

владеть

- навыками контроля роста микроорганизмов в симбиозах с растениями.
-

13.1. Мутуалистические симбиозы

13.1.1. Особенности микробно-растительных симбиозов

Микробно-растительные взаимодействия основываются как на обмене продуктами метаболизма, так и на предоставлении комфортного жизненного пространства для партнеров. Микроорганизмы играют существенную роль в процессах почвообразования, т.е. они во многом создают среду обитания для растений. Необходимые для роста и развития растений соединения возвращаются в окружающую среду благодаря разложению микроорганизмами сложных биологических полимеров (в частности, гумуса). В процессе связывания молекулярного азота, свойственного только прокариотам, почва обогащается доступными для растений азотными соединениями. Грибы и бактерии, обладающие мощными фосфатазами, способны обеспечивать растения соединениями фосфора. На скорость роста растений оказывают влияние специфические микробные метаболиты. В свою очередь, поверхностные и внутренние структуры растений, их мертвые остатки, а также различные прижизненные выделения могут быть источником питания и средой обитания для микроорганизмов, получающих пространство для роста, возможность перемещения и распространения вместе с частями растений, а в ряде случаев и защиту от внешних воздействий. Иногда растения образуют специальные органы и структуры, в которых обитают их микросимбионты. Выделение растениями веществ-аттрактантов или репеллентов приводит к **сукцессии** микробных ассоциаций.

Микробно-растительные взаимоотношения устанавливаются уже на стадии образования семени, оболочка, а часто и внутренние структуры которого уже несут клетки или покоящиеся формы микроорганизмов. Среди них наиболее часто встречаются представители таких родов аэробных и анаэробных бактерий, как *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptomyces* и др., а также грибов,

относящихся к родам *Aspergillus*, *Botrytis*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Puccinia*, *Trichothecium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Ustilago* и др., среди которых есть и фитопатогенные. Несмотря на замедленный метаболизм, микроорганизмы и структуры семени постоянно находятся под взаимным влиянием продуктов обмена веществ. При прорастании семени в благоприятных физико-химических условиях метаболические процессы в нем и в микробной популяции, с ним связанной, значительно активизируются. Метаболиты, выделяемые как микроорганизмами, так и семенем, обладают определенной специфичностью, стимулируя или сдерживая рост различных групп микроорганизмов и влияя на процессы роста и развития молодого растения. Кроме того, при образовании проростка часть популяции микроорганизмов механически выносятся из почвы в воздушную среду. Поэтому при анализе взаимоотношений растений и микроорганизмов их традиционно делят на внутрипочвенные и надземные. Мицелиальные микроорганизмы в симбиозе с растительными корнями способны освоить большее пространство почвы для питания. Ряд микроорганизмов путем выделения антимикробных субстанций может сдерживать колонизацию и инфицирование различных частей растения фитопатогенными микроорганизмами.

13.1.2. Ризосфера

Развивающаяся корневая система, проникая вглубь почвы, вступает во взаимодействие с почвенными микроорганизмами, животными и корнями других растений. Вокруг корня формируется особый экзосимбиоз — так называемая **ризосфера**. Это окружающее корень пространство почвы (примерно от 0 до 8 мм в диаметре), характеризующееся более высокой, иногда на порядок, плотностью микроорганизмов. Пространство поверхности корня часто определяют как отдельное местообитание микроорганизмов, называемое **ризопланой**. При колонизации поверхности корня микроорганизмами могут быть задействованы специальные механизмы прикрепления.

Стимуляция роста микробного сообщества ризосферы происходит за счет продуктов жизнедеятельности корневой системы растения (корневых депозитов, ризодепозитов). В виде корневых депозитов «теряется» более 40% углерода, зафиксированного в процессе фотосинтеза. Наиболее интенсивная «утечка» таких веществ происходит в зоне растяжения корня при его росте. **Ризодепозиты** состоят из корневых экссудатов (выделений), высокомолекулярных метаболитов и утраченных частей растения (слизающихся клеток, отмерших участков корня, корневого чехлика и т.д.). **Корневые экссудаты** представляют собой низкомолекулярные органические вещества (сахара, спирты, органические и аминокислоты, витамины, гормоны и т.д.), а высокомолекулярные метаболиты включают полисахаридные и белковые слизи и ферменты. В присутствии потенциальных патогенных микроорганизмов некоторые растения образуют фитоалексины, обладающие специфической антимикробной активностью. Растение также способствует изменению физико-химических условий среды обитания микроорганизмов, оказывая механическое воздействие на почву, выводя через свою сосудистую систему ряд газов (например, метан на рисовых

чеках) и транспортируя кислород в анаэробные участки почвы вокруг корня. Развиваясь на корневых депозитах растения, ризосферные микроорганизмы в процессе метаболизма и после отмирания микробных клеток образуют питательные вещества в формах, доступных для использования растениями. Состав и количественные соотношения компонентов микробного сообщества ризосферы зависят как от вида растения, так и от места его произрастания. При росте растений в местах с низким содержанием связанного азота повышается значение азотфиксирующих ризосферных бактерий родов *Azotobacter*, *Azospirillum* и *Azoarcus*, осуществляющих ассоциативную азотфиксацию.

Создание корневой системой растения благоприятной среды обитания для микроорганизмов путем повышения уровня питательных веществ приводит не только к увеличению численности микробной популяции, но иногда и к заметным изменениям в составе микробного сообщества. Так, стрептомицеты, способные к антибиотикообразованию, способны успешно колонизировать ризосферу, поскольку они могут конкурировать с быстрорастущими ризосферными бактериями, такими как псевдомонады и бациллы. К тому же прокариоты с мицелиальной организацией могут осваивать более сухие почвы эффективнее, чем одноклеточные формы, которым для осуществления движения необходима водная пленка. **Сообщество ризосферы** всегда включает простейших и нематод, которые привлекаются высоким уровнем развития бактерий и грибов в этой области почвы.

Микроорганизмы в почве, где отсутствуют корни растений, концентрируются на поверхности органического материала и отличаются слабой метаболической активностью из-за ограниченной доступности питательных веществ. При сосуществовании в ризосфере происходит взаимная «подстройка» жизнедеятельности макро- и микросимбионтов. При росте корня сквозь почву вокруг кончика увеличивается содержание доступных питательных веществ за счет корневых выделений, что способствует активизации микробного роста и высвобождению доступных для растения форм азотных соединений. Возросшая численность микроорганизмов ризосферы привлекает почвенных простейших, которые питаются микробными клетками, при этом треть «бактериального азота» выделяется в аммонийной форме и часть аммония поглощается растущим корнем. Микроорганизмы также образуют ферменты, способствующие минерализации сложных органических соединений до простых форм, доступных растениям. Они оказывают влияние на растение и путем синтеза стимуляторов роста (например, гиббереллинов), которые воздействуют на морфологию и физиологию растения, а также других специфических метаболитов, например, этилена, вызывающего раннее цветение. В присутствии патогенных микроорганизмов ризосферы, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* и др., могут синтезировать различные **биоконтролирующие агенты** (антибиотики, ферменты, сидерофоры и др.), подавляющие рост нежелательной микробиоты.

Ризосферный симбиоз может иметь и биотехнологическое применение. При фиторемедиации загрязненных вод и почв именно в симбиозе микроорганизмов с растением происходит наиболее успешная биodeградация

ксенобиотиков, причем возможна генно-инженерная модификация как микробного компонента, так и самого растения для повышения активности трансформации труднорастворимых веществ. Ризосферное микробное сообщество можно модифицировать для создания благоприятных условий развития сельскохозяйственных растений путем введения в него как микроорганизмов, активирующих развитие растения (азотфиксаторов, продуцентов стимуляторов роста), так и поставщиков биоконтролирующих агентов, сдерживающих проникновение и рост патогенных микроорганизмов. Интродуцируемые организмы могут быть выделены из окружающей среды или «сконструированы» в лаборатории.

13.1.3. Азотфиксирующие клубеньки

Одним из классических примеров мутуалистического симбиоза микроорганизмов и растений являются корневые клубеньки, в которых происходит процесс **симбиотической азотфиксации**, когда микроорганизмы обеспечивают растение связанными формами азота, а растение снабжает микроорганизмы питательными веществами и энергией и защищает нитрогеназный комплекс от действия кислорода.

Клубеньки на корнях бобовых растений образуют обычно микроорганизмы, относящиеся к родам *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Корневые волоски бобовых растений образуют аттрактанты флавоноидной природы, которые специфично привлекают из окружающей почвы микробные клетки и запускают у них синтез Nod-факторов, обеспечивающих взаимодействие с растением. Микроорганизмы синтезируют **лектины**, способствующие адгезии бактериальных клеток на поверхности корня, а также стимуляторы роста растений (например, индолилуксусную кислоту). Стимуляция роста части поверхностных слоев клеток корневого волоска приводит к его спирализации, при этом микроорганизмы попадают внутрь спирали. Размягчение оболочек поверхностных структур корня под действием фермента полигалактуроназы дает возможность бактериальным клеткам проникнуть внутрь клеток растения и сформировать инфекционную нить. В тетраплоидных клетках кортекса корня инфекционная нить распадается на удлиненные образования неправильной формы (**бактероиды**). При этом тетраплоидные клетки интенсивно размножаются и образуют наросты (клубеньки) на корнях растений. Внутри клубеньков и происходит процесс симбиотической азотфиксации, которая сопровождается совместным синтезом сложного соединения **леггемоглобина**, белковую часть которого образует растение, а гем синтезируется бактериями.

Актинобактерии из рода *Frankia*, вступающие в симбиоз с некоторыми двудольными древесными растениями (березой, ольхой, облепихой и др.), проникают в клетки корня растения и стимулируют локальное разрастание тканей корня с образованием клубеньков. При этом гифы внутри корня образуют разветвления и раздуваются на концах, превращаясь в **везикулы**, осуществляющие фиксацию молекулярного азота.

13.1.4. Микориза (актиномориза)

Микориза (или **актиномориза**) — это симбиоз между корнями растений и мицелием грибов (или актиномицетов). Такое сожительство опреде-

ляют как частичный или полный эндосимбиоз, поскольку мицелий проникает внутрь тканей или даже клеток корня. При совместном существовании мицелиальный компонент выполняет функцию дополнительных корневых волосков, а также снабжает растение аммонийными формами азота, разлагая почвенную органику. Растение, в свою очередь, поставляет грибу или актиномицету готовые сахара. За счет освоения большего объема почвы с помощью мицелия микориза (актинориза) существенно увеличивает поглощение влаги, фосфатов и других минеральных веществ растением, а также обеспечивает защиту растения от болезней и тяжелых металлов. Мицелиальный компонент этого симбиоза способен синтезировать антимикробные соединения и сдерживать колонизацию и инфицирование корня фитопатогенными микроорганизмами. Для образования микоризы необходимо присутствие обладающих комплексом гидролаз бактерий — помощников, облегчающих проникновение гиф гриба в клетки корня. Традиционно микоризу подразделяют на два типа. Эктомикоризу образуют сотни видов грибов, преимущественно базидиомицетов, вступающих в симбиоз с древесными растениями (сосна, дуб и др.). Мицелий гриба оплетает корень растения, образуя мантию. Внутренний слой мантии связан с гифами, внедрившимися между клетками эпидермиса и кортекса корня и сформировавшими мицелиальную сеть. Эндомикориза образуется, в основном, зигомицетами, вступающими в ассоциацию с множеством растений, в том числе с вересковыми и орхидными. Гифы гриба проникают через оболочки кортикальных клеток растения и формируют дихотомически разветвленные структуры, называемые **арбускулами**. В других клетках кортекса корня гифы грибов могут образовывать пузыревидные вздутия (**везикулы**). Арбускулы и везикулы считаются основным местом обмена питательными веществами между растением и грибом.

Симбиоз растений с актинобактериями рода *Frankia*, приводящий к образованию клубеньков, одновременно можно считать специфической азотфиксирующей актиноризой.

13.1.5. Эпифитные микроорганизмы

Пространство вокруг надземных частей растения, а также ткани этого растения образуют **филлосферу**, в которой выделяют собственно поверхность растения, называемую **филлопланой**. Количество **эпифитных микроорганизмов**, обитающих на надземной части растения, сравнимо с численностью микроорганизмов в почве и достигает 10^8 клеток на 1 г листовой массы. Состав микробного сообщества филлосферы ничем принципиально не отличается от сообщества, присущего семенам растений. Среди его представителей отмечены как сапротрофные, так и патогенные виды. Структура конкретного микробного сообщества филлосферы зависит от вида растения и от сочетания физико-химических факторов среды его обитания. Микроорганизмы, обитающие на листьях растений, помимо упомянутых выше, относятся к родам *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Zymomonas*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Methylobacterium*, *Frateruria*, *Rhodotorula* и др. При прорастании состав и количественные соотношения компонентов микробного сообщества, вынесенного в воздушную среду из почвы, будет меняться под

влиянием факторов окружающей среды. Меняется и расположение клеток микроорганизмов на поверхности листа: некоторые распределяются диффузно, другие образуют скопления вокруг устьиц. Устьица — это основные структуры растения для обмена метаболитами с окружающей средой, где осуществляется выделение и поглощение газов, летучих и нелетучих соединений, служащих питательными субстратами для микроорганизмов. Через устьица также могут проникать патогенные микроорганизмы и выделяться **фитонциды**, соединения антимикробного действия, подавляющие развитие микроорганизмов. Такие вещества способны синтезировать хвойные деревья, чайные кусты, растения чеснока, лука, пряно-вкусовые растения и т.д.

13.2. Фитопатогенные микроорганизмы

13.2.1. Общие свойства фитопатогенных микроорганизмов и факторы, способствующие их распространению

Микробные болезни растений наносят существенный экономический ущерб, поражая сельскохозяйственные и технические растения на значительных площадях. Микроорганизмы, вызывающие заболевания растений, называют **фитопатогенными**. Возбудителями болезней растений могут быть представители бактерий, грибов и вирусов. Фитопатогенные бактерии относятся к родам *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Mycobacterium* и др. (более 300 видов). Грибы-паразиты, вызывающие заболевания растений, широко распространены среди аскомицетов и несовершенных грибов. Так, многие пасленовые растения поражаются фитофторой, злаки заражаются спорыньей, ржавчинными и головневыми грибами, от мучнисторосяных грибов страдают самые разные растения. Среди фитопатогенных микроорганизмов отмечены высокоспециализированные паразиты (монофаги), поражающие растения одного вида или семейства (например, возбудители бактериоза огурцов, бактериальной пятнистости фасоли, рака томатов, сосудистого бактериоза капусты, бактериального ожога косточковых, кольцевой гнили и черной ножки картофеля, гоммоза хлопчатника). Полифаги поражают растения многих видов и родов из различных семейств (наиболее известны возбудители мокрых гнилей и корневого рака различных плодовых деревьев). Распространение инфекции может происходить разными путями: через инфицированные семена и остатки больных растений, почву, грунтовые и дождевые воды, с помощью различных переносчиков.

Здоровые, неповрежденные семена, овощи и плоды несут на своей поверхности нормальную эпифитную микробиоту, которая препятствует колонизации нежелательными микроорганизмами. Обсемененность зерна, плодов и овощей в большой степени зависит от загрязнения во время сбора и подготовки их к хранению, а также от температуры и влажности, поддерживаемых в хранилищах. На степень колонизации микроорганизмами этих объектов влияют и их морфологические особенности — шероховатые, имеющие неровную поверхность и механические повреждения плоды несут существенно больше микроорганизмов, чем целые, с гладкой оболочкой.

Микроорганизмы, обнаруживаемые на поверхности семян, плодов и овощей, относятся к родам *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, представители родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* встречаются в незначительных количествах, а грибы, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Phytophthora* и др., присутствуют в основном в форме спор. Попадая внутрь или на поверхность семян, фитопатогенные микроорганизмы могут успешно перезимовать и при прорастании заразить всходы, а затем и взрослые растения. Кроме того, больные семена могут служить источником распространения инфекции при их перемещении. В зараженных растениях и их частях (черенках, окулировочном материале) возбудители могут хорошо сохраняться и переноситься в новые районы. Особую опасность представляют остатки больных растений, в которых фитопатогенные микроорганизмы способны длительно сохраняться. При попадании в почву возбудители, как правило, быстро погибают под воздействием почвенной микробиоты в процессе самоочищения почвы. В то же время в состав ризосферного симбиоза уже входят условно патогенные микроорганизмы, которые при благоприятных для них условиях могут заражать растение. Спорообразующие бактерии-возбудители способны долго сохраняться в почве. Споры фитопатогенных грибов могут разноситься при помощи ветра. Мелкие капли дождевой воды, содержащие частицы больных растений, могут разноситься на большие расстояния ветром и воздушными течениями и заражать здоровые растения. Заражение может произойти через поливную воду и воду различных водоемов. В распространении микробных инфекций значительную роль играют различные животные (нематоды, слизни, насекомые, птицы, млекопитающие). Деятельность человека (торговля, туризм и т.д.) способствует распространению болезней растений на большие расстояния при перевозке семян и посадочного материала, растительных пищевых продуктов, при уходе за растениями и во время сбора плодов.

13.2.2. Особенности инфекционного процесса у растений

Развитие инфекционного процесса зависит от наличия возбудителя, восприимчивости растения и комплекса факторов внешней среды. Так, повышенная влажность и неоптимальная для роста растения температура воздуха, недостаток фосфора и калия, высокое значение pH почвы способствуют инфицированию и протеканию заболевания. Фитопатогенные микроорганизмы могут проникать в растения через естественные отверстия (устьица, нектарники, железки) и различные повреждения. Начальный этап инфицирования часто связан с деятельностью микроорганизмов, имеющих ферменты для разрушения растительных оболочек, которые облегчают внедрение возбудителя. Нарушение целостности поверхностных оболочек приводит к ускорению колонизации растения другими микроорганизмами. Развитие возбудителя в растении-хозяине часто подчиняется эффекту «кворума». От момента заражения до проявления у растения симптомов болезни проходит инкубационный период, длительность которого различна и зависит от температуры, влажности, света, питания и др. Повреждения больных растений заключаются в нарушении обмен-

ных процессов, изменениях клеточных структур и химического состава тканей. Повреждения могут быть генерализованными (общими), поражающими все растение, его существенные части или системы, или местными (очаговыми), проявляющимися на локальных участках. По совокупности анатомических и физиологических изменений микробные болезни растений подразделяют на несколько групп. Истечение различных жидкостей (камедетечение, смолотечение, слизетечение) наблюдается чаще всего у лиственных и хвойных деревьев и вызывается бактериями рода *Erwinia* и грибами-аскомицетами. При сухих и мокрых гнилях размягчаются и разрушаются отдельные участки тканей и органов растения за счет жизнедеятельности бактерий рода *Erwinia* и некоторых грибов. Мучнистая роса приводит к возникновению белого налета из-за размножения грибов-аскомицетов. Увядание (вилт) происходит под действием несовершенных грибов или представителей рода *Corynebacterium*, которые закупоривают сосуды растения и выделяют токсины, отравляющие все его части. Бактерии рода *Erwinia* могут также вызывать инфекционный «ожог» и язвы листьев, цветов и плодов. Образование пятен разного цвета, формы и размеров на листьях, семенах и плодах (пятнистость) происходит при развитии бактерий рода *Pseudomonas* или сумчатых и несовершенных грибов. Различные ненормальные разрастания тканей растений (опухоли, «ведьмины метлы», деформации) вызываются разными возбудителями (бактериями рода *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, несовершенными и сумчатыми грибами), однако их причиной являются синтезируемые микроорганизмами гиббереллин- и ауксинподобные вещества и индолилуксусная кислота. Они стимулируют местные разрастания тканей, избыточное деление клеток, образование побегов из спящих почек и т.д. Мозаичная болезнь растений вызывается вирусами. Растительными защитными факторами, противостоящими внедрению и размножению фитопатогенных микроорганизмов и вирусов, являются прочные покровные ткани, высокая кислотность клеточного сока и выработка антимикробных соединений — фитонцидов.

13.2.3. Профилактика и методы борьбы с фитопатогенными микроорганизмами

Для профилактики болезней растений применяют дезинфекцию почвы, семян и посадочного материала, обработку растений различными химическими реагентами, уничтожение больных растений и переносчиков возбудителей. Дезинфекция почв особенно эффективна в парниковых и тепличных хозяйствах. Для уничтожения фитопатогенных бактерий в настоящее время используют микроорганизмы-антагонисты. Их либо вносят в почву специально, либо создают условия для их роста и развития. Этому способствует проведение различных агротехнических мероприятий: внесение удобрений, вспашка, полив и т.д. Антагонистами могут быть обработаны семена и корни высаживаемых растений. Хорошие результаты показывают препараты на основе бактерий рода *Pseudomonas*, *Azotobacter*, грибов рода *Trichoderma*. Однако следует учитывать, что в лабораторных условиях и в природной обстановке активность таких препаратов может существенно

различаться, так как попадая в почву, интродуцированные микроорганизмы поневоле вступают в самые разные отношения с резидентной микробиотой почвы. Для предохранения семян от колонизации возбудителями применяют протравливание различными биоцидами, гидрофобизацию (покрытие семян нерастворимой пленкой, содержащей пестициды и пропускающей воздух и воду) и стимуляцию эпифитной микробиоты питательными растворами. Размножение разных групп микроорганизмов (в том числе патогенных) начинается при нарушении режима хранения, причем для зерна каждого типа отмечена своя пороговая температура и влажность, по достижении которых становится возможен микробный рост. Для борьбы с переносчиками инфекционных агентов широко применяют микробиологические методы. С помощью бактерий и грибов получают энтомопатогенные препараты, обладающие избирательной токсичностью для личинок и взрослых особей многих насекомых, но не опасные для других членов экосистемы и человека. Постоянно создаются новые сорта растений, которые обладают невосприимчивостью к инфекционным заболеваниям. Для предупреждения завоза возбудителей из других стран и распространения вспышек заболевания на большие территории государственными органами осуществляются таможенные и карантинные мероприятия.

Резюме

Отношения, возникающие между микроорганизмами и растениями, базируются как на обмене метаболитами, так и на предоставлении пространства для роста. Микроорганизмы играют существенную роль в процессах почвообразования, т.е. создают среду обитания для растений путем разложения сложных биологических полимеров, связывания молекулярного азота, обеспечения соединениями фосфора. Специфические микробные метаболиты могут влиять на скорость роста растений. Источником питания и средой обитания для микроорганизмов могут быть поверхностные и внутренние структуры растения, их мертвые остатки, а также различные прижизненные выделения. Микроорганизмы получают пространство для роста, возможность перемещения и распространения вместе с частями растения, а в ряде случаев и защиту от внешних воздействий. Микробно-растительные взаимоотношения устанавливаются уже на стадии образования семени. При прорастании семени в благоприятных физико-химических условиях метаболические процессы в нем и в микробной популяции, с ним связанной, значительно активизируются. Метаболиты, выделяемые как микроорганизмами, так и семенем, обладают определенной специфичностью, стимулируя или сдерживая рост различных групп микроорганизмов и влияя на процессы роста и развития молодого растения. При образовании проростка часть популяции микроорганизмов механически выносятся из почвы в воздушную среду. Вокруг корня формируется особый экзосимбиоз — ризосфера, окружающее корень пространство почвы, характеризующееся более высокой плотностью микроорганизмов. Стимуляция роста микробного сообщества ризосферы происходит за счет продуктов жизне-

деятельности корневой системы растения. Растение также способствует изменению физико-химических условий среды обитания микроорганизмов. Развиваясь на корневых депозитах растения, ризосферные микроорганизмы в процессе метаболизма и после отмирания микробных клеток образуют питательные вещества в формах, доступных для использования растениями. Состав и количественные соотношения компонентов микробного сообщества ризосферы зависят как от вида растения, так и от места его произрастания. Сообщество ризосферы всегда включает простейших и нематод, которые привлекаются высоким уровнем развития бактерий и грибов в этой области почвы. В присутствии патогенных микроорганизмов микроорганизмы ризосферы могут синтезировать различные биоконтролирующие агенты. Биотехнологическое использование ризосферного симбиоза возможно при фиторемедиации загрязненных вод и почв и для создания благоприятных условий развития сельскохозяйственных растений.

Ярким проявлением мутуалистического симбиоза микроорганизмов и растений можно считать процесс симбиотической азотфиксации с образованием клубеньков, при котором микроорганизм обеспечивает растение связанными формами азота, а растение снабжает микроорганизм питательными веществами и энергией и защищает нитрогеназный комплекс от действия кислорода.

Микориза (или актинориза) — это симбиоз между корнями растений и мицелием грибов (или актиномицетов). При совместном существовании мицелиальный компонент выполняет функцию дополнительных корневых волосков, а также снабжает растение аммонийными формами азота, разлагая почвенную органику или фиксируя молекулярный азот. Растение, в свою очередь, поставляет грибу или актиномицету готовые сахара. За счет освоения большего объема почвы с помощью мицелия микориза (актинориза) существенно увеличивает поглощение влаги, фосфатов и других минеральных веществ растением, а также обеспечивает защиту растения от болезней и тяжелых металлов. Арбускулы и везикулы, образованные мицелием в тканях и клетках корня, считаются основным местом обмена питательными веществами между растением и грибом (актиномицетом).

Пространство вокруг надземных частей растения, а также ткани этого растения образуют филлосферу, состав микробного сообщества которой ничем принципиально не отличается от сообщества, присущего семенам растений, и зависит от вида растения и от сочетания физико-химических факторов среды его обитания. Микроорганизмы на поверхности листа могут распределяться диффузно или образовывать скопления вокруг устьиц, основных мест растения для обмена метаболитами с окружающей средой, проникновения патогенных микроорганизмов и выделения фитонцидов.

Возбудители болезней растений (фитопатогенные микроорганизмы) встречаются среди бактерий, грибов и вирусов. Среди фитопатогенных микроорганизмов отмечены высокоспециализированные паразиты (монофаги) и полифаги, поражающие растения многих видов и родов из различных семейств. Распространение инфекции может происходить через

инфицированные семена и остатки больных растений, почву, грунтовые и дождевые воды, с помощью различных переносчиков. Нормальная эпифитная микробиота препятствует колонизации нежелательными микроорганизмами. В распространении микробных инфекций значительную роль играют различные животные и деятельность человека. Развитие инфекционного процесса зависит от наличия возбудителя, восприимчивости растения и комплекса факторов внешней среды. Начальный этап инфицирования часто связан с микроорганизмами, имеющими ферменты для разрушения растительных оболочек, которые облегчают внедрение возбудителя. Развитие возбудителя в растении-хозяине часто подчиняется эффекту «кворума» и проходит инкубационный период. Повреждения больных растений заключаются в нарушении обменных процессов, изменениях клеточных структур и химического состава тканей. Растительными защитными факторами, противостоящими внедрению и размножению фитопатогенных микроорганизмов и вирусов, являются прочные покровные ткани, высокая кислотность клеточного сока и выработка фитонцидов.

Для профилактики болезней растений применяют дезинфекцию почвы, семян и посадочного материала, обработку растений различными химическими реагентами, уничтожение больных растений и переносчиков возбудителей. Для уничтожения фитопатогенных бактерий используют микроорганизмы-антагонисты. Для борьбы с переносчиками инфекционных агентов широко применяют микробиологические энтомопатогенные препараты. Создаются новые сорта растений, которые обладают невосприимчивостью к инфекционным заболеваниям. Для предупреждения завоза возбудителей из других стран осуществляются таможенные и карантинные мероприятия.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Что происходит с микробиотой здорового семени растения при его посеве в почву и прорастании? Опишите возможные изменения структуры микробного сообщества.
2. Проанализируйте свойства грамотрицательных и грамположительных бактерий, позволяющие им успешно вступать в микробно-растительные взаимодействия.
3. В каких случаях мутуалистический ризосферный или филлосферный симбиоз может превратиться в паразитический? Приведите примеры.
4. Проанализируйте действие погодных факторов окружающей среды на развитие инфекционных болезней растений. Какие мероприятия в этих случаях могут замедлить распространение инфекции?
5. Предложите организационные мероприятия при вспышке инфекционного заболевания сельскохозяйственной культуры в отдельно взятом фермерском хозяйстве.

Семинар 1

Разнообразие микробно-растительных взаимодействий

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника

как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Применение постулатов Коха для доказательства инфекционной природы мягкой гнили моркови

Цель работы: при выполнении работы студенты узнают правила и овладеют приемами постановки экспериментов для доказательства микробного происхождения заболевания, проследив развитие инфекции на модельной системе. В качестве объекта исследования выбрана бактериальная болезнь растений, которая называется корневая, или мягкая гниль, возбудителем которой является *Erwinia carotovora*, непатогенная для человека.

Уже в античные времена признавали, что болезнь может быть заразной, т.е. передаваться от человека к человеку. В 1876 г. Роберт Кох, изучая развитие сибирской язвы, нашел убедительные доказательства тому, что эту болезнь вызывает бактерия *Bacillus anthracis*. Р. Кох исследовал коров, зараженных сибирской язвой, и обнаружил у них в крови огромное количество бактериальных клеток. Предположив, что именно они являются причиной заболевания, Кох выделил в чистую культуру и инкубировал в лаборатории бактерии из крови зараженных животных. Затем он заразил этой чистой культурой здоровую корову, и у нее появились все симптомы сибирской язвы. Исследователь вновь выделил в чистую культуру бактерии из экспериментально зараженной коровы и сравнил их с предыдущей чистой культурой. Две культуры оказались идентичными. После множества повторений этого эксперимента Кох пришел к заключению, что именно эти бактерии являются причиной возникновения болезни. На основе своих исследований и результатов, полученных другими учеными, он сформулировал правила и разработал последовательность действий, позволяющие установить, микробную этиологию заболевания, которые получили название «постулатов Коха»:

1. Микроорганизм, вызывающий болезнь, должен обнаруживаться в заболевшей особи (организме-хозяине) и других особях, пораженных той же болезнью. Этот микроорганизм не должен обнаруживаться у здоровых особей. Микроорганизм должен быть выделен в чистую культуру и устойчиво поддерживаться в лабораторных условиях.

2. Данная чистая культура, введенная здоровой особи, должна вызывать у нее симптомы изучаемой болезни.

3. Чистая культура, выделенная из экспериментально зараженной особи, должна быть идентична первоначально выделенной чистой культуре предполагаемого возбудителя.

Из десятков тысяч различных микроорганизмов, населяющих любую экологическую нишу, только несколько сотен являются патогенными. Болезнетворные микроорганизмы передаются от особи к особи различными путями. Только некоторые болезни одновременно являются смертельно опасными и легко передающимися. Соблюдение правил гигиены в значительной степени предохраняет людей от большинства болезней, вызываемых микроорганизмами.

Патогенные микроорганизмы, являющиеся возбудителями различных болезней, и в настоящее время часто определяют, руководствуясь постулатами Коха. Однако они не всегда применимы к новым смертельно опасным возбудителям, таким как вирусы ВИЧ или Эбола, поскольку эти инфекционные агенты могут не выделяться из зараженного организма в виде чистой культуры и не способны расти в лабораторных условиях. Некоторые новые возбудители не заражают лабораторных животных или не вызывают видимых симптомов заболевания при попадании в экспериментально зараженный организм. В большинстве случаев новые возбудители отличаются высокой изменчивостью, поэтому чистые культуры, выделенные из больного и экспериментально зараженного животного, могут не совпадать.

Необходимые материалы: их количество рассчитывается в зависимости от числа студентов в группе; культура *Erwinia caratovora*, корнеплоды моркови, водопроводная или дистиллированная вода в колбах, пустые чашки Петри и чашки Петри со стерильным МПА, автоклав, сухожаровой шкаф, бумажные полотенца или фильтровальная бумага, 95%-й этанол, нож, микробиологическая петля, пинцет, ножницы, спиртовка или газовая горелка, маркер, термостат, мыло, дезраствор.

Заранее заворачивают и стерилизуют в сухожаровом шкафу пустые чистые чашки Петри и кружки, вырезанные из бумажного полотенца или фильтровальной бумаги и равные по размеру дну чашки Петри. Готовят в колбах МПА и стерилизуют его в автоклаве при 1,0 ати. Расплавленный МПА разливают в стерильные чашки Петри по 20–25 мл у пламени горелки (из расчета 2 чашки на студента). Часть стерильных чашек оставляют пустыми (из расчета 3–5 чашек на студента). За 1–2 сут. до постановки опыта готовят несколько «больных» кусочков моркови. Для этого в стерильную чашку Петри помещают кусочки моркови и наносят на них петлей видимое количество биомассы *Erwinia caratovora*. Чашку выдерживают при комнатной температуре или в термостате при 25°C до появления видимых признаков заболевания (размягчение корнеплода, потемнение и возникновение неприятного запаха).

По окончании инкубации необходимо описать признаки и зарисовать вид «больной» и «здоровой» моркови. На дно первой пустой чашки Петри помещают в 2–3 слоя стерильные кружки, вырезанные из бумажного полотенца или фильтровальной бумаги, и добавляют стерильную воду для их смачивания. Избыток воды сливают. Стерильным пинцетом переносят кусочек «больной» моркови на влажную салфетку в чашке Петри. Затем пинцетом, простерилизованным в спирте и обожженным в пламени горелки, кладут кусочек «здоровой» моркови на кусочек «больной». «Здоровый» кусочек необходимо тесно прижать к пораженному участку на «больном» корнеплоде и затем положить рядом с «больным» в ту же чашку, чтобы их края соприкасались. Чашку закрывают крышкой, маркируют, помечая, что это — опытная чашка. Используя другую чашку Петри, повторяют шаги, описанные выше, для двух «здоровых» срезов моркови. Чашку закрывают крышкой, маркируют, помечая, что это — контрольная чашка.

Далее следует выполнить первый постулат Коха. Небольшое количество инфицированных тканей моркови петлей переносят на чашку со сте-

рильным МПА. Для этого аккуратно потирают пораженное место кусочка «больной» моркови зеркальцем петли и делают на агаре посев зигзагообразным штрихом, занимая всю площадь агара, как на рис. 12.9. Чашку маркируют. Все чашки инкубируют в течение 24–48 ч при комнатной температуре или при 25°C в термостате. Руки и рабочую поверхность стола после работы дезинфицируют.

После инкубации следует рассмотреть кусочки моркови, зарисовать содержимое чашек, отметить, появились ли симптомы заболевания в опытных и контрольных чашках и сделать вывод о развитии инфекции. Затем просматривают чашки, засеянные материалом пораженной моркови, описывают выросшие колонии, готовят и микроскопируют препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный препарат. Зарисовывают микроскопическую картину.

Готовят новую стерильную чашку Петри с 2–3 слоями кружков из бумажного полотенца или фильтровальной бумаги на дне. Кружки смазывают стерильной водой, избыток которой сливают. Свежие кусочки «здоровой» моркови моют водой с мылом и прополаскивают в проточной воде. Продезинфицировав нож спиртом, срезают внешнюю оболочку моркови. Очищенную морковь протирают дезинфицирующим раствором и сразу же промывают стерильной водой. Снова простерилизовав нож, отрезают от моркови четыре кружочка по 5–8 мм толщиной. Для выполнения второго постулата Коха стерилизуют пинцет в спирте и помещают с его помощью четыре кусочка моркови на дно чашки с бумажными кружками. Стерильной петлей переносят небольшое количество биомассы бактерий из отдельных колоний в чашке с МПА в центр трех кружочков моркови. Четвертый кружок не заражают. На дне чашки с внешней стороны помещают, какие кружки были заражены. Закрытые чашки маркируют и ставят, не переворачивая, на инкубацию при 25°C в течение 24–48 ч.

По окончании инкубации рассматривают содержимое чашек, определяют наличие запаха и консистенцию поверхности пораженной моркови, прикасаясь к ней петлей. Сравнивают вид трех кружков с внесенной инфекцией и незасеянного кружка, делают их описание и зарисовывают.

После этого выполняют третий постулат Коха. Материал с «больного» кусочка моркови переносят петлей на стерильную чашку с МПА, осуществляя посев зигзагообразным штрихом, как описано выше. Чашки маркируют и инкубируют в перевернутом виде при 25°C в течение 24–48 ч. После инкубации рассматривают посевы, описывают и зарисовывают выросшие колонии. Готовят из них препараты и микроскопируют их, зарисовывая полученную картину. Сравнивают колонии и микроскопическую картину, полученные на первом и втором этапах опыта, делают выводы о выполнении требований постулатов Коха и об этиологии мягкой гнили моркови.

Если в течение 24–48 ч видимых результатов роста не появляется, инкубируют бактерии дольше, так как скорость образования колоний может зависеть от первоначальной концентрации клеток, взятых для посева.

Раздел IV

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ



Глава 14

МИКРООРГАНИЗМЫ В ПРИРОДЕ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- важнейшие функции микроорганизмов в природе и принципы микробного участия в превращениях различных химических элементов на Земле;

уметь

- объяснять особенности различных микробных местообитаний и роли микробов в геохимических циклах элементов;

владеть

- приемами выделения микроорганизмов из различных местообитаний и определения различных активностей микроорганизмов в природе.

14.1. Микроорганизмы как часть экосистемы

14.1.1. Основные понятия экологии микроорганизмов

В природных условиях микроорганизмы никогда не существуют изолированно. Как и любые другие организмы, они подвержены влиянию различных факторов окружающей среды. Взаимодействие микроорганизмов с их окружением изучает **экология микроорганизмов**. Лабораторные чистые культуры представляют собой «одомашненные» формы, существующие в искусственных оптимальных условиях. Их исследование показывает потенциальные метаболические возможности микроорганизмов, реализация которых в природе зависит от конкретных условий местообитания. Природные микробные культуры, как правило, являются смешанными и представляют собой часть более крупного сообщества, включающего организмы разных уровней организации. Взаимодействующая совокупность организмов и их физического и химического окружения, функционирующая как экологическая единица, называется **экосистемой**. Исследователи признают, что микроорганизмы — это преобладающий живой материал Земли, и поскольку микроорганизмы вездесущи, то они являются существенной частью любой земной экосистемы. Каждая экосистема функционирует в определенном географическом местообитании и характеризуется своим набором живых существ. Через любую экосистему проходит поток энергии. Энергия поступает извне в виде света или восстановленных химических соединений. Большинство земных экосистем существует за счет энергии Солнца. Часть энергии всегда рассеивается (в основном, в виде тепла). Любая экосистема характеризуется последовательностью превращений органических веществ, каждое из которых является продуктом метаболизма какого-либо члена сообщества и может

служить пищей другому его члену. Такая последовательность носит название трофической (пищевой) цепи. По трофической цепи через сообщество проходят направленные в одну сторону потоки вещества и энергии. Автотрофные организмы из углекислого газа и других неорганических веществ образуют органические вещества, используемые в трофической цепи. Они являются первичными продуцентами в сообществе. Их органический материал служит пищей для гетеротрофных организмов (консументов). Консументы последовательно трансформируют получаемые органические вещества, причем каждому звену трофической цепи из-за энергетических потерь в виде тепла достается все меньшая доля энергии, запасенной автотрофами в первичных органических веществах. Иногда может происходить более или менее длительное накопление каких-либо веществ в сообществе. Мертвые остатки и разнообразные продукты жизнедеятельности организмов всех групп разлагаются организмами-редуцентами. Подавляющее большинство редуцентов относится к микроорганизмам-деструкторам. При разложении органические соединения превращаются в простые неорганические вещества, которые могут использоваться организмами других звеньев пищевой цепи. Таким образом, в отличие от потока энергии поток вещества является замкнутым. В любой экосистеме постоянно происходят два противоположно направленных процесса: образование нового органического вещества из простых неорганических соединений и деструкция органического вещества, возвращающая в окружающую среду минеральные соединения.

Микроорганизмы могут функционировать на всех уровнях экосистемы: фиксировать углерод как первичные продуценты, используя энергию света и химических связей; являться главными редуцентами органического вещества; быть консументами, как некоторые простейшие, использующие бактерии и грибы в пищу. В наземных местообитаниях основными первичными продуцентами обычно являются высшие растения. В пресных и морских водоемах эту роль выполняют цианобактерии и водоросли. Источником энергии для этих сообществ служит солнечный свет. Однако в местообитаниях, куда свет не проникает (например, в глубинах океанов), первичная продукция основывается на хемолитоавтотрофии. Так, жизнь вокруг «черных курильщиков» базируется на первичной продукции органического вещества представителями тионовых бактерий родов *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*. В некоторых экстремальных местообитаниях жизнь может быть представлена только микробными формами.

14.1.2. Основные функции микроорганизмов в природе

Разнообразие микробных функций в природе определяется широтой их метаболических возможностей и повсеместным распространением. Микроорганизмы способны различными способами и в различных условиях разрушать органические вещества до CO_2 , NH_3 , H_2 , CH_4 , H_2O и др., т.е. осуществлять их **полную минерализацию**. Микробные продукты обмена и запасные соединения (в виде экзометаболитов, живой и мертвой биомассы) могут служить источником питательных веществ для других гетеротрофных микроорганизмов. Клетки микроорганизмов являются хорошим

пищевым субстратом для простейших, нематод, почвенных насекомых, так как содержат все биогенные элементы, в том числе в среднем 50% углерода, 14% азота и 3% фосфора. Микроорганизмы могут модифицировать многие сложные соединения, делая их доступными для других организмов. Этому способствует также перевод соединений в растворимую или газообразную форму. Некоторые вещества преобразуются непосредственно в реакциях микробного обмена веществ, другие — опосредованно, за счет изменений химических и физических факторов среды под воздействием микроорганизмов (например, при выделении ими большого количества кислот). И наконец, микроорганизмы способны образовывать ряд особых соединений, активирующих или подавляющих жизнедеятельность других микроорганизмов, растений и животных. Это различные стимуляторы роста, бактериоцины, антибиотики, токсины и т.д. По способности осуществлять определенные функции микроорганизмы подразделяют на физиологические (функциональные) группы. Микроорганизмы существуют в природных местообитаниях как в виде популяций организмов одного типа, образуя микроколонии, растущие в ограниченном пространстве, так и в виде сложных сообществ, где различные типы популяций взаимодействуют между собой.

14.1.3. Особенности микробных местообитаний

Каждый вид в природе занимает определенное местообитание с конкретным набором абиотических и биотических факторов и выполняет определенную функцию. Функциональное и пространственное положение вида в экосистеме называют его **экологической нишей**. Пространственное положение вида (его «адрес») — это местообитание с конкретным набором физико-химических условий и биотических факторов. Функциональное положение вида — это его способность выполнять определенные функции в данных конкретных условиях. Экологическую нишу образно называют «профессией» вида, это значит, что в данных условиях местообитания вид осуществляет совершенно определенную функцию. Таким образом, организмы, занимающие одинаковое местообитание, должны для успешного сосуществования различаться функциональными характеристиками.

Особенности микробных местообитаний определяются малыми размерами микроорганизмов, непосредственно химически взаимодействующих со средой обитания. Микробные местообитания имеют сложный и постоянно меняющийся характер и зависят от плавных или скачкообразных изменений концентраций питательных и ядовитых веществ и значений лимитирующих факторов (температуры, pH, света, доступности воды и т.д.). Поэтому микробных экологических ниш — бесконечное множество, но экологическая ниша для конкретного микроорганизма, где он преобладает, определяется именно сочетанием вышеперечисленных факторов и функциональных способностей. Для точной характеристики местообитания микроорганизма нужно учитывать его **микроокружение**, т.е. набор абиотических и биотических факторов в непосредственной близости от микробных клеток. Многие специализированные группы микроорганизмов существуют в таких экстремальных условиях, что испытывают минимальную

конкуренцию со стороны других микроорганизмов. Например, *Helicobacter pylori*, вызывающий ряд серьезных заболеваний, обитает в желудочно-кишечном тракте человека при pH 1,5–2,5. Для защиты от желудочного сока он синтезирует большое количество уреазы, разлагающей мочевину с образованием аммония. Таким способом непосредственно вокруг клеток поддерживаются слабокислые условия. Даже в самом маленьком местообитании могут быть разные физико-химические условия. Например, внутри комочка хорошо аэрируемой почвы диаметром 12 мм обнаруживается зона полного анаэробизма диаметром ≈ 6 мм, в которой могут обитать строго анаэробные микроорганизмы (рис. 14.1, а). Развитие отдельных клеток в колонии на твердой среде зависит от их положения. Так, внутри и непосредственно под колонией формируется анаэробная зона даже при росте на поверхности питательного агара в аэробных условиях (рис. 14.1, б).

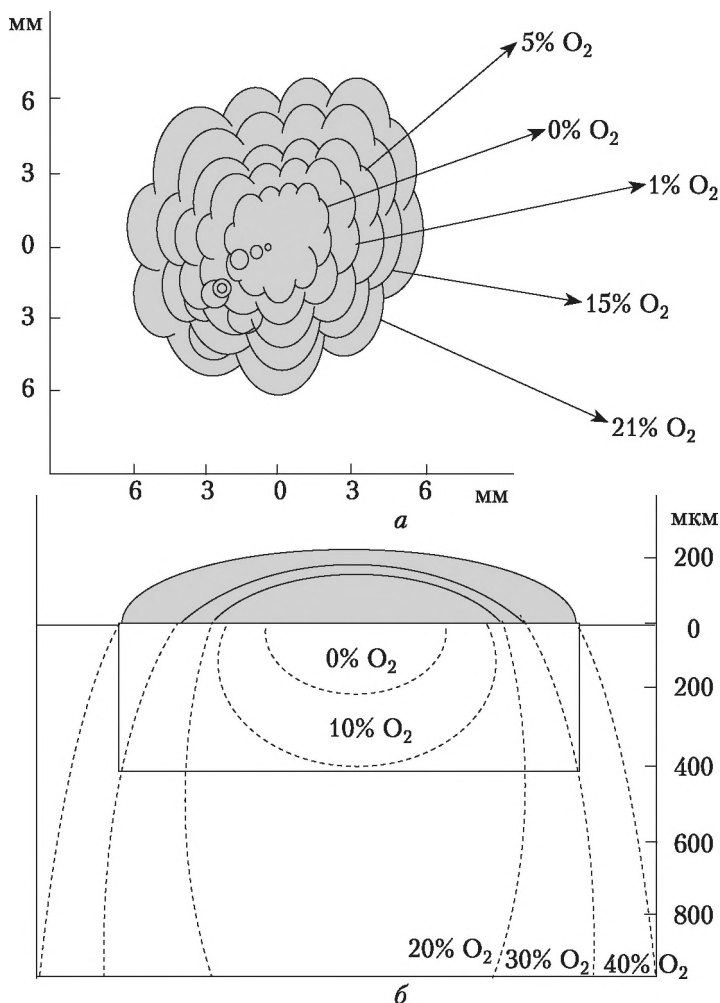


Рис. 14.1. Изменение концентрации кислорода внутри почвенной частицы (а) и под колонией *Bacillus cereus*, растущей в аэробных условиях на твердой среде (б)

14.2. Методы экологии микроорганизмов

14.2.1. Общие принципы сбора и обработки проб из природных источников

При изучении микроорганизмов в природных местообитаниях анализируют отдельные части образца и результаты затем обобщают для сообщества или экосистемы в целом. Поскольку во многих местообитаниях распределение микроорганизмов скорее кластерное, а не однородное, то единичная проба, взятая в определенной точке, не может правильно отражать общую картину. Это особенно важно для микроорганизмов, которые живут в условиях микроокружения. Ошибка снижается при специальном перемешивании нескольких индивидуальных проб и проведении статистической обработки результатов.

Анализ каждой пробы состоит из трех фаз: сбора образцов, подготовки проб и собственно измерения. При отборе проб и их хранении количество клеток не должно изменяться. Выбранный способ должен гарантировать невозможность загрязнения пробы посторонними микроорганизмами. Если невозможно вплотную приблизиться к анализируемому месту, то применяют различные пробоотборники для дистанционного забора проб. Пробы почвы отбирают обычно с помощью чистых нестерильных инструментов и контейнеров, так как количество микроорганизмов в поверхностных почвенных горизонтах во много раз больше, чем на соприкасающихся с ними чистых предметах. Для сбора образцов со значительной глубины вручную или с помощью специальных механизмов высверливают керн (вертикальный столб почвы и нижележащего грунта). В лаборатории внутри керна анализируют нужные зоны.

Для отбора проб почвенных микроорганизмов, находящихся в относительно небольшом количестве, применяют аттрактанты («наживки») или стекла обрастания (по Холодному). В почву опускают чистые стекла или стекла со специфической агаризованной средой, на которой развиваются прикрепившиеся нужные микроорганизмы. Чистые стекла, не обладающие селективностью, служат аналогами минеральных частиц почвы (кварца) и отражают общее микробное разнообразие образца. Нанесение на стекло среды или использование «наживки» позволяет определить наличие той или иной физиологической группы микроорганизмов.

Погружение в донные осадки или почву открытых с обоих концов капилляров с плоскопараллельными стенками (капилляров Перфильева) приводит к свободному перемещению микроорганизмов внутри них. Часто капилляры заливают селективной средой. Преимущество таких капилляров в том, что их содержимое можно рассматривать непосредственно под микроскопом. Прижизненные наблюдения за развитием почвенной или осадочной микробиоты дают возможность вести непрерывные исследования микробных популяций, не нарушая их целостности. В капилляр можно вносить разные вещества и следить за реакцией микробного сообщества. При этом можно применять съемку с помощью автоматической кинокамеры, рассчитанной на определенное число снимков в час или

день, не опасаться подсыхания препарата, устанавливать режим проточного культивирования и следить за развитием анаэробного сообщества, не применяя при этом сложной техники анаэробного культивирования. Капилляры также дают возможность обнаруживать необычные морфологические формы пока некультивируемых микроорганизмов. Пробы воды практически всегда отбирают на значительном удалении от исследователя. Открытые водные пространства содержат немного микроорганизмов, поэтому пробы легко загрязнить неестественной микробиотой с самого прибора или из других слоев воды.

Создание сложных пробоотборников преследует цель дистанционного отбора и соблюдения максимальной стерильности при доставке пробы из нужного места, например, со значительной глубины. Водные пробоотборники могут представлять собой вакуумированные бутылки, которые заполняются водой на определенной глубине с помощью грузика-мессенджера, разбивающего водозасасывающий капилляр. Другой вариант — это стерильный пластиковый пакет, раскрывающийся с помощью пружины на определенной глубине после опускания с поверхности груза, одновременно приводящего в движение пружину и бритву, вскрывающую отверстие в пакете. Существует пробоотборник с укрепленными на разной глубине стерильными шприцами, в которые одновременно засасываются пробы воды. Такие приспособления применяют обычно для отбора проб из неглубоких стратифицированных озер. При отборе глубоководных проб необходимо предусматривать возможность декомпрессии организмов при подъеме на поверхность. Разработаны пробоотборники, позволяющие открывать и закрывать входные отверстия на глубине, что способствует сохранению присущего месту отбора давления внутри пробы при подъеме.

Пробы осадков обычно отбирают с поверхности с помощью скребков или ковшей, однако такие способы не позволяют уберечь данные пробы от загрязнения посторонней микробиотой. С соблюдением асептики можно отбирать пробы-керны, которые затем в лаборатории в стерильных условиях делят в вертикальном направлении, что позволяет проследить динамику осадков по горизонтали. Наиболее точно отбирают пробы морских осадков с использованием миниатюрных двух-трехместных подводных лодок, которые погружаются на глубину до 3 км. С помощью манипуляторов и специальных сверл исследователи, находясь внутри лодки, отбирают пробы осадков в точно ограниченном участке (особенно это важно в местах подводных термальных источников или «черных курильщиков»). Использование мини-подлодок позволяет также обрабатывать пробы на месте отбора (например, вводя радиоизотопы) и оставлять их на месте отбора для инкубации с последующим подъемом на поверхность для анализов. Отбор проб воздуха ведут с применением аппаратов, которые минимально травмируют живые клетки микроорганизмов, находящиеся обычно в мельчайших капельках аэрозолей. Пробы воздуха определенного объема либо пропускают через бактериальные фильтры, либо направляют поток засасываемого воздуха на поверхность открытой чашки Петри с агаризованной средой, где осаждаются все взвешенные частицы, включая микроорганизмы. Пассивная седиментация, позволяющая подсчитать количество

осевших (и образовавших колонии) клеток микроорганизмов на поверхности открытых чашек Петри с агаризованной средой, более пригодна для подсчета количества спор грибов, но дает лишь приблизительные результаты для количественного учета находящихся в воздухе бактерий. Пробы биологических образцов растений или животных — это образцы биологических жидкостей (растительный сок, кровь, моча, лимфа, мокрота), выделений (каловые массы) или проб с поверхности и внутренних органов объекта (биопсии). С поверхностей микроорганизмы смывают или счищают стерильным физраствором (0,85%-й раствор NaCl в дистиллированной воде) с помощью стерильных ватных тампонов. Можно сохранять микроорганизмы непосредственно в образцах тканей, что важно для наблюдения их топографического распределения или количественного учета в них.

Концентрированные образцы должны быть разбавлены до нужной плотности микроорганизмов с последующим высевом на питательные среды для подсчета живых клеток. Обычно осуществляют 10-кратные разведения проб с тем, чтобы на поверхность среды в чашке Петри попало 50–200 клеток, способных образовать колонии. При этом важно подобрать разбавитель, не влияющий на жизнеспособность микроорганизмов. При разбавлении образцов клетки должны равномерно распределяться в объеме пробы. При обработке проб почвы или осадков, в которых микроорганизмы прикреплены к частицам, степень десорбции микробных клеток может зависеть от концентрации и химического состава разбавителя, времени, температуры и силы перемешивания. Процедура подготовки проб к экспериментам должна быть стандартной, чтобы результаты можно было сравнивать. Сильно разбавленные образцы должны быть перед посевом сконцентрированы путем центрифугирования или фильтрования через мембранные фильтры, задерживающие микробные клетки. При концентрировании образцов огромное значение имеет выбор фильтра, так как фильтры с малыми порами быстро забиваются и не позволяют фильтровать пробы достаточных объемов, а фильтры с большими порами могут пропустить часть клеток. Обычно поликарбонатным фильтрам отдают предпочтение над нитроцеллюлозными из-за более плоской поверхности и унифицированного размера пор. Химический состав материала фильтра также влияет на выживаемость микроорганизмов.

Необходимо учитывать возможность размножения клеток в образце во время хранения или транспортировки (так называемый «эффект бутылки»). Например, когда пробу морской воды, лишенной природных абсорбирующих поверхностей, помещают в стерильную посуду, питательные вещества воды сорбируются на внутренней поверхности сосуда, привлекая микробные клетки. Они прикрепляются к стенкам и начинают быстро размножаться. В то же время хранение собранных образцов может привести к гибели части популяции микроорганизмов, следствием чего будет занижение результатов. Несоблюдение при обработке проб условий, необходимых для той или иной физиологической группы микроорганизмов, может существенно изменить результат анализа. Так, обработка проб для выявления строгих анаэробов требует проведения всех разведений в растворах без кислорода и посева проб в бескислородной атмосфере. Для выявления психрофильных микроорганизмов вся стеклянная посуда

и жидкости, соприкасающиеся с пробой, должны быть охлаждены для максимального сохранения жизнеспособных клеток психрофилов.

Если пробы не предназначены для определения числа живых и мертвых клеток, то их обычно фиксируют с помощью формальдегида или глутарового альдегида непосредственно после отбора. Такие препараты сразу готовы для прямого микроскопирования.

Сбор вирусных частиц из природных проб требует применения специальных методов их концентрирования из водных образцов путем неоднократной адсорбции/элюции подкисленных проб при пропускании их через эпоксидные, фибerglassовые или нитроцеллюлозные фильтры. Сорбированные частицы затем элюируют щелочными растворами. Процедуру повторяют многократно, концентрируя вирусные частицы в тысячи раз, например, из морской воды или проб осадков.

14.2.2. Способы оценки микробного разнообразия в природе

Современная экология микроорганизмов обладает целым набором методов, позволяющих оценить присутствие и функционирование микроорганизмов в природных условиях. Методы классической микробиологии, основанные на выделении чистых культур, составляют лишь часть этого набора. Считается, что на современном этапе развития науки мы можем культивировать лишь от 0,1 до 1% представителей мира микробов. Выделение и определение членов микробного сообщества с помощью посева на чашки эффективны при высокой концентрации микробных клеток. При этом получают отдельные колонии чистых культур микроорганизмов, пригодные для проведения физиолого-биохимических тестов, по результатам которых возможна идентификация микроорганизма. Клетки из отдельно взятой колонии могут быть подвергнуты мультисубстратным тестам (*API*-тест, *Biolog*) для выявления спектра используемых субстратов, по результатам которых возможно определение микроорганизма до рода или даже вида. Если же относительное количество клеток искомого вида в пробе невелико, то они могут «потеряться» в случае прямого посева на чашки с разведениями пробы. Для более полного выявления членов сообщества используют одновременные посевы на среды различного состава (например, для копиотрофов и олиготрофов, органотрофов и литотрофов, азотфиксаторов, бродильщиков и т.д.). Для выявления отдельных групп микроорганизмов применяют селективные и диагностические среды, среды с антибиотиками, специфически подавляющими развитие отдельных групп микроорганизмов.

Микроорганизмы могут быть обнаружены и химическими методами, когда определяют наличие в природной пробе комплекса веществ, характерных для конкретной группы. Так, каждый микроорганизм имеет свой особенный липидный состав, и это свойство положено в основу химической идентификации. Липиды — обязательные компоненты мембран, окружающих цитоплазму каждой микробной клетки. Липидный состав различных микроорганизмов в значительной степени отличается друг от друга. Существует несколько классов липидов, которые обнаружены у микроорганизмов. Данный метод не идеален, поскольку любые микроорганизмы

могут существенно менять профиль липидов в зависимости от возраста культуры и условий культивирования клеток. Анализ, основанный на изучении и сравнении метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), входящих в состав липидов, получил широкое распространение вследствие его простоты и доступности. Полный процесс идентификации включает этерификацию липидов, метилирование входящих в их состав жирных кислот, их разделение на хроматографических колонках и количественное определение с помощью газовой хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Специальным образом обработанные колонки дают хорошее разрешение МЭЖК, что позволяет сравнивать их время удерживания с ранее идентифицированными липидными профилями (стандартами). Анализ МЭЖК, экстрагированных из почвенных образцов, позволяет быстро и относительно недорого идентифицировать состав популяции почвенных микроорганизмов. Интерпретация результатов, однако, иногда встречает значительные трудности вследствие идентичности многих липидов у различных представителей изучаемого микробного сообщества.

Для оценки микробного разнообразия применяют прямые микроскопические наблюдения и различные молекулярно-генетические методы исследования. Прямое микроскопирование в природных пробах позволяет не только наблюдать за микроорганизмами, но и с помощью прижизненного окрашивания различать мертвые и живые, физиологически активные клетки. Этот метод позволяет зарегистрировать гораздо больше клеток, чем дают результаты высевов на различные среды. Большое расхождение в результатах прямого счета в сравнении с высевом на среды поставило вопрос: являются ли прижизненно окрашенные микроорганизмы живыми или мертвыми? При применении в качестве прижизненного красителя акридинового оранжевого было замечено, что часть клеток окрашивается с последующей зеленой флуоресценцией, часть — остается оранжевой. Это привело вначале к неверному выводу, что зеленые клетки — живые, а оранжевые — мертвые. Впоследствии было выяснено, что цвет флуоресценции зависит от соотношения ДНК/белок в клетке, поэтому активно делящиеся клетки выглядят зелеными, а растущие более медленно или покоящиеся клетки дают оранжевую флуоресценцию, оставаясь при этом живыми. В дальнейшем были разработаны прямые методы, основанные на оценке метаболической активности клеток (клеточному дыханию), позволяющие отличить в природных пробах живые клетки от неживых. Применение различных солей тетразолия, которые при восстановлении в клетке дегидрогеназами (при дыхании) превращаются в нерастворимый формазан красного цвета, позволяет обнаружить это визуально под микроскопом. Есть способ различать живые, мертвые и поврежденные клетки при измерении состояния мембранного потенциала с помощью флуорохромов. Предлагают также добавление к пробам живых клеток ингибитора клеточного деления (налидиксовой кислоты), при котором активно растущие клетки будут удлиняться без вступления в фазу бинарного деления. Многие микроорганизмы, наблюдаемые при прямом микроскопировании как живые, находятся в некультивируемой форме. Для их выявления особенно важны пря-

мые микроскопические наблюдения, поскольку среди некультивируемых форм значительную часть составляют патогенные для человека микроорганизмы. Так, *Legionella pneumophila*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae* и *V. vulnificus* постоянно пребывают в некультивируемой форме в природных эконишах. Они не растут на лабораторных средах, но в природе ведут активный образ жизни, сохраняя способность заражать человека.

Молекулярные методы, основанные на анализе нуклеиновых кислот, позволяют обнаружить и определить микроорганизмы без их выделения в чистые культуры. Из почвенных, осадочных или водных образцов извлекают всю имеющуюся ДНК, очищают ее и анализируют с помощью градиентных гель-электрофорезов — термического (ТГГЭ) и денатурирующего (ДГГЭ). Основной трудностью при экстракции тотальной ДНК является ее отделение и очистка от гуминовых веществ почвы, хотя методы, позволяющие проводить такую очистку, постоянно совершенствуются. После экстракции ДНК подвергают иммобилизации на нитроцеллюлозном или нейлоновом фильтре, плавят и затем гибридизуют с известными последовательностями генов, ответственными за синтез тех или иных специфических ферментов. Так, наличие в пробе тотальной ДНК генов, гибридизуемых с геном, кодирующим нитрогеназу, говорит о присутствии в анализируемом сообществе азотфиксаторов, генов метанмонооксигеназы — о присутствии метанотрофов, а генов Рубиско — о наличии автотрофных микроорганизмов, фиксирующих углекислоту через цикл Кальвина.

Генов, кодирующих ключевые реакции тех или иных процессов, расшифровано уже несколько десятков, и, применяя метод гибридизации, можно делать выводы о наличии определенных микроорганизмов в анализируемой пробе. Разработаны «универсальные» праймеры на бактерии, археи и эукариоты, которые позволяют специфически амплифицировать последовательности этих трех разных групп микроорганизмов, разделить их с помощью ТГГЭ/ДГГЭ-методов и затем, после вторичной амплификации отдельных полос, получить почти полный профиль микробного сообщества с идентификацией отдельных филогенетических линий и классификацией микроорганизмов на основе последовательностей 16S рРНК. С использованием таких последовательностей было обнаружено, что морские воды содержат многие виды архей и бактерий, которые не поддаются культивированию в лаборатории. Наиболее подходящими для такой диагностики являются олигонуклеотидные пробы длиной 18–20 нуклеотидов, так как они легко гибридизуются со специфическим участком ДНК искомого организма. В популяциях природных образцов с помощью ПЦР-амплификации диагностических последовательностей ДНК могут быть обнаружены даже небольшие количества некультивируемых форм.

Жизнеспособные клетки микроорганизмов могут быть идентифицированы также с помощью специфических иРНК методом обратной транскрипции, при этом следует помнить, что время полужизни некоторых бактериальных иРНК может составлять меньше минуты. Для идентификации нужных микроорганизмов в сообществе используют гены-репортеры, которые легко обнаружить после проведения химических реакций (например, *IacZ*-ген, кодирующий β -галактозидазу, и *xyIE*-ген, кодирующий синтез

фермента метаболизма толуола) или заявляющие о себе после экспрессии в клетке испусканием света различной длины волны (*lux*-гены или GFP-гены, кодирующие синтез зеленого флюоресцирующего белка).

Гены-репортеры используют обычно при определении выживаемости введенных в образец микроорганизмов, для обнаружения тех или иных активностей в природных образцах, для выявления экспрессии и изучения активности нужного гена/фермента, под контролем промотора которого экспрессируется и ген-репортер. Генетическая конструкция в таком случае выглядит и работает следующим образом. Если нужный ген экспрессируется и фермент осуществляет свою функцию (например, расщепляет тот или иной ксенобиотик), то по люминесценции гена-репортера об этом можно судить на удалении (например, в толще почвы). Свет от места реакции транмиттируется в таком случае с использованием оптоволоконных световодов. По тушению люминесценции в генно-инженерных штаммах *E. coli* судят о степени токсичности пробы воды или почвы.

Определение численности микроорганизмов сводится к прямому подсчету клеток под микроскопом и непрямому подсчету после подращивания на твердых средах (учитываются только живые клетки). Чаше всего микробные клетки подсчитывают прямым счетом под микроскопом, при этом обычно не различая живые и мертвые клетки (по Виноградскому). Метод можно модифицировать с применением эпифлуоресцентного микроскопа и флуоресцирующих дифференциальных красителей для подсчета живых и мертвых клеток в препарате. Клетки микроорганизмов можно подсчитывать также в определенном объеме жидкой пробы под световым микроскопом (в камерах Тома — Горяева или Петрова — Хаузера). Число специфических клеток микроорганизмов в природных образцах может быть установлено с помощью применения техники флуоресцирующих антител. Предварительная подготовка этого метода заключается в выделении чистых культур искоемых видов и наработке специфических антител к таким клеткам. Этот метод позволяет следить за развитием индивидуальных микроорганизмов в их естественных местах обитания. Антитела являются чрезвычайно специфичными по отношению к выбранному виду, что в целом делает этот метод поразительно точным инструментом исследования. Модификациями метода являются применение специфичных флуоресцирующих антител, выработанных по отношению к определенным ферментам, а также использование флуоресцирующих генетических проб (генных зондов), позволяющих идентифицировать микроорганизмы с идентичными генами в популяции. В одной и той же популяции можно обнаруживать различные гены, имея генетические зонды, флуоресцирующие разным цветом.

При учете живых микроорганизмов после подращивания применяют, в основном, два метода: подсчет на чашках выросших колоний после соответствующих разведений и учет по методу предельных разведений. Оба этих метода требуют разделения микроорганизмов перед посевом на индивидуальные клетки, которые затем дают потомство. Применение методов подсчета с посевами требует бережного отношения к пробам для сохранения жизнеспособных клеток. Следует учитывать, что для подсчета

микроорганизмов различных групп необходимо применять разные среды, которых разработано более тысячи для выявления бактерий, архей, грибов, водорослей, простейших, как аэробов, так и анаэробов. Модификацией метода служит гибридизация колоний, при которой из тысяч выросших колоний на чашке можно выявить одну, специфически гибридизующуюся с выбранным геном-маркером. Метод позволяет подсчитать число микроорганизмов нужного вида или с нужной функцией (в зависимости от примененного гена для гибридизации) среди большого количества сопутствующей микробиоты из природных проб.

Измерение биомассы применяют для подсчета урожая микроорганизмов, понимая под биомассой сухую массу живого материала, выраженную в граммах на литр. Измерение биомассы природных проб часто не приводит к желаемым точным результатам вследствие большого количества побочных эффектов, связанных с отбором проб и их измерением. Наиболее приемлемыми методами определения биомассы в природных образцах являются методы, связанные с определением биохимических параметров клеток. Для таких измерений предполагают, что количество измеряемого компонента клеток одинаково для всех видов клеток, что, конечно же, является допущением. Поэтому измерения биохимических параметров биомассы необходимо экстраполировать с осторожностью. Определение биомассы чаще всего осуществляют путем измерения содержания АТФ и адениновых нуклеотидов с последующим пересчетом на содержание углерода клетки или веса сухой биомассы. Метод позволяет быстро и точно (с помощью люциферин/люциферазной пробы) измерить содержание АТФ в образце. Количество АТФ строго соответствует биомассе живых клеток, так как после отмирания клетки пул АТФ в ней резко снижается или исчезает вовсе. Общее содержание аденилатов (АТФ + АДФ + АМФ) не зависит от метаболического состояния клетки и говорит о всей микробной биомассе анализируемой пробы.

Другим способом является измерение содержания компонентов клеточных стенок, например, ацетилмурамовой кислоты (МК) или липополисахаридов. Для оценки содержания мурамовой кислоты ее гидролизуют с высвобождением лактата, который определяют энзиматически. Установлено, что все грамположительные бактерии содержат 44 мкг МК/мг С клетки, тогда как для грамотрицательных клеток это соотношение равно 12 мкг/мг С. Для оценки содержания грибной биомассы используют определение концентрации хитина, хотя на точность метода может влиять количество почвенных членистоногих и насекомых.

При отсутствии в пробе растений можно определять биомассу фототрофных водорослей и бактерий, измеряя количество хлорофилла после экстракции пробы хлороформ/метанольной смесью с последующим измерением поглощения при 665 нм. Поглощение того же экстракта, измеренное при 850 нм, будет отражать количество всех бактериальных хлорофиллов, таким образом оценивают количество пурпурных фототрофных бактерий. Содержание различных хлорофиллов можно измерять и по спектрам флуоресценции.

Концентрация ДНК в клетках микроорганизмов довольно постоянна, и определение ДНК может способствовать определению биомассы. В природных образцах, где чувствительность метода определения ДНК имеет первостепенное значение, применяют пробы с флуоресцентными красителями, такими как этидий бромид или *Hoechst* 33258 с использованием спектрофлуорометрии. Перед измерением необходима тщательная очистка тотальной ДНК и постановка контролей на наличие эукариотической ДНК.

Бактериальные гемопротейны имеют характерную хемилюминесценцию, однако при таком определении следует убедиться, что фоновые концентрации белков незначительны. Поскольку различные микроорганизмы содержат очень разные количества белка, определение этого компонента биомассы целесообразно проводить в ситуациях, когда в пробе присутствует один вид микроорганизмов.

Определение липидов служит хорошим маркером для подсчета биомассы, поскольку все клетки окружены мембранами, содержащими липиды. Количество эргостерола в пробе отражает содержание грибов, поскольку его практически не содержат ни растения, ни археи и бактерии. Определение содержания и состава МЭЖК позволяет, наряду с качественной оценкой наличия той или иной группы микроорганизмов в образце, количественно определить содержание общей биомассы в природной нише.

Физиологические подходы к определению биомассы основаны на измерении дыхания пробы после добавления субстрата или на измерении количества CO_2 , выделившегося после разложения микробной биомассы после стерилизации пробы при добавлении хлороформа. Оба метода требуют постановки многочисленных контролей.

14.2.3. Изучение активности микроорганизмов в природе

Для экологических исследований важно не только определить наличие того или иного микроорганизма в природном местообитании, но и показать, что он там активно функционирует. Изучение активности микроорганизмов предполагает учет физико-химических факторов их микроокружения. Для клетки длиной 3 мкм микроокружение на расстоянии 3 мм соответствует расстоянию в 2 км для человека. Специальные миниатюрные электроды до 2–3 мкм в диаметре позволяют измерять pH, ОВП, освещенность, соленость, температуру, содержание кислорода и некоторых химических элементов (Na^+ , K^+ , HS^- , NH_4^+ , N_2O и т.д.) в непосредственной близости от микробных клеток. Миниатюрные спектрометрические приборы позволяют качественно измерять поглощение света в микрониах, что важно при изучении структуры и функционирования циано-бактериальных матов и других микробных сообществ. Например, показано, что на глубине 1,0–1,2 мм морского циано-бактериального мата при его общей толщине около 2 см окислительный фотосинтез прекращается и сообщество становится анаэробным. С этого уровня резко возрастает концентрация сероводорода, возникающего в результате активности сульфатредукторов нижних слоев мата. Концентрация сероводорода в каждом слое сообщества — результат сбалансированного процесса его выделения сульфатредукторами и его потребления аноксигенными фототрофами и тионовыми бактериями.

Наиболее чувствительны методы изучения активности с применением радиоизотопов, которые помогают проследить судьбу того или иного вещества в микробных сообществах. Для измерения интенсивности фотосинтеза определяют включение меченого $^{14}\text{CO}_2$, имея контролем «темновую» пробу. Для определения скорости сульфатредукции применяют сульфат с изотопом серы, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$, который превращается в H_2^{35}S . Скорость метаногенеза можно проследить по превращению $^{14}\text{CO}_2$ в $^{14}\text{CH}_4$ в присутствии значительного количества водорода или по преобразованию ^{14}C -метанола, метилированных аминов или ацетата в $^{14}\text{CH}_4$. Хемоорганотрофные активности измеряют по скорости включения меченых по ^{14}C -органических соединений (обычно глюкозы или аминокислот). Использование ^{14}C -органических веществ можно проследить и по выделению $^{14}\text{CO}_2$. Во всех случаях, определяя скорости процессов потребления изотопа или его выделения, необходимо учитывать соотношение меченого и немеченого субстрата, внесенного в пробу для расчета специфической активности потребления субстрата или образования продукта. В качестве контрольных образцов ставят опыты с клетками, убитыми формальдегидом или кипячением.

Изучение активности микроорганизмов в природных образцах проводят с учетом так называемого «изотопного эффекта», заключающегося в том, что живые клетки способны по-разному использовать легкие и тяжелые изотопы одного и того же элемента в биологических реакциях. В микробной экологии наибольшее распространение получили исследования, связанные с трансформацией изотопов углерода и серы. Большинство углерода представлено в природе в виде изотопа ^{12}C , хотя встречается небольшое количество стабильного тяжелого ^{13}C и радиоактивного ^{14}C . Значительная часть соединений серы состоит в основном из ^{32}S , хотя встречается стабильный изотоп ^{34}S и радиоактивный ^{35}S . При проведении большинства таких реакций живые организмы способны «выбирать» соединения с более легким изотопом из имеющихся в наличии. Поэтому вещества с более тяжелыми изотопами остаются непрореагировавшими, и их относительная доля в оставшемся субстрате увеличивается, а в продукте — уменьшается. Это явление получило название «фракционирование изотопов». Изучение проб различного происхождения показало, что наиболее «тяжелыми» по углероду являются морские карбонаты химического происхождения с соотношением $\Delta^{13}\text{C} = \pm 5\%$. Недавние в геологическом масштабе морские осадки имеют $\Delta^{13}\text{C} = -10 \div 35\%$, что явно говорит об участии микроорганизмов в их формировании. Биомасса растений имеет дефицит по ^{13}C в 12–25%, нефть — 20–35%, а метан — 25–80%. Интересно отметить, что скальные породы возраста около 3,5 млрд лет (время появления жизни на Земле) обеднены по ^{13}C на 12–22%, что свидетельствует об очень раннем возникновении автотрофии на планете. Подобные же измерения, проведенные в отношении изотопов серы, показали, что метеоритный сульфид имеет $\Delta^{35}\text{S}$ от –3 до +3%, тогда как залежи элементарной серы — от –18 до +18%, а сульфид морских осадков может иметь $\Delta^{35}\text{S}$ до –30%, что говорит о значительном вкладе сульфатредукторов в процесс глобального цикла серы.

Последние достижения в аналитической методологии позволяют проводить измерение метаболической активности микроорганизмов в их

природных экологических нишах, однако при постановке опытов следует учитывать возможные возмущения микроокружения клеток при введении измеряющих объектов. Так, простое ограничение микрониши стенками может вызвать пристеночный эффект, а отбор проб из ограниченного пространства — нарушить газовый баланс (содержание кислорода). Все это приводит к снижению точности и воспроизводимости результатов измерений. Определение гетеротрофного потенциала данной экониши осуществляют, изучая включение радиоактивной метки (обычно ^{14}C) из введенных в образец меченых гетеротрофных субстратов. Этот подход предполагает, что субстрат из среды потребляется, подчиняясь кинетике реакций первого порядка, и что скорость поглощения увеличивается с увеличением концентрации субстрата до достижения максимальной ($V_{\max}$). Это значение можно подсчитать, пользуясь уравнением Михаэлиса — Ментен и строя график зависимости скорости поглощения субстрата от его концентрации в координатах Лайнуивера — Берка. Определение скоростей активности микроорганизмов этим методом ограничено набором субстратов, используемым данным сообществом. Обычно при определении гетеротрофного потенциала местообитания используют ацетат, глюкозу и другие сахара, глутамат и другие аминокислоты или смесь меченых продуктов фотосинтеза, образующихся после инкубации водорослей на свету с $^{14}\text{CO}_2$. При оценке метаболических активностей популяций определяют также процент дыхания, подсчитываемый как отношение суммы включенного ^{14}C и выделившегося $^{14}\text{CO}_2$ к выделившемуся $^{14}\text{CO}_2$ и выраженный в процентах. Проценты дыхания — показатель количества энергии, затрачиваемой популяцией на поддержание устойчивости системы, причем чем выше процент дыхания, тем больше метаболической энергии тратится на поддержание.

Скорости микробной продукции измеряют обычно с использованием меченого тритием тимидина $\{[^3\text{H}]\text{-Тд}\}$, который включается непосредственно только в ДНК прокариот и отражает скорость роста микроорганизмов в популяции или прироста биомассы. Этот метод чрезвычайно удобен для анализа скоростей роста водных микроорганизмов. В почве его применение затруднено из-за связывания меченого тимидина и ДНК с гуминовыми и глинистыми веществами.

Скорость фотосинтеза измеряют чаще всего в водных образцах в светлых и темных склянках с введенной порцией $^{14}\text{CO}_2$. Образцы инкубируют в течение нескольких часов или всего светового периода *in situ* и определяют скорость включения меченой углекислоты (обычно в течение первых 1–2 ч инкубации), что отражает скорость фотосинтеза. Регистрируют также общее включенное количество $^{14}\text{CO}_2$ (за более длительный период), что соответствует чистой продукции фотосинтеза (т.е. разнице между количеством включенного $^{14}\text{CO}_2$ и количеством органического вещества, минерализованного до $^{14}\text{CO}_2$ в результате дыхания).

Скорость дыхания определяют, измеряя скорость выделения $^{14}\text{CO}_2$ из органических субстратов, которая отражает скорость минерализации органического вещества данной экологической ниши. Существуют также методы нерадиоактивного определения метаболической активности, при которых измеряют скорость дыхания пробы, взятой из данного места,

с помощью закрытого кислородного электрода Кларка, или регистрируют образование CO_2 в постоянно аэрируемой пробе, куда внесен субстрат дыхания. Для длительных экспериментов по улавливанию образующегося CO_2 применяют специальные герметичные колбы с двумя сообщающимися отсеками, в одном из которых происходит химическое связывание образующегося CO_2 концентрированным раствором щелочи, а в другом помещают исследуемый образец.

При измерении ферментативного потенциала популяций определяют активности ферментов различных групп. Это могут быть активности ферментов, присущих всем членам сообщества (суммарные активности дегидрогеназ, эстераз, фосфатаз) или специфичные для определенной его части (целлюлазная, хитиназная, нитрогеназная, денитрифицирующая активности). При измерении ферментативных активностей *in situ* важно не нарушать микроокружение данной ниши и следить за температурой, pH, влажностью, ОВП, а периоды инкубации (измерения) должны быть достаточно короткими, чтобы за это время число микроорганизмов не могло значительно измениться.

14.3. Глобальные циклы биогенных элементов и участие в них микроорганизмов

14.3.1. Основные понятия

Потоки элементов на нашей планете осуществляются по замкнутому пути и находятся в постоянном круговороте, в котором участвуют как живые организмы, так и абиогенные источники. В природе превращения отдельных элементов происходят во взаимосвязанных и взаимозависимых биогеохимических циклах, протекающих как в масштабе всей планеты, так и в каждой отдельной экосистеме. Микроорганизмы, обладающие широчайшими возможностями метаболизма, являются основными биогеохимическими агентами. Представители мира микробов способны осуществлять все реакции глобальных циклов. Круговорот каждого элемента содержит два компонента: подвижный, или обменный фонд, состоящий из соединений элемента, быстро передаваемых между органической и неорганической формами, и резервный фонд, содержащий медленно движущиеся вещества, в основном, абиогенного происхождения. В биосфере присутствуют как циклы соединений, резервный фонд которых имеется в атмосфере или гидросфере, так и осадочные циклы с резервным фондом в земной коре. Круговороты газообразных (летучих) и растворимых веществ (например, циклы углерода, кислорода, азота) обладают значительной, но не бесконечной способностью к саморегуляции и быстрой компенсации нарушений из-за рассеивания воздушными или водными потоками. Осадочные циклы (например, железа и фосфора) в меньшей степени могут компенсировать нарушения, поскольку резервный фонд земной коры состоит из малоподвижных и практически нерастворимых соединений. «Увод» элемента из круговорота происходит на длительное время, а возврат, как правило, связан с биологической активностью.

14.3.2. Цикл углерода и его связь с циклом кислорода

На Земле основополагающим является цикл углерода, сопряженный с циклом кислорода (рис. 14.2).

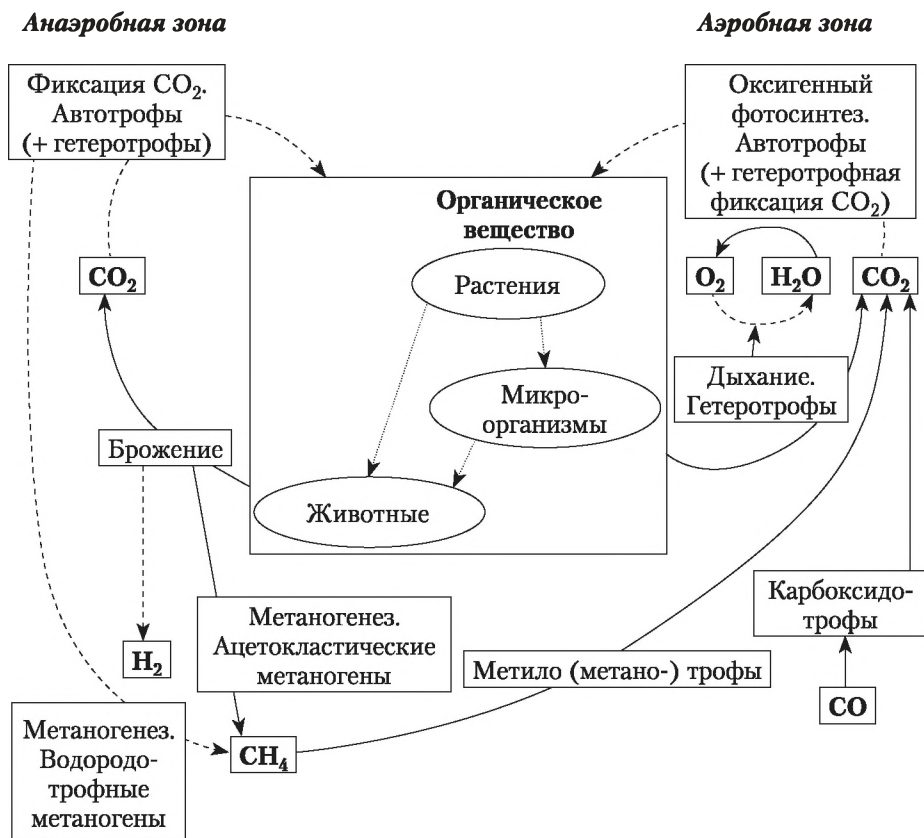


Рис. 14.2. Цикл углерода и его связь с циклом кислорода:

сплошные линии — процессы окисления; пунктир — процессы восстановления;
точечные линии — процессы, идущие без изменения валентности

Первичная продукция органического вещества осуществляется фото- и хемоавтотрофными организмами. Значительная часть углекислого газа ассимилируется за счет энергии Солнца высшими растениями, но определенный вклад в образование органических форм углерода вносят как фототрофные микроорганизмы, способные к кислородному и анакислородному фотосинтезу, так и прокариоты-хемолитоавтотрофы. Часть углекислого газа включается в органические вещества путем гетеротрофной фиксации CO_2 . Преобразование одних органических веществ в другие происходит в метаболизме всех живых существ (животных, растений, микроорганизмов). Разложение (**деструкция**) органического вещества до углекислого газа осуществляется различными путями, зависящими от наличия молекулярного кислорода в среде, и завершается в конечном итоге образованием CO_2 , замыкая круговорот углерода. В присутствии кислорода органические

вещества окисляются в процессе аэробного дыхания. Таким образом, сопрягаются циклы углерода и кислорода. Молекулярный кислород появляется в процессе оксигенного фотосинтеза высших растений, водорослей и цианобактерий, которые используют воду как донор электронов. В анаэробных условиях углекислый газ выделяется при брожениях. Восстановление CO_2 осуществляют облигатно анаэробные группы метаногенов и гомоацетогенов. Важной формой органического углерода в круговороте является уксусная кислота, образуемая при разных типах брожения и потребляемая метаногенами. Метан, мигрируя из анаэробной зоны в аэробную, окисляется до углекислого газа метанотрофами. Некоторая часть метана может окисляться анаэробно при участии синтрофного сообщества метаногенов и сульфатредукторов. Угарный газ, образующийся абиогенно, вовлекается в круговорот микроорганизмами-карбоксидотрофами. Нарушение равновесия между процессами продукции и деструкции, возникающее при определенных значениях физико-химических факторов среды, может приводить к накоплению органических форм углерода в экосистеме и «уводу» их из круговорота на длительное время. К природным «накоплениям» можно отнести **гумус**, состоящий из продуктов неполного разложения лигнина, а также образующиеся при недостатке кислорода и накоплении кислот торф, каменный уголь, нефть и газ. Добыча и потребление полезных ископаемых приводят к их быстрой деструкции и возвращению неорганического углерода в цикл. Вывод углерода из цикла осуществляется и в форме созданных человеком трудноразлагаемых органических веществ-**ксенобиотиков** (пластиков, пестицидов, красителей и др.). Именно поэтому проблема их деструкции в настоящее время стоит так остро. «Увод» углерода из круговорота может происходить при образовании неорганических отложений (известняков) за счет соединения в водных системах (особенно в морских) ионов Ca^{2+} с карбонатными (CO_3^{2-}) ионами. Возвращение такого углерода может происходить либо путем химического выветривания пород, либо за счет выработки микроорганизмами кислых продуктов.

14.3.3. Круговорот азота

В природе азот находится в составе минеральных солей, в форме органических соединений и в виде инертного молекулярного азота. Молекулярный азот, составляющий 78% земной атмосферы, не доступен большинству живых организмов. Однако такой важный биогенный элемент как азот должен включаться в состав первичных органических веществ, в частности, белков, наряду с углеродом. Основные первичные продуценты на Земле — растения — способны использовать азот только в форме аммония или нитрата, поэтому органические соединения азота предварительно должны быть переведены в минеральные соли, а молекулярный азот — в связанную форму. К фиксации молекулярного азота способны только прокариотические микроорганизмы, без которых цикл азота не мог бы замкнуться. Основными стадиями круговорота азота являются азотфиксация, аммонификация, нитрификация, ассимиляционная и диссимиляционная нитратредукция (рис. 14.3), причем микроорганизмы способны осуществлять все взаимопереходы форм азота.

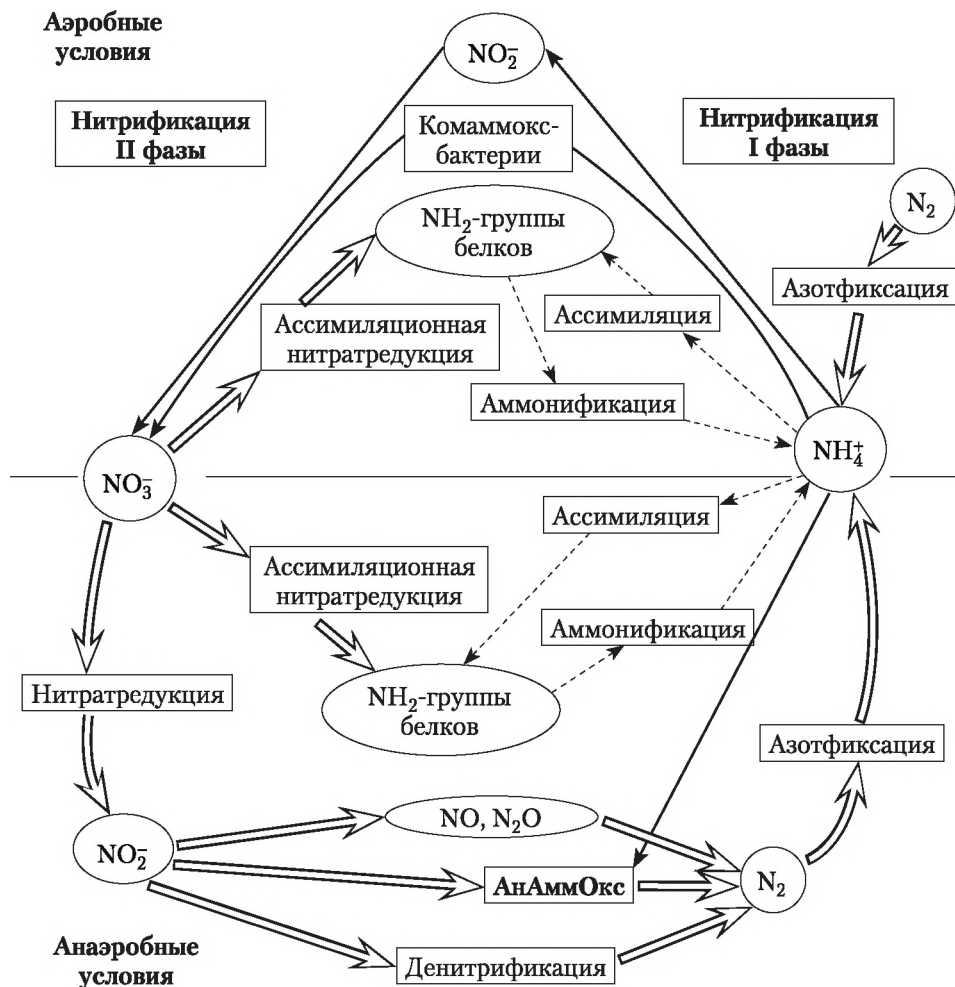


Рис. 14.3. Цикл азота:

толстые линии — процессы восстановления; тонкие линии — процессы окисления;
пунктирные линии — процессы, идущие без изменения валентности

В процессе аэробной и анаэробной аммонификации аминокруппы органических соединений превращаются в ион аммония. Биополимеры (в основном, белки) предварительно гидролизуются с образованием мономеров (коротких пептидов и аминокислот). К наиболее активным аммонификаторам относятся почвенные и патогенные микроорганизмы — представители родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* и плесневые грибы. Аммиак выделяется также при разложении мочевины уробактериями. Аммонийный азот может ассимилироваться микроорганизмами путем аминирования и переаминирования, а также окисляться в аэробных условиях для получения энергии в двухстадийном процессе нитрификации. Нитрификаторы I фазы образуют нитриты, потребляемые нитрификаторами II фазы с образованием нитратов. Комаммокс-бактерии способны последовательно окислять аммоний

в нитрит и нитрат. Некоторая часть аммония окисляется гетеротрофно без получения энергии. В анаэробных условиях аммоний при взаимодействии с нитритом преобразуется в молекулярный азот анаммокс-планктомицетами. Подсчитано, что до 70% газообразного азота в природе может образовываться за счет анаммокс-процесса. Растения, некоторые бактерии и грибы способны к восстановлению нитратов в аммонийную форму с последующим включением ее в вещества клетки (ассимиляционной нитратредукции). Диссимиляционная нитратредукция (нитратное дыхание) активно осуществляется факультативно анаэробными микроорганизмами в анаэробных зонах. Восстановление нитратов до нитритов характерно для некоторых видов родов *Bifidobacterium* и *Pseudomonas*. Представителям родов *Bacillus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* свойственно восстанавливать нитраты через ряд продуктов до газообразного азота (осуществлять денитрификацию). При этом местообитание теряет азот. Использование молекулярного азота доступно исключительно прокариотическим микроорганизмам-азотфиксаторам, замыкающим таким образом цикл азота. Азотфиксация происходит как в аэробных, так и в бескислородных условиях. Азотфиксаторы обнаружены во многих группах микроорганизмов (среди цианобактерий, метилотрофов, членов родов *Clostridium*, *Azotobacter*, *Rhizobium* и др.).

14.3.4. Цикл серы

Микроорганизмы способны осуществлять все реакции глобального цикла серы, основными формами которого являются серосодержащие органические вещества, сероводород, элементарная сера и сульфаты (рис. 14.4).

Сероводород повсеместно образуется при разложении белка путем отщепления SH-групп (десульфуризации). В аэробных условиях тионовые бактерии окисляют его до элементарной серы и далее до сульфата. Аноксигенные фототрофы и некоторые цианобактерии используют сероводород и элементарную серу как доноры электронов при фотосинтезе. Некоторые археи и сульфатредукторы способны проводить диспропорционирование элементарной серы, при котором одновременно происходит окисление одной ее части с образованием сульфата и восстановление другой — с образованием сероводорода. Восстановление сульфата происходит в процессе ассимиляционной сульфатредукции, при этом продукт реакции S^{2-} встраивается в органические вещества клетки. В анаэробных зонах к образованию сероводорода приводят процессы анаэробного дыхания с использованием сульфатов и элементарной серы в качестве конечных акцепторов электронов.

14.3.5. Превращение микроорганизмами соединений фосфора

На Земле в естественных местообитаниях фосфор распространен неоднородно, и количество его ограничено, поэтому развитие живых организмов сдерживается доступностью фосфора. В отличие от некоторых форм углерода, азота и серы, этот элемент не подвержен выбросам в атмосферу, за исключением экстремальных обстоятельств. Газовая форма соединений фосфора практически не участвует в биогеохимическом цикле фосфора. Процесс восстановления фосфора возможен в цепи окислительно-восстановительных реакций:

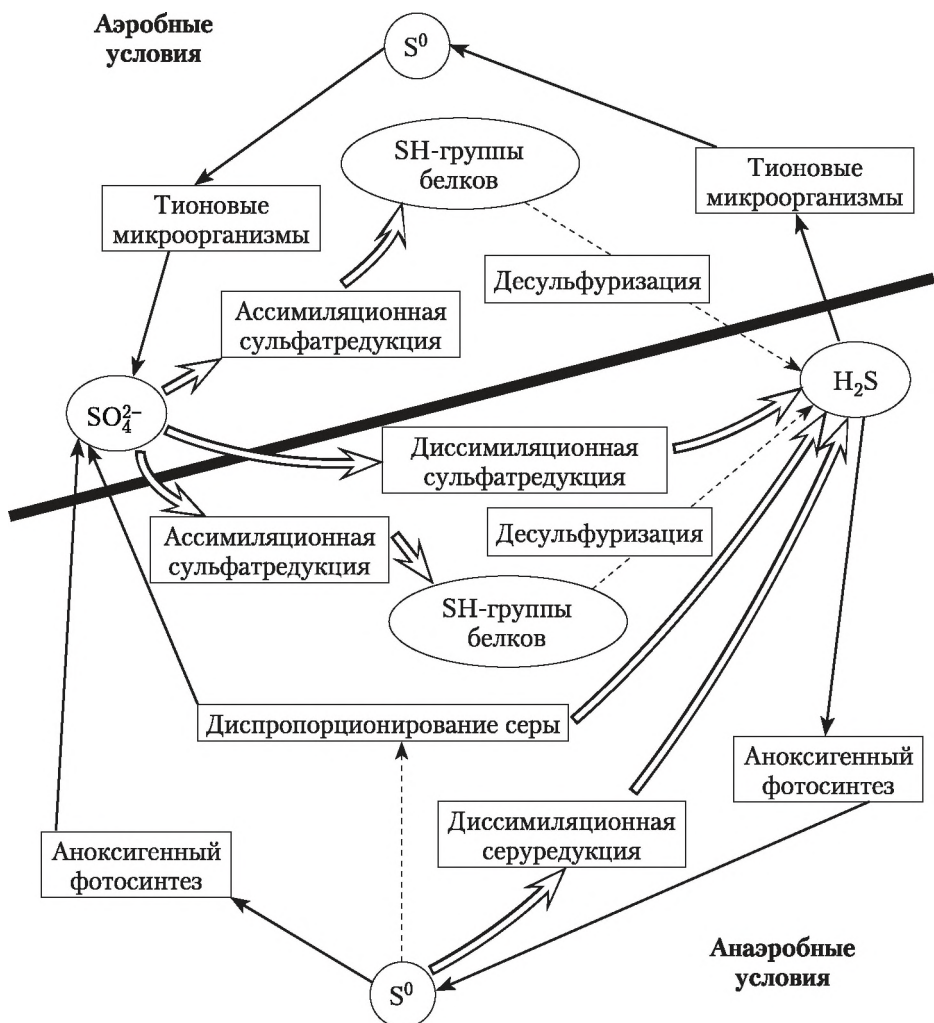


Рис. 14.4. Цикл серы:

толстые линии — процессы восстановления; тонкие линии — процессы окисления; пунктирные линии — процессы, идущие без изменения валентности

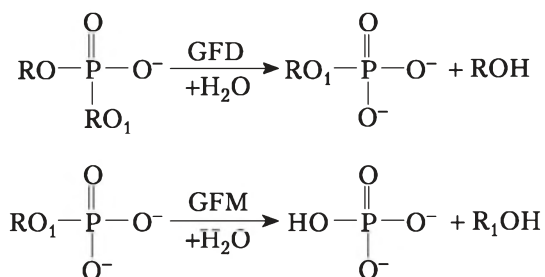
$H_3P^{+5}O_4$ (фосфат) $\rightarrow H_3P^{+3}O_3$ (фосфит) $\rightarrow H_3P^{+1}O_2$ (гипофосфит) $\rightarrow P^{-3}H_3$ (фосфин), но обычно этот процесс не имеет особого значения и роль микроорганизмов в нем не ясна. Есть данные, что некоторые микроорганизмы могут окислять фосфит в сульфатредуцирующих условиях: $HPO_3^{2-} \rightarrow HPO_4^{2-}$, однако нет доказательств, что это окисление дает им энергию. Использование микроорганизмами PO_4^{3-} в качестве конечного акцептора электронов — это редкое и необычное явление, особенно если восстановление происходит до уровня фосфина. Фосфин — это летучий газ, самопроизвольно возгорающийся в контакте с кислородом и горящий зеленоватым пламенем, ОВП его чрезвычайно низок (-345 мВ при pH 7,0). Образование фосфина возможно только после полного восстановления имеющихся CO_2 .

Резервным фондом фосфора является литосфера, в частности, горные породы и отложения, сформированные на ранних этапах геологической эволюции нашей планеты. Фосфор в основном присутствует в скалах и почве, а при попадании в морскую воду «уводится» из цикла в виде нерастворимых минеральных солей. В связи с этим крупнейшим резервуаром фосфора на Земле являются осадки на океаническом дне. На суше фосфор встречается в растворимых и нерастворимых формах органических и минеральных соединений. Растворимый фосфор — это анион ортофосфата (PO_4^{3-}), осаждаемый Ca^{2+} , Mg^{2+} и Fe^{2+} при нейтральном и слабощелочном pH. При еще более высоких значениях pH он снова может переходить в растворимую форму, связывая ионы Na^+ . При значениях pH, характерных для почвы, фосфор может находиться также в формах гидрофосфата (HPO_4^{2-}) и дигидрофосфата (H_2PO_4^-). В почве фосфор содержится, в основном, в составе трудноразлагаемых веществ и становится доступным растениям только после расщепления их микроорганизмами. Идентифицировано более 200 форм минерального фосфора в почвах. Наиболее часто встречающиеся соединения — это апатиты с общей формулой $\text{M}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, где М — металл, а Х — галоген. От общего органического фосфора почвы инозитолфосфат составляет от 15 до 30%, на нуклеотиды приходится 2–5% и на фосфолипиды — 1...2%. Большая часть органического фосфора находится в неидентифицированных соединениях.

Круговорот фосфора проще, чем циклы других макроэлементов, и заключается в переходе органических фосфорсодержащих соединений в фосфаты, которые могут использоваться растениями и другими автотрофами. Доступный фосфор высвобождается также в результате выветривания горных пород. При «уводе» фосфора в морские осадки он может надолго выпадать из круговорота. Считается, что механизмы возврата фосфора в цикл не достаточно эффективны и не компенсируют его потерь. Микробный цикл фосфора отражает его движение между неорганическим и органическим пулами и между нерастворимой и растворимой формами. Микроорганизмы играют главную роль в растворении, иммобилизации (связывании) и минерализации фосфора. Существует три основных механизма, позволяющих растворять минеральные формы фосфора и делать их доступными для растений: хелатирование, восстановление железа в фосфорных минералах и подкисление. Все три механизма дестабилизируют минералы, содержащие фосфор. Так, органические соединения, образуемые микроорганизмами, такие как оксалат, могут связывать Ca^{2+} , Mg^{2+} и Fe^{2+} , тем самым переводя фосфор в растворимое состояние. Двухвалентное железо обладает большей растворимостью, чем трехвалентное, поэтому фосфорные минералы, содержащие Fe^{2+} , более растворимы. При замещении трехвалентного железа двухвалентным, например, в анаэробных условиях, концентрация доступного фосфора существенно возрастает. Образование микроорганизмами кислых продуктов (органических кислот — азотистой, азотной, серной и угольной) приводит к растворению минералов фосфора. Именно поэтому перед внесением фосфатных удобрений значительный эффект дает смешивание почвы с навозом и серой, которую тиобациллы

преобразуют в серную кислоту. Растворение фосфорных минералов микроорганизмами можно легко проследить чашечным методом по образованию прозрачных зон растворения осадков минералов вокруг колоний в чашках Петри.

Органический фосфор, составляющий от 30 до 50% всего фосфора в почве, должен превратиться в минеральный, чтобы стать доступным для растений. Фосфолипиды и нуклеиновые кислоты минерализуются быстро, а инозитолфосфаты — медленно. Минерализация проходит быстрее при повышенных температурах, слабощелочной или нейтральной реакции почвы и при высоком содержании органического фосфора. Бактерии, активно минерализующие фосфор, составляют до 10% от общей микробной популяции почвы. Это преимущественно ризосферные организмы родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* и некоторые грибы. Органические соединения фосфора подвергаются минерализации под действием их гидролаз фосфорных эфиров (**фосфатаз**) в соответствии с реакцией



где GFD и GFM — гидролазы фосфорных ди- и моноэфиров соответственно. Моноэстеразы фосфата обладают четко выраженными оптимумами pH при 6,5 («кислые фосфатазы») и 11,0 («щелочные фосфатазы»). Фосфатазы микроорганизмов могут быть внеклеточными. Отдельные фосфатазы могут иметь мультисубстратную специфичность. Пониженное содержание фосфора в почве стимулирует образование фосфатаз и минерализацию лабильных органических соединений, содержащих фосфор. Для полного расщепления фосфорных диэфиров ($\text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{R}_1$) необходимо воздействие нескольких ферментов. Почвы с высокими концентрациями неорганического фосфора подавляют фосфатазные активности и снижают скорость минерализации органического фосфора. Еще один тип ферментов — фитазы, находят у многих организмов, но их активность невелика вследствие невысокой концентрации фитина в почвах. За один каталитический акт фитаза снимает одну фосфатную группу в молекуле фитина.

Концентрация фосфора в клетках микроорганизмов обычно в 10 раз выше, чем в растительных. Фосфор может составлять от 0,5 до 1,0% грибного мицелия и от 1 до 3% биомассы бактерий. Большая часть фосфора у микроорганизмов содержится в РНК (от 30 до 50%). При низких концентрациях фосфора в почве микроорганизмы связывают (иммобилизуют) его в биомассе, лишая растений доступного фосфора. Бактерии также запасают фосфор в виде полифосфатов (волютина), накапливая его в больших, чем

им требуется, количествах. Это приводит к тому, что фосфор переводится в недоступную растениям форму. Быстрота связывания зависит от скорости роста микроорганизма и доли фосфора в органических соединениях. Для оптимального развития почвенной микробиоты содержание фосфора должно составлять 0,3% от общего количества органических соединений, расходуемых на рост. Дефицит фосфора можно создать, добавляя в почву избыток углерода.

Симбиозы корней растений с мицелием грибов или актиномицетов (**микориза** или **актинориза**) вносят существенный вклад в общее фосфорное питание растений четырьмя основными способами:

1) мицелиальные симбионты растворяют минеральные соединения фосфора, выделяя органические кислоты и CO_2 в процессе дыхания;

2) микориза (актинориза) увеличивает объемы почвы, из которых фосфор может поступать в растение, поскольку она значительно расширяет всасывающую поверхность;

3) поглощение фосфора микоризой (актиноризой) по сравнению с корневой системой растений происходит при более низких его концентрациях в почве;

4) некоторые мицелиальные симбионты выделяют кислые фосфатазы, минерализующие органический фосфор почвы.

Многие животные накапливают фосфор в тканях мозга, скелета, панциря, извлекая его непосредственно из растительной пищи, органических взвесей или биогенных илов. В окружающую среду этот элемент возвращается при разложении органического вещества. Сохранение баланса фосфора в природе поддерживается слабой подвижностью его соединений и их фиксацией в почве гидроксидами железа, марганца, алюминия, глинистыми минералами. 40–50% фиксированного фосфора может быть десорбировано и использовано растениями. Этот процесс зависит от значений pH и ОВП среды. Повышенная кислотность и наличие кислорода способствуют десорбции фосфора и усилению миграции фосфорных соединений. На Земле в ряде местообитаний (в основном, это пресные озера и реки) развитие растений и животных сильно ограничено доступностью фосфора.

Деятельность человека ведет к нарушению круговорота фосфора и его усиленной потере. Длительное и интенсивное культивирование сельскохозяйственных растений без специального добавления фосфоросодержащих соединений (фосфорных удобрений) приводит к истощению посевных площадей. Однако все разведанные месторождения фосфатов близки к истощению. В то же время перераспределению фосфорных соединений способствует развитие промыслов рыбы, морских моллюсков и водорослей, а также производство фосфоросодержащих видов продовольствия и кормов, которые перевозятся в места с высокой плотностью населения, что увеличивает содержание фосфора в окружающей среде больших городов. Напротив, территории, где не применяются фосфорные удобрения, но активно экспортируются сельскохозяйственные продукты, теряют запасы фосфора в почвах. Концентрация фосфора и его минерализация зависят от степени и способа обработки почвы. Соединения фосфора отно-

сительно неподвижны в почве, поэтому они могут быть стратифицированы в почвенных горизонтах. Так, через 6 лет концентрация фосфора на глубине 7,5 см в обычных пахотных почвах снижается в три раза по сравнению с почвами, не подвергавшимися вспашке.

Производство и использование в быту фосфорсодержащих препаратов приводят к загрязнению речных и озерных вод и вызывают их культурную евтрофикацию. **Евтрофикация** — это природный процесс, который происходит в старых заросших и заболачиваемых озерах, переполненных озерным осадком. Она заключается в возникновении условий повышенного содержания питательных веществ, так что начинается неконтролируемый рост водорослей и водных растений. После отмирания растений находящаяся в водной толще микробиота разлагает отмерший органический материал и быстро поглощает доступный кислород при дыхании. Это приводит к замору водных животных, особенно рыб, не способных переносить низкие концентрации растворенного кислорода. Хозяйственная деятельность человека может многократно ускорить этот процесс (вызвать «культурную евтрофикацию»). Культурная евтрофикация — основная проблема водоемов, окруженных городскими и сельскими постройками. Питательные вещества, которые вызывают евтрофикацию, обычно привносятся в водоемы с поверхностными водами, несущими удобрения с сельскохозяйственных угодий, с бытовыми и промышленными сбросами, попадающими без очистки в реки и озера.

В недавнем прошлом фосфаты широко использовали в моющих средствах для эффективного связывания катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , придающих воде жесткость и препятствующих хорошей работе детергентов. В настоящее время использование фосфатов в моющих препаратах запрещено, поскольку сточные воды с избытком фосфатов вызывают резкую вспышку развития водорослей и цианобактерий в пресных водоемах и прибрежных зонах морей, что может привести к негативным экологическим последствиям. В настоящее время во многих штатах США законодательно ограничено количество общего фосфора, которое может быть внесено в почву вокруг чувствительных к евтрофикации озер и рек, таких как водоемы долины реки Гудзон. На очистных сооружениях строго контролируют уровень фосфора в сточных водах после их обработки, при необходимости осаждая фосфор химическими соединениями.

14.3.6. Превращение микроорганизмами соединений железа

Железо — широко распространенный на Земле элемент, существующий в земной коре в основном в виде труднорастворимых окисных и сульфидных минералов. В экосистемах этот элемент присутствует в двух главных степенях окисления. Микроорганизмы способны осуществлять в природе замкнутый цикл железа (рис. 14.5). Они используют соединения железа в энергетических и конструктивных процессах, а также могут откладывать железо внутри клеток и во внеклеточных структурах. Железо входит в состав многих ферментов, участвует в образовании хлорофилла и гемов. Направление микробной метаболической активности в значительной степени зависит от наличия и концентрации молекулярного кислорода. В при-

сутствии кислорода стабильно только трехвалентное железо, тогда как в анаэробных условиях стабильность двух- и трехвалентного железа одинакова. В водных растворах при $\text{pH} > 6$ катионы Fe^{2+} и Fe^{3+} неустойчивы и выпадают в виде нерастворимых соединений. Вещества, содержащие в своем составе двухвалентное железо, легко окисляются как микроорганизмами, так и в чисто химических процессах, и образовавшиеся нерастворимые соединения трехвалентного железа либо осаждаются в нижележащие анаэробные слои в водных системах, либо депонируются в аэробной экосистеме почвы.

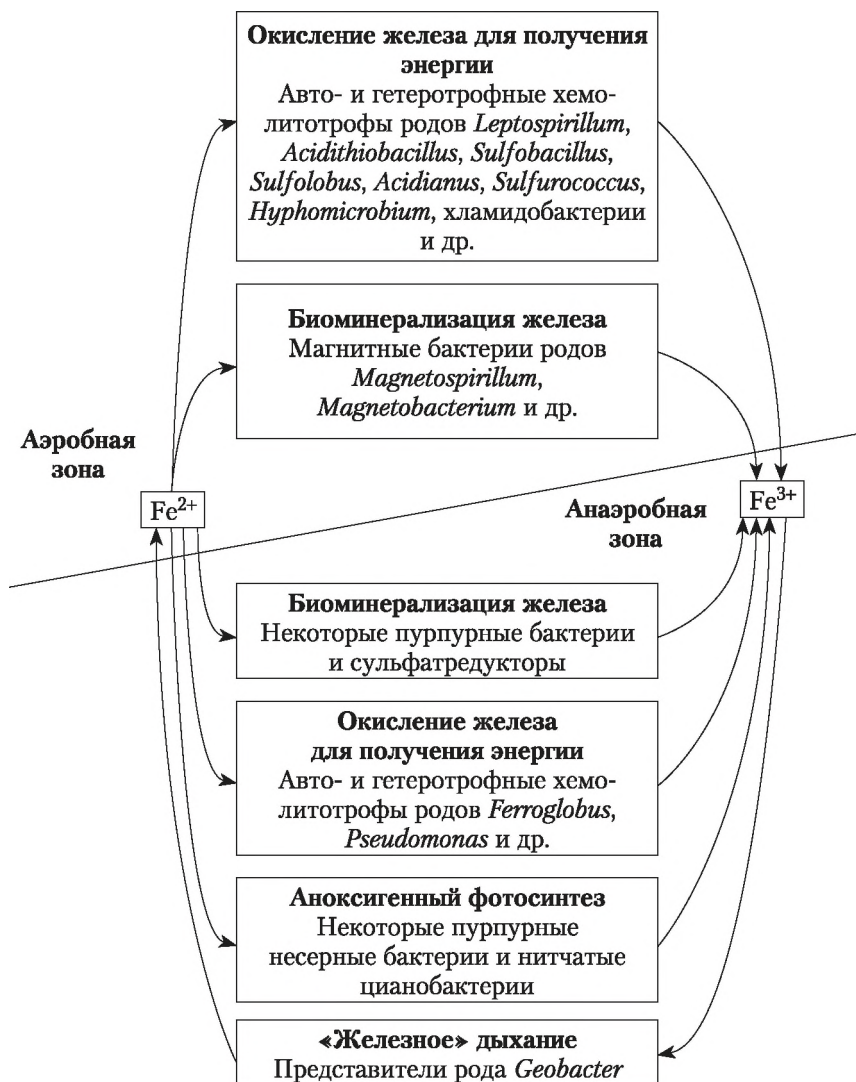


Рис. 14.5. Цикл железа

Аэробное окисление двухвалентного железа способны осуществлять морфологически, физиологически и филогенетически разные микроорга-

низмы. Это, прежде всего, группа железooksидлителей-хемолитоавтотрофов (бактерии *Leptospirillum ferrooxidans*, *L. thermoferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *Sulfobacillus acidophilus*, *S. thermosulfidooxidans* и археи рода *Ferroplasma*), а также факультативные литоавтотрофы — археи родов *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Sulfurococcus* и бактерии *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Galionella ferruginea*, представители рода *Thiomonas*. Большая группа аэробных гетеротрофных окислителей железа представлена так называемыми хламидобактериями родов *Leptothrix* и *Sphaerotilus*, образующими мощные поверхностные структуры, в которых откладываются нерастворимые соединения трехвалентного железа, и видами семейства *Hyphomicrobiaceae*, имеющими выросты-простеки.

Анаэробное окисление двухвалентного железа показано в природе при хемолитотрофии, когда конечным акцептором электронов в ЭТЦ служит, как правило, нитрат. К такому процессу способны неидентифицированные факультативно литоавтотрофные представители классов *Beta*- и *Gammaproteobacteria*, а также литоавтотрофный *Pseudomonas stutzeri*. Из архей анаэробно окислять двухвалентное железо в присутствии нитрата способен *Ferroglobus placidus*. Использование закисных форм железа в качестве донора электронов для аноксигенного фотосинтеза изучено у ряда представителей пурпурных несерных бактерий родов *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Rhodomicrobium*. Есть данные об окислении двухвалентного железа в процессе аноксигенного фотосинтеза у нитчатых цианобактерий. В анаэробных зонах трехвалентное железо восстанавливается прежде всего в процессе «железного» дыхания, при этом образованные растворимые катионы Fe^{2+} могут легко диффундировать в вышележащие аэробные системы.

Для ряда микроорганизмов, например, для *Chloroflexus aurantiacus*, показано, что окисление железа имеет защитную функцию «борьбы» с активными формами кислорода и не связано с получением энергии.

14.3.7. Участие микроорганизмов в превращениях ряда других элементов

Микроорганизмы, обладающие широчайшими метаболическими механизмами, способны вовлекать в биологический круговорот практически любой элемент на Земле. Различные соединения могут также подвергаться воздействию продуктов микробного обмена веществ. Микробиологические превращения элементов происходят разными путями:

- 1) ассимиляция и включение в состав органических соединений;
- 2) окисление-восстановление;
- 3) аккумуляция-иммобилизация;
- 4) осаждение растворение;
- 5) извлечение из минералов;
- 6) хелатирование и т.д.

В реакциях соединений кальция, магния, калия, марганца, алюминия и других значительная роль отведена процессам разрушения и генерации плохо растворимых минералов.

Так, **цикл кальция** состоит из биологически опосредованных реакций выщелачивания и осаждения карбонатов, в том числе путем формирования минеральных скелетов у ряда простейших и прокариот. Круговорот кальция связан также с циклом фосфора на уровне фосфатов кальция и с циклом кремния — через химическое выветривание кальция из силикатных изверженных пород. Стократно ускоренное под действием микроорганизмов и их метаболитов выщелачивание кальция и магния углекислотой обеспечивает их первичное поступление в биологические реакции. Кальций представлен шестью стабильными изотопами, из которых ^{40}Ca имеет наибольшее распространение (96,97%). В природных условиях кальций легко окисляется до CaO . Кальций выщелачивается природными водами из многочисленных образованных им минералов (силикатов — гранатов, пироксенов, цеолитов и др., карбонатов — арагонита, кальцита и доломита, сульфатов — гипса и ангидрита, фосфатов — апатита, галоидов — флюорита). В виде взвесей карбонатов, сульфатов и растворенного бикарбоната этот элемент выносится реками в океан, где в зависимости от температуры воды и жизнедеятельности морских обитателей формируются донные отложения CaCO_3 и карбонатные скелеты и раковины живых организмов.

Растворение известняков и высвобождение кальция может происходить при участии образованных микроорганизмами в процессах брожения и анаэробного дыхания кислот, а его осаждение — в процессе аэробного дыхания и выделения углекислоты микроорганизмами, в частности, цианобактериальными матами с образованием слоистых осадочных пород (**строматолитов**). Кальций в виде гуматов входит в состав почвенно-поглощающего комплекса. В кислых почвах кальций накапливается в подстилке из-за активного выщелачивания и аккумуляции его живыми организмами. Нарушению биогеохимического круговорота кальция способствует не только его отчуждение с продукцией сельского хозяйства, но и использование карбонатных минералов в строительстве, металлургии и для известкования почв для земледелия.

Марганец, как и железо, является переменновалентным металлом, но усваивается микроорганизмами, в основном, в двухвалентной форме. В почве марганец рассеян в виде разных соединений, в частности, в форме металлорганических комплексов. В состав железомарганцевых конкреций этот элемент может входить в трех- и четырехвалентном состоянии. Содержание марганца в земной коре значительно ниже, чем железа (0,1%). Превращения марганца в почве заключаются в его мобилизации из почвообразующих минералов, образовании и разрушении металлорганических комплексов, окислении-восстановлении и накоплении его микроорганизмами. Входя в состав многих ферментов и участвуя в дыхании, фотосинтезе и азотфиксации, марганец активно вовлекается в биологический круговорот. Окислительные процессы с получением энергии для роста способны осуществлять почвенные плесневые грибы, некоторые штаммы почвенных гетеротрофных бактерий родов *Arthrobacter*, *Citrobacter*, *Pedomicrobium* и обитающие в пресных и морских водах представители родов *Bacillus*, *Hyphomicrobium*, *Oceanospirillum*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Leptothrix discophora*, а также штаммы *Metallogenium personatum* и *M. symbioticum*. Марганец-

окисляющим хемолитоавтотрофом в природе является архей из горячих источников *Sulfolobus acidocaldarius*. Известны микроорганизмы, способные к аккумуляции и отложению слаборастворимых соединений марганца (например, *Crenothrix manganiifera*). Восстановление окислов марганца могут осуществлять некоторые факультативные анаэробы при пониженном ОВП среды. Специфические восстановители марганца, способные к анаэробному дыханию с окисленными его соединениями в качестве конечного акцептора, не обнаружены. Протекание биогеохимического цикла марганца зависит от физико-химических условий среды (активности воды, значения pH, степени аэрации, наличия органического вещества) и значительно нарушается техногенными процессами.

Алюминий находится в почве в виде минералов, гидроокиси и алюмоорганических соединений. При участии почвенных микроорганизмов происходят реакции хелатирования, высвобождающие алюминий из алюмосиликатных минералов. Алюмоорганические соединения (комплексы алюминия с органическими кислотами, аминокислотами и белками) также поступают в почву с растительными остатками. В форме металлоорганических соединений алюминий способен к миграции в широком диапазоне pH. Далее жизнедеятельность почвенных микроорганизмов (в частности, бактерий рода *Metallogenium* и плесневых грибов рода *Penicillium*) может приводить к минерализации алюмоорганических соединений до соответствующих гидроокисей. Связываясь с гуматами, алюминий иммобилизуется в составе гумуса.

Несмотря на значительное распространение кремния и его соединений в природе (до 87% литосферы), его биогеохимический цикл еще мало изучен. Кремний входит в состав кварца и силикатов и присутствует в водах в виде ненасыщенного раствора кремнезема. Живые организмы постоянно извлекают кремний из природных почв и вод, выделяя его с экскрементами и мортмассой и формируя отложения кремнезема на дне водоемов. Значительная часть кремнезема, образованного фотосинтезирующими организмами в поверхностном слое водоема, вновь переходит в раствор, и только не более 0,1% достигает дна и образует мощные осадочные кремнистые породы, надолго уводящие кремний из круговорота. Из воды он вновь потребляется диатомовыми водорослями, радиоляриями и кремнистыми губками, тем самым осуществляется массо- и энергоперенос вещества из приповерхностных слоев в более глубокие области Мирового океана.

В континентальных областях подвижность кремния зависит от условий окружающей среды. Например, при щелочных и сильнокислых значениях pH и повышении температуры резко возрастает растворимость кремнезема, а присутствие сульфатов, бикарбонатов и карбонатов магния и кальция, наоборот, вызывает его осаждение. Растения и микроорганизмы способны к образованию содержащих кремний органогенных минералов-биолитов. Кремнеземом инкрустируются клеточные оболочки растительных клеток и диатомовых водорослей. Цианобактерии могут образовывать биолиты, поглощая кремнезем, магний и марганец. В умеренном климате кремнезем накапливается в почвах, а значительная доля биолитов мигрирует в виде коллоидных и истинных растворов в грунтовых водах.

Магний распределен в биосфере неоднородно, он накапливается в океане и соленых озерах. Магний прежде всего является необходимым компонентом хлорофиллов и бактериохлорофиллов. В почвах магний активно поглощается живыми организмами, входит в состав силикатов и сорбируется глинистыми коллоидами и гумусом. В то же время значительная часть магния выщелачивается и выносится с грунтовыми и речными водами. Попадая в океан из выветривающихся горных пород, он в значительном количестве откладывается в виде доломитов и других осадочных пород.

Преобразования микроэлементов, входящих в состав ферментов микроорганизмов, связаны с воздействием микроорганизмов на некоторые природные минералы. Например, тионовые бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfolobus* sp. и металлоокисляющие морские штаммы рода *Bacillus* окисляют сульфиды и двухвалентное железо и тем самым влияют на высвобождение из минералов (борнита, халькозина, халькопирита, сфалерита, молебденита, пирролюзита, миллерита, галенита и др.) таких элементов, как Cu, Zn, Mo, Mn, Ni, Pb, образуя сильный химический окислитель $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Взаимодействуя с соединениями урана и ванадия, он изменяет степень окисления этих элементов.

Микроорганизмы способны концентрировать тяжелые металлы внутри или на поверхности клеток. Поглощение этих ионов зависит от физиологического состояния культуры и условий окружающей среды. Содержание металла внутри клеток может превышать его концентрацию в среде на несколько порядков, что в ряде случаев оказывает летальное действие. Для некоторых металлов подсчитаны соотношения концентраций в морской воде и планктоне. Для кобальта оно составляет 1 : 4600, для кадмия — 1 : 910, для меди — 1 : 7000, для свинца — 1 : 41 000, для марганца — 1 : 9400, для титана — 1 : 20 000 и для цинка — 1 : 65 000.

В состав всех живых клеток в микроколичествах входит мышьяк. В аккумуляции, миграции и превращениях этого элемента участвуют почвенные грибы и прокариоты. Так, *Pseudomonas stutzeri* var. *desulfuricans* и *Pseudomonas mendocina* var. *desulfuricans* могут использовать As^{5+} в качестве конечного акцептора при анаэробном дыхании, восстанавливая его до As^{3+} . Окисление арсенита в арсенат в энергетических целях показано для ряда представителей псевдомонад. Некоторые почвенные микроорганизмы переводят мышьяк в газообразную форму, тем самым удаляя его из почвы.

Тионовые и металлоокисляющие микроорганизмы могут опосредованно воздействовать на минералы, содержащие мышьяк (арсенопирит, энаргит, аурипигмент), а также осаждать арсенат или арсенит ионами железа. Ряд микроорганизмов может ферментативно переводить тяжелые металлы, мышьяк и сурьму в менее токсичные или недоступные для ассимиляции формы (например, осуществлять метилирование мышьяка и ртути, восстанавливать HgCl_2 до HgO и т.д.).

Микроорганизмы способны аккумулировать в клетках естественно-радиоактивные элементы, такие как уран, торий, радий и т.д.

14.3.8. Участие микроорганизмов в формировании состава атмосферы. Парниковые газы

В процессе жизнедеятельности микроорганизмы могут образовывать и поглощать различные газы. Значительные количества аммиака, сероводорода, углекислого газа, молекулярного водорода и **биогаза** (метана в смеси с CO_2) постоянно выделяются при аммонификации белков, сульфатном, серном и аэробном дыхании, брожениях и анаэробной деструкции органических веществ. Так, метан в природе образуется в значительной части анаэробных экологических ниш на Земле, в том числе в рубце жвачных, рисовниках и кишечнике термитов. Древесные термиты разлагают целлюлозу до кислот, CO_2 и водорода только в симбиозе с целлюлозолитическим сообществом микроорганизмов. Из оксида углерода и водорода симбиотические археи этого сообщества образуют метан, выделяющийся в атмосферу. Поскольку термиты населяют около 2/3 земной суши, то их вклад в образование этого парникового газа довольно велик. Подсчитано, что около 0,77% потребляемого термитами углерода превращается в их кишечнике в метан. Уничтожение тропических лесов и увеличение содержания отмершего растительного материала в почве создает идеальные условия для развития мировой популяции термитов. По подсчетам ученых, термиты ежегодно образуют до $1,5 \cdot 10^{14}$ г метана на Земле.

Метан также выделяется из разломов земной коры через так называемые сипы, а также при разработках нефтяных и угольных месторождений. Однако большая часть выделяемых газов не достигает атмосферы, являясь субстратами для микроорганизмов бактериального газового фильтра (метанотрофными, нитрифицирующими, тионовыми, водородными микроорганизмами, а также автотрофными группами). К таким «реактивным» газам относятся прежде всего аммиак, молекулярный водород, сероводород и диметилсульфид, образуемые в болотах, заболоченных почвах и в евтрофных водоемах. На содержание разных газов в атмосфере оказывают влияние многие почвенные микроорганизмы, разрушающие такие атмосферные «загрязнители», как метан, водород, CO, бензол, трихлорэтилен, формальдегид. Определенные количества молекулярного кислорода, углекислого газа, сероводорода, аммиака, метана, оксидов азота и серы все же достигают атмосферы. Эволюционно значимое накопление молекулярного кислорода, образуемого цианобактериями в процессе оксигенного фотосинтеза, когда-то превратило земную атмосферу из «восстановленной» в «окисленную» и привело к кардинальным изменениям условий жизни на Земле.

При нарушении баланса между эмиссией и потреблением относительно стабильных газов (CO_2 , NO, N_2O и метана), происходящем в основном из-за антропогенных факторов, они могут накапливаться в атмосфере. Поскольку эти газы отражают тепловые лучи, не позволяя теплу уходить от поверхности Земли, их называют парниковыми газами. Интенсивная антропогенная деятельность приводит к загрязнению естественных мест обитания и нарушению структуры микробных сообществ, что может усилить эмиссию парниковых газов. Например, при увеличении концентрации аммония из-за внесения удобрений на сельскохозяйственных угодьях снижается скорость метанотрофии в почве и воде. Активное использование

автомобилей, уничтожение лесов для целей земледелия и устройство свалок бытовых и промышленных отходов приводит к сдвигу баланса между выделением и поглощением парниковых газов в сторону первого процесса. Свалки и полигоны твердых бытовых отходов могут выделять метан в течение десятков и сотен лет. Подсчитано, что концентрация метана в атмосфере увеличивается приблизительно на 1% ежегодно в течение последних 15–20 лет.

Вторым парниковым газом, частично образуемым и потребляемым микроорганизмами, является углекислый газ. Его концентрация в атмосфере значительно выше, чем содержание метана, однако, вклад этих газов в возникновение «парникового эффекта» различается не существенно, поскольку метан почти в 25 раз эффективнее способен отражать тепловые лучи. Образовавшиеся в процессе микробной денитрификации и появившиеся из антропогенных источников оксиды азота могут выделяться в атмосферу и становиться парниковыми газами. N_2O способен также фотохимически реагировать с озоном (O_3), разрушая его слой, предохраняющий поверхность Земли от губительных ультрафиолетовых лучей.

14.3.9. Загрязнение природных экосистем и возможности самоочищения. Ксенобиотики и их детоксикация

Для непрерывного прохождения круговоротов элементов необходимо, чтобы реакции синтеза сложных органических соединений «уравновешивались» реакциями их распада до простых минеральных соединений. Антропогенный фактор оказывает значительные нарушающие воздействия на биогеохимические циклы всех элементов, поскольку для нужд человека живые организмы принудительно осуществляют сверхсинтез ряда натуральных соединений, а химическая промышленность производит широкий спектр веществ-ксенобиотиков, чуждых природе. Эти соединения специально создавались как устойчивые во внешней среде вещества. Однако из-за своей устойчивости они накапливаются в природных эконихах и распространяются по пищевым цепям. **Ксенобиотики** даже в незначительных концентрациях часто обладают высокой негативной биологической активностью: вызывают мутации, образование злокачественных опухолей, являются аллергенами. Загрязнителями могут быть и природные соединения, полученные в сверхколичествах и перемещенные в несвойственные им места (например, нефть).

В ряде случаев нарушения в природных экосистемах связаны не с токсичностью загрязняющего вещества, а с его избытком как источника питания. Чаще всего такие случаи рассматривают в отношении водных систем, когда неожиданно возникают условия повышенного содержания питательных веществ, так что начинается неконтролируемый рост водорослей и водных растений. Дефицит кислорода приводит к замору животных, особенно рыб, нуждающихся в нем. Такой процесс называют евтрофикацией озера. Евтрофикацию можно наблюдать в старых, заросших и заболачиваемых озерах, с большим количеством озерного осадка. Такие озера могут образоваться в дельтах рек, когда русло часто меняет направление. Деятельность человека может привести к ускорению процесса евтрофикации

бедных по ростовым субстратам водных акваторий. «Культурная» евтрофикация — это проблема водоемов, окруженных городскими и сельскими постройками, в которые попадают недостаточно хорошо очищенные сточные воды поселений. Питательные вещества (в основном источники азота и фосфора) обычно привносятся в водоемы поверхностные воды, если в них попали удобрения с сельхозугодий, бытовые или промышленные сбросы, попадающие в реки и озера без надлежащей очистки.

Наибольшую опасность представляет увеличивающееся присутствие в биосфере устойчивых загрязнителей (в том числе и ксенобиотиков), причем нередко в масштабах, превышающих природную самоочищающую способность. Тем самым из глобального круговорота надолго выводятся важные биогенные элементы. Поскольку человечество не может полностью отказаться от использования таких веществ, так как они применяются практически во всех областях деятельности, то первоочередной задачей становится очистка от них окружающей среды. Микроорганизмы, обладающие огромным разнообразием ферментных систем и большой лабильностью метаболизма, и являются тем звеном, которое в основном ответственно за самоочищение природных экосистем и может осуществлять биodeградацию природных и синтетических загрязнителей, тем самым возвращая основные питательные элементы в глобальный цикл.

Так, почвенные мицелиальные микроорганизмы способны разрушать широкий спектр соединений, включая лигноцеллюлозу, кератин, хитин, углеводороды и трудноразлагаемые ксенобиотики, а родококки могут использовать замещенные ароматические вещества и линейные углеводороды. Однако скорость природной микробной деструкции далеко не всегда позволяет быстро избавиться от загрязнителя, что приводит к длительному присутствию ксенобиотика или его интермедиатов в природных эконизах, распространению их в пространстве и негативному воздействию на окружающую среду. Применение живых организмов для очистки воды, почвы и воздуха от различных загрязнений основано на их способности к биodeградации (**биоразрушению**). Это широкое понятие включает три более узких процесса (рис. 14.6):

- 1) трансформацию, или незначительные изменения молекулы;
- 2) фрагментацию, или разложение сложной молекулы на более простые соединения;
- 3) полную минерализацию, или превращение сложного вещества в самые простые (H_2O , CO_2 , H_2 , NH_3 , CH_4 и т.д.).

При разрушении сложных, устойчивых веществ часто наблюдается процесс **синтрофии**, когда соединение разлагается совместно несколькими группами микроорганизмов. Если соединение не может использоваться как источник питания, то его преобразование происходит в процессе кометаболизма (в аэробных условиях — соокисления), когда проявление способности к трансформации сложной молекулы обуславливается наличием доступного источника энергии для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов.

Химическая природа ксенобиотиков чрезвычайно разнообразна: это линейные и разветвленные алканы и алкены, ароматические соединения с различными заместителями, гетероциклы, конденсированные цикли-

ческие структуры и полимеры. Деградация ксенобиотиков может происходить различными путями в зависимости от структуры разрушаемого вещества, наличия тех или иных биологических активностей, а также в зависимости от условий окружающей среды.

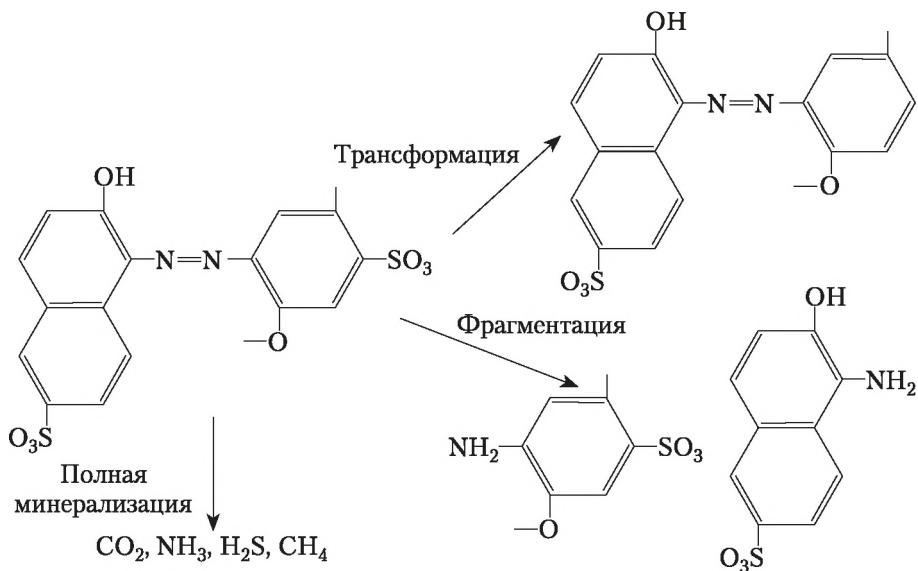


Рис. 14.6. Процессы биодеградации

Использование биологической активности для удаления загрязняющих веществ из окружающей среды называют **биоремедиацией**. Для успешного проведения таких процессов необходимо сначала найти соответствующий микроорганизм, а затем стимулировать его активность и создать оптимальные условия для ее проявления. При этом есть две возможности:

- 1) активизировать развитие нужных микроорганизмов, уже имеющих в окружающей среде;
- 2) интродуцировать в загрязненную область микроорганизмы с уже известными биодеградабельными способностями.

Такая интродукция в большинстве случаев не бывает успешной, так как для лабораторно полученных штаммов в природе не всегда можно создать оптимальные условия проявления их активности и, как правило, они менее конкурентноспособны, чем резидентная микробиота данного места. В искусственных очистных сооружениях с контролируемыми параметрами процесса значительно больше возможностей эффективно применять селективированные штаммы или сообщества, в том числе и генно-инженерные.

В настоящее время активно разрабатываются и используются аэробные технологии, однако они обладают рядом существенных недостатков. Во-первых, при обработке сточных вод, особенно концентрированных, велики энергозатраты на принудительную аэрацию. Во-вторых, серьезной проблемой становится обработка и утилизация больших количеств образующегося избыточного ила, имеющего очень низкую водоотдающую способность, поскольку использование повсеместно применяемого приема его

длительной естественной сушки на иловых площадках приводит к отчуждению значительных территорий, а также к ухудшению экологической обстановки. И наконец, аэробные методы обработки сточных вод, загрязненных некоторыми полициклическими и ароматическими соединениями, крайне неэффективны, так как некоторые из них на воздухе полимеризуются в трудноразлагаемые вещества (например, 5-аминосалициловая кислота), а продукты их аэробной деградации часто более токсичны, чем исходные загрязнители. К тому же ароматические соединения понижают поверхностное натяжение водных растворов и, следовательно, могут являться причиной неконтролируемого пенообразования в аэрируемых водоемах, а некоторые ароматические соединения летучи и токсичны и могут вызывать проблемы с загрязнением воздуха при аэробном методе очистки.

Еще 20—25 лет назад считали, что органические соединения, содержащие ароматические и конденсированные циклические структуры, в анаэробных условиях микроорганизмами не используются. Однако затем было убедительно показано, что в анаэробных условиях можно осуществлять полную минерализацию таких соединений, в том числе и искусственного происхождения. Эффективность и глубину деградации позволяет увеличить применение не индивидуальных микроорганизмов, а агрегированных микробных сообществ. В анаэробных условиях не происходит значительного накопления биомассы микроорганизмов, а конечные продукты процесса (например, биогаз) могут быть использованы в народном хозяйстве.

В современных процессах очистки, в основном, применяют естественно складывающиеся микробные сообщества. Недостаточная изученность видового состава и взаимодействия микроорганизмов в таких сообществах пока сдерживает массовое применение биоремедиации. Однако разнообразие метаболических путей в микробных сообществах позволяет надеяться, что в перспективе возможно получение ассоциаций, способных разрушать весь набор как природных, так и созданных человеком соединений, тем самым возвращая в глобальные циклы активные формы углерода, азота и других элементов.

Резюме

Изучение лабораторных чистых культур микроорганизмов показывает их потенциальные метаболические возможности, реализация которых в природе зависит от конкретных условий местообитания. Природные микробные культуры являются смешанными и представляют собой часть более крупного сообщества, включающего организмы разных уровней организации. Микроорганизмы — это существенная часть любой земной экосистемы. По трофической цепи через сообщество проходят направленные в одну сторону потоки вещества и энергии. В любой экосистеме постоянно происходит образование нового органического вещества из простых неорганических соединений и деструкция органических соединений, возвращающая в окружающую среду минеральные формы элементов. Микроорганизмы могут функционировать на всех уровнях экосистемы: фиксировать углерод как первичные продуценты, используя энергию света и химиче-

ских связей; являться главными редуцентами органического вещества; быть консументами, как некоторые простейшие, использующие бактерии и грибы в пищу. Разнообразие микробных функций в природе определяется широтой их метаболических возможностей и повсеместным распространением микроорганизмов. В конкретных условиях местообитания каждый их вид осуществляет совершенно определенную функцию. Микробные местообитания имеют сложный и постоянно меняющийся характер и зависят от плавных или скачкообразных изменений концентраций питательных и токсичных веществ и значений лимитирующих факторов. Совокупность микроорганизмов, обладающих одинаковыми способностями, называют физиологической (функциональной) группой. Для точной характеристики местообитания микроорганизма нужно учитывать его микроокружение.

При отборе проб и их хранении количество клеток не должно изменяться. Концентрированные образцы должны быть разбавлены до нужной плотности микроорганизмов с последующим высевом на питательные среды для подсчета живых клеток. Сильно разбавленные образцы должны быть перед посевом сконцентрированы путем центрифугирования или фильтрования через мембранные фильтры, задерживающие микробные клетки. Методы современной экологии позволяют оценить присутствие и функционирование микроорганизмов в природных условиях. Выделение и определение членов микробного сообщества с помощью посева на чашки эффективны при высокой концентрации микробных клеток. Для оценки микробного разнообразия применяют прямые микроскопические наблюдения и различные молекулярно-генетические методы исследования. Микроорганизмы могут быть обнаружены по наличию в природной пробе комплекса веществ, характерных для конкретной группы. Для экологических исследований важно не только определить наличие того или иного микроорганизма в природном местообитании, но и показать, что он там активно функционирует.

Потоки элементов на нашей планете осуществляются по замкнутому пути. В природе превращения отдельных элементов происходят во взаимосвязанных и взаимозависимых циклах. Микроорганизмы, обладающие широчайшими возможностями метаболизма, являются основными биогеохимическими агентами. Первичная продукция органического вещества осуществляется фото- и хемоавтотрофными организмами. Преобразование одних органических веществ в другие происходит в метаболизме всех живых существ (животных, растений, микроорганизмов). Разложение (деструкция) органического вещества до углекислого газа осуществляется различными путями. Микроорганизмы участвуют во всех взаимопереходах форм азота и серы. Фосфор как элемент не имеет значительного и однородного распространения в естественных местообитаниях. Микроорганизмы играют главную роль в растворении, связывании и переводе фосфора в минеральные формы. Микориза вносит существенный вклад в общее фосфорное питание растений. В природе осуществляется микробный замкнутый цикл железа. В реакциях соединений кальция, магния, калия, марганца, алюминия и др. значительная роль отведена процессам разрушения и генерации плохо растворимых минералов. Микроорганизмы способны

аккумулировать в клетках тяжелые металлы и естественно-радиоактивные элементы.

Микробный метаболизм может приводить к образованию и поглощению различных газов. Наиболее значимыми газообразными микробными продуктами, достигающими атмосферы, являются молекулярный кислород, углекислый газ, сероводород, аммиак, метан, оксиды азота и серы. Большая их часть не попадает в атмосферу, поскольку перехватывается группами микроорганизмов бактериального газового фильтра. Относительно стабильные газы (CO_2 , NO , N_2O и метан) могут накапливаться в атмосфере при нарушении баланса между их эмиссией и потреблением. Углекислый газ, оксиды азота и метан называют парниковыми газами, так как они отражают тепловые лучи, не позволяя теплу уходить от поверхности Земли, чем вызывают глобальное потепление.

Самоочищение природных экосистем происходит в основном за счет деятельности микроорганизмов, которые обладают разнообразными метаболическими возможностями и способны быстро подстраиваться под меняющиеся условия. Они разрушают многие сложные природные вещества и ксенобиотики и тем самым возвращают основные питательные элементы в глобальный цикл. Ксенобиотики специально создавались как устойчивые во внешней среде вещества для нужд человека. Однако из-за своей устойчивости и часто высокой негативной биологической активности они становятся серьезными антропогенными загрязнителями. Глубина биоразрушения вещества зависит от его химической структуры, наличия тех или иных биологических активностей у микроорганизмов, а также от условий окружающей среды.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Почему поток энергии в экосистеме не является замкнутым?
2. Какие группы микроорганизмов функционируют на разных уровнях любой экосистемы?
3. Как микроорганизмы делают многие соединения доступными растениям и животным?
4. В чем особенности микробных местообитаний?
5. Как можно определить наличие в пробе некультивируемых микроорганизмов?
6. В чем особенность отбора проб природных образцов?
7. Перечислите методы определения активности микроорганизмов в природных условиях.
8. Назовите возможные пути «увода» из циклов и возвращения элементов в них.
9. Какие реакции цикла азота могут осуществлять только прокариоты?
10. Назовите группы микроорганизмов, использующие сероводород в присутствии и отсутствии кислорода.
11. Почему фосфор является элементом, ограничивающим рост живых организмов в природных местообитаниях?
12. Как используется микроорганизмами железо в анаэробных и аэробных условиях?
13. Почему загрязнение ксенобиотиками приобрело характер глобальной проблемы?

Семинар 1

Микроорганизмы вокруг нас (в повседневной жизни человека)

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Семинар 2

Участие микроорганизмов в процессах очищения окружающей среды

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Биоразрушение различных веществ микроорганизмами

Цель работы: показать роль микроорганизмов в процессах разрушения органического и неорганического материалов в природе. При выполнении работы студенты имеют возможность проверить, будут ли способны разрушаться естественным путем их собственные домашние отходы, проанализировать отличия биоразрушаемых и бионеразрушаемых материалов и проследить, как элементы, содержащиеся в отходах, могут быть снова включены в круговороты.

При физическом разрушении материал просто измельчается без изменения его химической природы (например, при эрозии почвы и скал). Химическое разрушение, к которому относится и биоразрушение, приводит к изменению молекул материала в результате химических реакций. Отходы, подвергшиеся химическому разрушению, часто отличаются резким запахом, так как микроорганизмы при биоразрушении образуют газы и летучие вещества.

Когда организм погибает, его полимерные молекулы подвергаются разрушению с образованием простых веществ, которые могут быть вновь использованы другими организмами. Поэтому так важна роль микроорганизмов-деструкторов, значительная часть которых относится к гидролитикам. Если бы деструкторы не перерабатывали отмершее органическое вещество, то на планете накопилась бы мертвая масса и первичные продуценты были бы лишены неорганических веществ (прежде всего углекислого газа) для проведения фото- и хемосинтезов.

Необходимые материалы (на 1 студента): микроскоп, предметные и покровные стекла, БСА (800—1000 мл), водопроводная вода, биоразрушаемый и бионеразрушаемый материал, ножницы или нож, прозрачные сосуды на 500—800 мл — 3 шт., ватные пробки для сосудов — 3 шт., резиновые пробки для сосудов — 3 шт., прозрачные стаканчики на 200—300 мл — 3 шт., маркер, градуированный цилиндр на 10—25 мл, линейка, пипетки

на 1–2 мл — 3 шт., чашки Петри — 1–2 шт., микробиологическая петля, пинцет, газовая горелка или спиртовка.

Для выполнения работы готовят к стерилизации и стерилизуют пипетки и пустые чашки Петри, а также БСА в колбах. Затем расплавленный и остуженный до 45°С БСА разливают стерильно у пламени горелки (спиртовки) в стерильные чашки Петри по 20–25 мл. Студенты должны принести из дома биоразрушаемые и бионеразрушаемые материалы (остатки пищи, фруктов, кусочки пластика, стекла, бумаги и т.д.). Мусор делят на две части (биоразрушаемый и биоустойчивый) и заносят их компоненты в табл. 14.1.

Таблица 14.1

Состав материала, взятого для опыта

Биоразрушаемые компоненты (быстрота разрушения)	Биологически устойчивые компоненты (быстрота разрушения)

Затем каждый компонент измельчают на кусочки примерно по 1 см³ или 2 см² и формируют две кучки, смешав отдельно биоразрушаемые и биоустойчивые компоненты. Сосуды для эксперимента подписывают, обозначив № 1 биоразрушаемые материалы, № 2 — бионеразрушаемые и № 3 — их смесь. В сосуд № 1 добавляют небольшое количество биоразрушаемой смеси. Затем половинное количество того же материала вносят в сосуд № 3. Сосуды заполняют так до тех пор, пока № 1 не наполнится почти доверху, а № 3 — наполовину. Не следует утрамбовывать материалы, они должны лежать свободно. Таким же образом заполняют сосуд № 2 биоустойчивой смесью, добавляя ее половинное количество и в сосуд № 3. Все три сосуда должны быть заполнены почти доверху. Сосуды закрывают резиновыми пробками и тщательно перемешивают содержимое, энергично встряхивая его.

В сосуд № 1 добавляют воду с помощью цилиндра порциями по 10 мл, записывая число порций. После добавления каждой новой порции воды встряхивают содержимое, закрыв сосуд резиновой пробкой. Все содержимое в сосуде должно быть равномерно смочено. Воду добавляют до тех пор, пока на дне не образуется устойчивый слой в 1–1,5 см. Записывают общий объем добавленной воды. Такое же количество воды вносят в сосуды № 2 и 3 при тщательном перемешивании. Содержимое каждого сосуда описывают в табл. 14.2.

Таблица 14.2

Характеристика содержимого в опытных сосудах

Номер сосуда	Характеристики	Длительность процесса, сут.			
		0	7	14	21
1	Запах				
	Уровень воды в сосуде, см				
	Высота содержимого, см				
	Вид содержимого				

Номер сосуда	Характеристики	Длительность процесса, сут.			
		0	7	14	21
2	Запах				
	Уровень воды в сосуде, см				
	Высота содержимого, см				
	Вид содержимого				
3	Запах				
	Уровень воды в сосуде, см				
	Высота содержимого, см				
	Вид содержимого				

Сосуды закрывают ватными пробками и помещают для инкубации в термостат при 25–30°C. Ежедневно следят за изменением содержимого сосудов в течение 3 недель, заполняя табл. 14.2. В табл. 14.1 ставят в скобках цифру 1 рядом с компонентом, который будет разрушен в самое короткое время. Цифрой 2 обозначают компонент, разрушенный в последнюю очередь. Цифрой 3 помечают материал, который не разрушился за время инкубации.

Через 3 недели готовят три предметных стекла, пометив их номерами 1, 2 и 3. Пипеткой набирают жидкость со дна сосуда № 1 и наносят каплю на предметное стекло № 1. Препарат накрывают покровным стеклом. Используя новые пипетки, готовят препараты из сосудов № 2 и 3. Препараты «раздавленная капля» просматривают под микроскопом с объективом 40X, зарисовывают в каждом случае микроскопическую картину и описывают свои наблюдения в лабораторных журналах. Отмечают наличие простейших, гиф и спор грибов и бактерий разной морфологии, а также характер их подвижности. Используя пинцет, переносят материал из образовавшихся в сосуде № 1 грибных и бактериальных колоний на предметное стекло, добавляют каплю воды и накрывают покровным стеклом. Рассматривают препарат под объективами 10X и 40X, зарисовывают и описывают микроскопическую картину в лабораторном журнале. Последовательно готовят препараты из сосудов № 2 и 3, если там будут колонии, рассматривают и зарисовывают микроскопическую картину.

Дно каждой чашки Петри с БСА делят с помощью маркера на три сектора (рис. 14.7), подписывая их 1, 2 и 3. Прокаленную и остуженную микробиологическую петлю опускают в жидкость из сосуда № 1 и проводят зеркальцем по агару в секторе 1 зигзагообразным движением от края к центру чашки, стараясь не попадать за границы.

Повторяют ту же процедуру для сосудов № 2 и 3, засеяв секторы 2 и 3 в чашке. Чашки помещают на инкубацию при комнатной температуре на 48 ч. По окончании инкубации рассматривают и зарисовывают микробный рост на поверхности агара в чашке. Отмечают наличие бактерий и плесневых грибов и степень их биоразнообразия.

Делают выводы о возможных причинах различий процессов биоразрушения в разных сосудах и о биодegradабельности взятых для опыта компонентов.

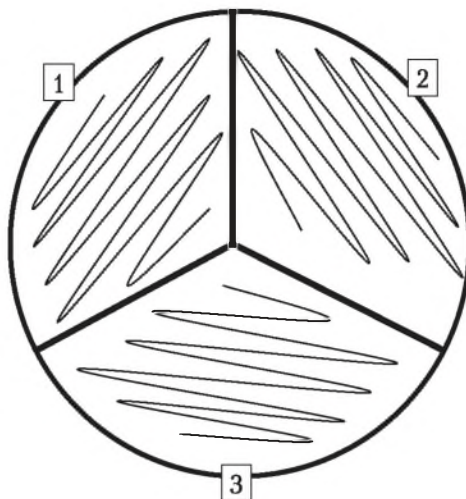


Рис. 14.7. Схема посева проб жидкости из сосудов

Лабораторная работа 2

Анаэробная биodeградация азокрасителя *Acid Orange 7* микроорганизмами активного ила

Цель работы: изучение процесса биodeградации азокрасителя сообществом активного ила в анаэробных условиях и влияния на него ряда факторов (токсичности ксенобиотика, внесения дополнительного источника углерода, ингибирования ацетокластического метаногенеза).

Сброс огромного количества бытовых и промышленных отходов создает избыточную нагрузку на природные экосистемы, в основном из-за созданных человеком соединений, которые в обычных условиях не разрушаются. Самоочищение природных экосистем связано прежде всего с огромным потенциалом микробной активности. Производственные процессы очистки и переработки отходов деятельности человека также основаны на микробной биodeградации.

Химическая и нефтехимическая промышленность является основным источником токсичных и устойчивых к биоразложению загрязнений. Одной из наиболее распространенных и широко используемых групп таких загрязнений являются красители — синтетические органические вещества, проявляющие большое разнообразие структур и используемые для различных целей в текстильной, косметической, бумажной, пищевой и фармакологической промышленности. Самую большую группу синтетических красителей составляют азокрасители. Благодаря своему химическому строению азокрасители поглощают свет в видимой области спектра. Химическая структура азокрасителей характеризуется наличием одной или более азогрупп ($-\text{N}=\text{N}-$). Азогруппа соединена с бензольным или нафталиновыми кольцами, которые могут содержать большое количество различных заместителей, таких как хлор ($-\text{Cl}$), метил ($-\text{CH}_3$), нитрогруппу ($-\text{NO}_2$), аминогруппу ($-\text{NH}_2$), гидроксил ($-\text{OH}$) и карбоксильную группу ($-\text{COOH}$). В азокрасителях в качестве заместителя часто встречается сульфогруппа ($-\text{SO}_3\text{H}$).

Азокрасители, содержащие такой заместитель, называются сульфазокрасителями. В процессе производства и использования азокрасителей примерно 10–50% попадает в окружающую среду и может накапливаться в биосфере. Даже небольшой концентрации красителя достаточно, чтобы сточные воды были сильно окрашены. Помимо негативного эстетического эффекта некоторые красители и многие продукты их неполной трансформации, особенно в аэробных условиях, оказывают сильное токсичное и (или) канцерогенное влияние на живые организмы. Дегградация красителей химическими и физико-химическими методами является дорогостоящей и имеет массу других недостатков. Аэробные микробиологические методы обработки сточных вод, загрязненных азокрасителями, крайне неэффективны.

В то же время азокрасители могут подвергаться анаэробному восстановлению с помощью неспецифических азоредуктаз различных групп микроорганизмов. Среди бактерий, проводящих такой процесс, — молочнокислые бактерии, *Proteus* sp., *Enterococcus* sp., *Aeromonas hydrophilia*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *B. pyocyaneus*, *B. cereus*, *Pseudomonas* sp., *Caprococcus catus*, *Fusobacterium* sp., *Bacteroides thetataomicron*, *Peptostreptococcus productus*, *Eubacterium biforme*, *Bifidobacterium infantis*, *Citrobacter* sp. и т.д. При расщеплении азосвязи нарушается структура хромофорной части красителя, что приводит к его обесцвечиванию и образованию соответствующих ароматических аминов (рис. 14.8), которые часто более токсичны, чем исходные соединения.

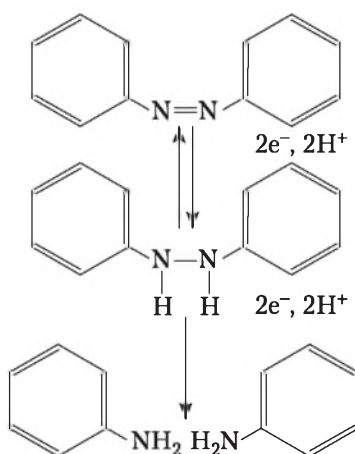


Рис. 14.8. Механизм восстановления азосвязи в анаэробных условиях

При отсутствии такого сильного окислителя, как кислород, разрушение ароматических веществ происходит более сложно, в несколько этапов. Основными этапами процесса биodeградации являются активирование бензольного кольца, его разрыв и образование C_1 - и C_2 -соединений. Существуют три различных пути конверсии ароматических соединений в анаэробных условиях, отличающиеся центральными интермедиатами. Этими интермедиатами являются бензоат, резорцин и флороглюцин.

В настоящее время наиболее распространенным среди микроорганизмов считается бензоил-КоА-путь биodeградации ароматических веществ (через образование КоА-тиоэфира бензоата). Микроорганизмы способны использовать широкий набор ароматических субстратов в нитрат-, сульфат-, железо- и карбонат-восстанавливающих условиях. На сегодняшний день из микроорганизмов, способных к биodeструкции ароматических соединений, в виде чистых культур выделены *Pseudomonas* sp., *Thauera aromatica*, *T. chlorobenzoica*, *Desulfobacterium anilini*, *Azoarcus evansii*, *Magnetospirillum* sp., *Delftia acidovorans*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Syntrophus gentianae* и *S. buswellii*. Значительно более успешно биodeградацию таких соединений осуществляют анаэробные микробные сообщества. Использование в качестве акцептора электронов H^+ требует присутствия в системе синтрофных партнеров, потребляющих молекулярный водород (метаногенов, сульфидогенов или гомоацетогенов). В метаногенных условиях конечные стадии биodeструкции представлены археями родов *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta* и *Methanobacterium*.

Конверсия любого сложного органического вещества с получением метана требует наличия, как минимум, бактерий, расщепляющих исходное соединение с образованием сбраживаемых веществ, микроорганизмов, осуществляющих брожение с образованием в конечном счете ацетата, углекислоты и водорода, и метаногенов.

При деградации трудноразлагаемых соединений возрастает значение кометаболизма. Как правило, этот процесс характеризуется тем, что культура, трансформирующая чужеродное соединение, при этом не размножается и скорость процесса остается постоянно низкой, а продукты трансформации могут накапливаться в окружающей среде. Применительно к микробному сообществу именно такая стадия может быть лимитирующей для общего процесса полной минерализации ксенобиотика, и тогда внесение дополнительного источника углерода и энергии может существенно повлиять на скорость биodeградации и время формирования стабильной высокоактивной ассоциации микроорганизмов.

Метаногенное сообщество активного ила способно минерализовать очень устойчивые вещества, содержащие в молекуле ароматические кольца. Используемый в работе азокроаситель *Acid Orange 7* производится в мире в промышленном масштабе, широко применяется в различных отраслях и поэтому попадает в окружающую среду в значительных количествах. Предлагаемая работа состоит из четырех опытов, каждый из которых может быть выполнен как самостоятельное исследование. В качестве разрушаемого вещества может быть использован практически любой ксенобиотик, однако следует учитывать, что в этом случае период адаптации микроорганизмов активного ила к данному веществу может быть очень длительным (до нескольких лет).

Необходимые материалы и методы.

1. Материалы, оборудование, посуда (в расчете на 1 студента). Спектрофотометр *Shimadzu UV-1202* (Япония) или аналогичный, кювета кварцевая с $l = 0,5$ см и кювета стеклянная с $l = 1,0$ см; газовый хроматограф ЛХМ 8 МД (модель 3, СССР) с катарометром или аналогичный; газовый хро-

матограф *Chrom-5* (ЧССР) или аналогичный с пламенно-ионизационным детектором; хроматограф ВЭЖХ *Du Pont* (США) или аналогичный; световой микроскоп с масляным иммерсионным объективом 90X; баллон с аргонem (азотом); щипцы для зажимания алюминиевых колпачков; центрифуга с гнездами для пробирок Эппендорф; манометр с иглой. Флаконы на 120 мл с герметичными резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками — 26 шт., пробирки химические мерные с притертыми пробками на 5—10 мл — 90 (45) шт., пластиковые пробирки Эппендорф на 2 мл с крышечками или аналогичные — 300 (150) шт., пипетки на 1—2 мл — 540 (270) шт., на 0,1 мл — 25 (13) шт., шприцы на 1—2 мл (лучше одноразовые) — 300 (150) шт., газовый шприц на 0,5—1,0 мл — 1 шт., предметные стекла для микроскопии — 50 (25) шт. Минеральная среда — 1100 мл, концентрированные растворы: азокрасителя — 50 мл, пирувата натрия — 10 мл, ацетата натрия — 20 мл, бромэтансульфоновой кислоты (БЭСК) — 10 мл; 50 мМ К-фосфатный буфер (pH = 7,0) — 100 мл, растворы А и Б для определения аммония — по 30 мл, растворы А, В, С для определения сульфида — 30, 30 и 1,5 мл соответственно, 3N NaOH — 10 мл, реактив Бредфорда — 100 мл, краситель метиленовый синий для окрашивания микроскопических препаратов $\approx$ 30 мл, иммерсионное масло кедровое $\approx$ 5 мл.

2. Микробные ассоциации. В работе используют активный ил очистных сооружений, обрабатывающих бытовые и промышленные стоки.

3. Среда и растворы. Для всех опытов применяют минеральную среду следующего состава (мг/л): NH_4Cl — 280, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 10, K_2HPO_4 — 250, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 100, ЭДТА — 1, NaHCO_3 — 5000, дрожжевой экстракт — 100, концентрированный раствор микроэлементов — 1 мл. Такой раствор содержит (мг/мл): H_3BO_3 — 0,05, $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 2, ZnCl_2 — 0,05, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,05, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,03, $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,05, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 2, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,05, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,1. Минеральную среду кипятят для избавления от кислорода, затем охлаждают до комнатной температуры и разливают под током азота для предотвращения диффузии кислорода в среду. Среду разливают по 40—50 мл во флаконы объемом 120 мл, закрывают резиновыми пробками и зажимают алюминиевыми колпачками. Пузырьки со средой продувают азотом. Конечное давление во флаконах должно составить $\approx$ 1,6 атм. Пузырьки автоклавируют при 0,5 ати, pH среды после стерилизации равен 7,0. Все субстраты и добавки готовят в виде стерильных анаэробных концентрированных растворов и вносят по мере необходимости с помощью стерильных шприцев с соблюдением условий анаэробноза.

Для приготовления концентрированного раствора азокрасителя его взвешивают в асептических условиях в рассчитанном количестве, переносят в стерильный пузырек, закрывают стерильной резиновой пробкой и зажимают алюминиевым колпачком. Затем во флакон добавляют стерильную дистиллированную воду до достижения нужной концентрации, продувают азотом и оставляют на 1—2 дня при комнатной температуре. Концентрированные растворы красителей могут образовывать осадок. Перед использованием такие растворы нагревают на водяной бане до полного растворения осадка, на что требуется от 2 до 10 мин. Концентрирован-

ные растворы ацетата, пирувата и бромэтансульфоновой кислоты готовят на дистиллированной воде, продувают азотом и стерилизуют при 0,5 ати.

Для разведения культуральной жидкости перед спектрофотометрическими измерениями используют нестерильный 50 мМ К-фосфатный буфер (рН = 7,0), приготовленный стандартным способом. Перед всеми измерениями культуральную жидкость освобождают от клеток центрифугированием при 15 тыс. g в течение 10 мин.

4. Определение концентраций азокрасителя и наличия его ароматических производных. Оптимум поглощения красителя *Acid Orange 7* — 490 нм. Резкое снижение высоты основного пика в сочетании с появлением и увеличением высот пиков, соответствующих ароматическим составляющим красителя, свидетельствует о разрыве азосвязи в молекуле красителя и появлении в среде более простых ароматических соединений, которые в свою очередь также могут быть подвержены дальнейшему расщеплению микроорганизмами активного ила. Фрагментация азокрасителя визуальнo выражается в постепенном обесцвечивании культуральной жидкости. Спектрофотометрическое сканирование проводят в диапазоне длин волн 200—600 нм. Для анализа берут 100 мкл пробы жидкой фазы и доводят объем до 2 мл 50 мМ К-фосфатным буфером (рН = 7,0). Измерения осуществляют на спектрофотометре *Shimadzu UV-1202* или аналогичном, в кварцевой кювете с $l = 0,5$ см. Расчеты истинной концентрации азокрасителя проводят в соответствии с уравнением, полученным путем построения калибровочной кривой при содержании вещества от 10 до 500 мг/л:

$$C \text{ (мМ)} = D \cdot N / (X \cdot M)$$

где D — оптическая плотность данной пробы при 490 нм; N — разведение; X — тангенс угла наклона калибровочной кривой; M — молекулярная масса азокрасителя (350,32).

5. Определение количества метана, углекислоты и молекулярного водорода. Метан и углекислота являются конечными продуктами биодegradации азокрасителя, а молекулярный водород — промежуточный продукт, регистрирующийся только на начальных стадиях деструкции ксенобиотика, пока в микробном сообществе не сбалансирован обмен веществ. Концентрации газов определяют на газовом хроматографе ЛХМ 8 МД (модель 3) с катарометром или аналогичном, газ-носитель — аргон, скорость которого 20 мл/мин. Колонки длиной 2 м заполнены порапаком *QS*. Предварительно измеряют давление (в атм) во флаконах с помощью манометра, на входное отверстие которого укреплена игла от шприца. Для каждого анализа с помощью газового шприца на 0,5—1,0 мл берут пробу газа 0,2 мл. При температуре термостата колонок 50°C пик водорода регистрируется через 65 с, метана — через 112 с, CO_2 — через 185 с. Количество газов рассчитывают следующим образом:

$$C \text{ (моль/л)} = D / V_M \cdot P / P_0 \cdot T_0 / T \cdot V_{\text{гф}} / V_{\text{жф}}$$

где D — содержание данного газа в газовой фазе в объемных процентах; V_M — объем 1 моля газа; P — давление в сосуде, атм; P_0 — давление при нормальных условиях (1 атм); T_0 — температура при нормальных условиях

(273 K); T — температура культивирования, K; $V_{\text{гф}}$ — объем газовой фазы в сосуде; $V_{\text{жф}}$ — объем жидкой фазы в сосуде.

Величину D рассчитывают по высотам хроматографических пиков, так как они довольно узки (обычно расчеты делают по площадям поверхности под пиком): высоту пика для данного газа в мм делят на 100 и на тангенс угла наклона калибровочной кривой. При проведении расчетов следует учитывать чувствительность прибора при измерении данной пробы.

Калибровочные кривые получают следующим образом: флаконы емкостью 10 мл заполняют аргоном и закрывают их герметично резиновыми пробками, предусматривающими отбор проб газа. В эти флаконы газовым шприцем добавляют нужный объем анализируемого газа, чтобы его содержание составляло: 0,5—96% для метана, 0,5—100% для водорода и 1—100% для углекислого газа. Из каждого флакона отбирают три пробы по 0,2 мл и фиксируют высоту хроматографического пика для анализируемого газа. Полученные данные усредняют и осуществляют построение калибровочной кривой в координатах: содержание газа (% по объему) — высота пика (мм).

6. Определение ацетата и других летучих жирных кислот (ЛЖК) и спиртов. Интермедиатами анаэробного распада азокрасителей и ароматических аминов являются ЛЖК и спирты с длиной углеводородного скелета не более 6 атомов, концентрацию которых определяют на газовом хроматографе *Chrom-5* с пламенно-ионизационным детектором или аналогичном, на колонке 1 м, заполненной хромосорбом 101. Скорость газоносителя (аргона) — 30 мл/мин. Для каждого анализа берут пробу жидкой фазы 1 мкл, подкисленную соляной кислотой. При температуре термостата колонок 200°C происходит четкое разделение продуктов, идентифицируемых по временам удержания соответствующих соединений в стандартных растворах. Расчет концентрации каждого вещества в мМ проводят по высоте пика, отнесенной к высоте пика этого вещества в стандартном растворе:

$$C = h_{\text{пробы}} \cdot N_{\text{пробы}} \cdot C_{\text{станд}} (\text{мМ}) / (h_{\text{станд}} \cdot N_{\text{станд}}),$$

где h — высота пика в пробе или стандартном растворе; N — чувствительность прибора при соответствующем измерении; C — концентрация вещества в соответствующем растворе.

7. Определение концентрации ароматических интермедиатов и продуктов их дальнейшего преобразования. Исходя из химической формулы азокрасителя, возможного пути его фрагментации и максимумов поглощения пиков продуктов при спектрофотометрическом сканировании подбирают в качестве стандартов соответствующие амины и другие ароматические соединения. Идентификацию веществ и определение их концентрации проводят при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе *Du Pont* или аналогичном, используя колонку с обращенной фазой Диасорб 130-С₁₆Т, 6μ в системе уксусная кислота (1%) — метанол (в соотношении 85 : 15 по объему). В качестве детектора используют спектрофотометр, настроенный на длину волны

225 нм (средняя длина волны поглощения ароматических соединений). Скорость подачи элюента — 1 мл/мин, давление — 148 атм. Объем вводимой пробы — 20 мкл. До проведения анализа отобранные пробы могут храниться при -20°C в течение 30 сут. в закрытых пластиковых пробирках Эппендорф. Ароматические вещества определяют по соответствию их времен удержания временам удержания стандартных растворов, а расчет концентрации компонентов смеси ведут по площадям пиков, отнесенным к площадям пиков веществ в стандартных растворах.

8. Определение концентрации иона аммония. Концентрацию ионов аммония определяют по методу Фоссета и Скотта. Для этого готовят реактив Фоссета, состоящий из двух растворов. Раствор А (г/л): фенол — 10, нитропруссид натрия — 0,05. Раствор Б (г/л): Na_2HPO_4 — 37, NaOH — 10, 1% раствор гипохлорита натрия (NaOCl) — 10 мл. Для определения концентрации аммония в жидкой фазе 200 мкл исследуемого раствора помещают в мерную пробирку, разбавляют водой до 400 мкл, затем добавляют 0,8 мл раствора А и 0,8 мл раствора Б и интенсивно перемешивают. Растворы инкубируют 30 мин при 37°C , а затем сразу измеряют оптическую плотность при 578 нм и $l = 1$ см. В качестве контроля используют раствор, не содержащий аммония. По калибровочной кривой (от 1 до 15 мг/л NH_4^+) определяют содержание аммония в исследуемом растворе. При необходимости растворы А и Б можно хранить в сосудах из темного стекла не более 2 мес.

9. Определение концентрации сульфида. Исходный азокраситель содержит в своем составе сульфогруппу, поэтому можно ожидать появления иона сульфида в процессе анаэробной биодеструкции. Концентрацию сульфид-иона определяют по методу Трюпера и Шлегеля с использованием трех растворов, содержащих в 100 мл каждого раствора. Раствор А: ацетат цинка — 4 г, ледяная уксусная кислота — 0,05 мл. Раствор В: 2-диметил-*n*-фенилендиамин сульфат — 0,2 г, H_2SO_4 (конц.) — 20 г. Раствор С: $\text{Fe}(\text{NHSO}_4)_2$ — 10 г, H_2SO_4 (конц.) — 2 г. К 100 мкл раствора А в пластиковой пробирке Эппендорф быстро добавляют 10 мкл пробы и 785 мкл дистиллированной воды. Затем в смесь вносят 100 мкл раствора В и 5 мкл раствора С. Через 10 мин измеряют поглощение образовавшегося хромогенного комплекса при 660 нм и $l = 1$ см. По калибровочной кривой (от 100 до 500 мкг/мл S^{2-}) определяют содержание сульфида в исследуемом растворе. В качестве контроля используют воду.

10. Определение белка. Прирост биомассы микроорганизмов оценивают по общему содержанию белка в среде, которое определяют методом Бредфорд. Для анализа отбирают пробу жидкой фазы объемом 0,3 мл, центрифугируют в течение 15 мин при 12 тыс. g, удаляют надосадочную жидкость. К осадку добавляют 0,3 мл щелочи (3N NaOH) и выдерживают при 30°C в течение 12 ч. При определении содержания белка в пробирки вносят по 200 мкл пробы, добавляют по 2 мл реактива Бредфорд, перемешивают и через 20 мин измеряют оптическую плотность при 595 нм. Пользуясь калибровочной кривой, определяют концентрацию белка в исследуемых растворах. Калибровочную кривую строят, используя бычий сывороточный альбумин, высушенный в эксикаторе до постоянного веса, из которого

готовят растворы с концентрацией белка от 10 до 100 мкг/мл. Растворы затем обрабатывают, как было описано выше, и строят зависимость оптической плотности от концентрации белка.

11. Микроскопия. Для анализа изменений микроскопической картины микробного сообщества готовят фиксированные окрашенные препараты и просматривают их с иммерсионной системой в световом микроскопе.

Условия проведения экспериментов.

На предварительном этапе работы рассчитывают необходимые количества реактивов для приготовления концентрированных растворов. При этом следует учитывать, что итоговая концентрация субстратов и добавок в среде должна составить: пирувата натрия — 3 мМ, ацетата натрия — 6 мМ, бромэтансульфоновой кислоты — 45 мМ и азокрасителя в разных вариантах опыта — 0,7; 1,4; 2,1; 2,8 и 3,5 мМ. Каждая добавка должна быть внесена в объеме, не превышающем 1 мл. Снимают полный спектр раствора азокрасителя (концентрация 300 мг/л) в диапазоне длин волн 200–600 нм (рис. 14.9).

Acid Orange 7, C. I. 15510
(*Orange II*,
Tropaeolin ООО Nr. 2,
Кислотный оранжевый)
Молекулярная масса 350,32
Максимум поглощения — при 490 нм

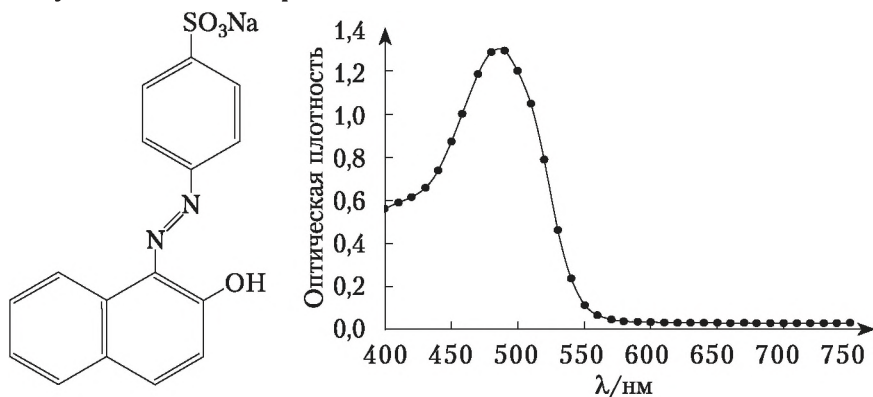


Рис. 14.9. Характеристики азокрасителя Acid Orange 7

Затем осуществляют построение калибровочных кривых для всех измеряемых соединений.

В пузырьки со средой стерильно вносят активный ил из расчета 10% по объему и необходимые добавки. В качестве контрольных используют следующие варианты:

- 1) пузырьки без активного ила с добавлением азокрасителя в концентрации 0,7 мМ для регистрации возможных физико-химических преобразований субстрата в минеральной среде (без участия биологической активности);
- 2) пузырьки без красителя, но с активным илом для учета выделения метана за счет лизиса инокулята;

3) флаконы, содержащие ил, предварительно инактивированный автоклавированием при 0,5 ати («убитый ил»), для выявления роли адсорбции азокрасителя на матрикс ила. Полный набор вариантов опыта представлен на рис. 14.10. Каждый вариант ставят в двух повторностях.

1. Эксперимент по биоразлагаемости

2. Эксперимент по влиянию дополнительного источника углерода

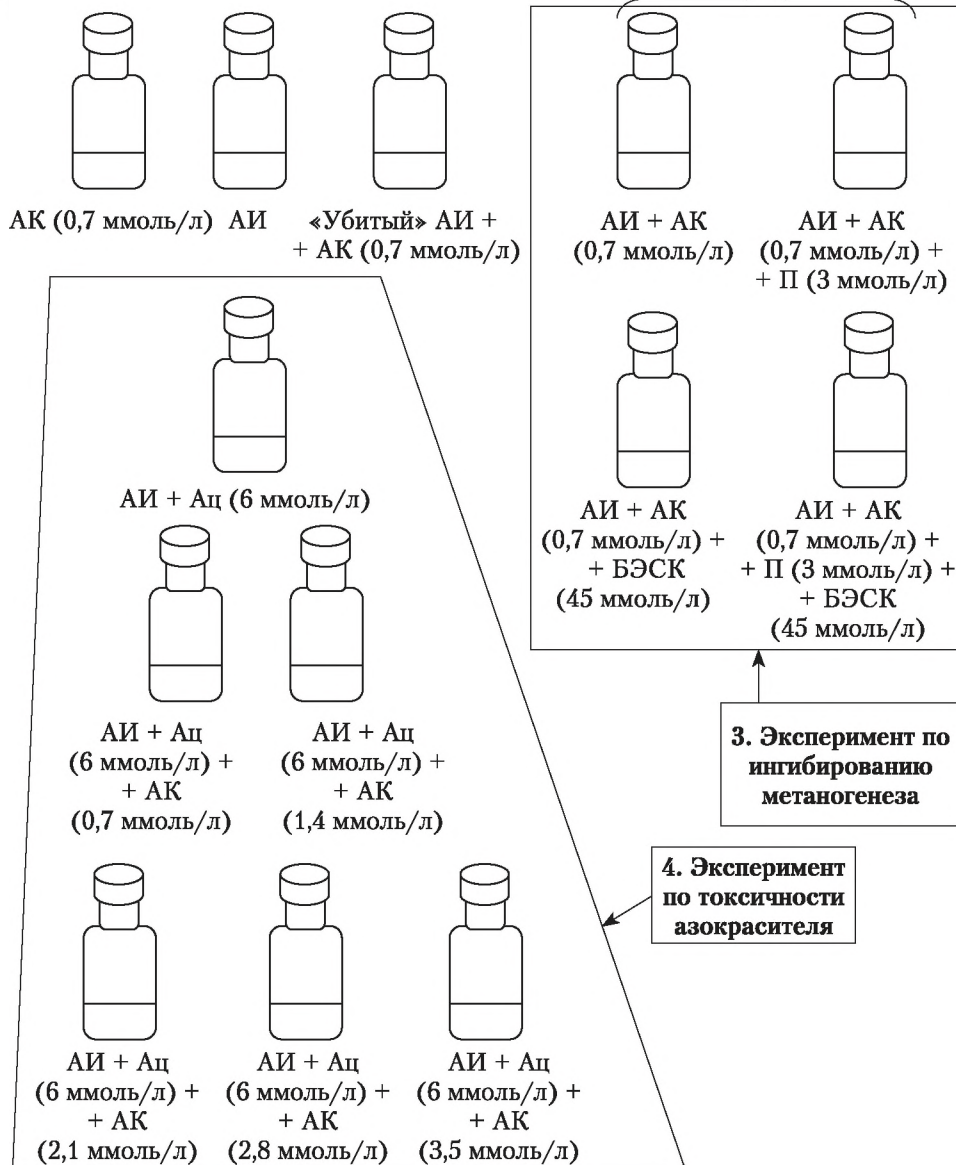


Рис. 14.10. Варианты опыта:

АИ — активный ил; АК — азокраситель; Ац — ацетат; П — пируват; БЭСК — бромэтансульфоновая кислота; скобки и рамки объединяют варианты, учитываемые в различных экспериментах

Культивирование всех вариантов проводят в статических условиях (без перемешивания) в темноте при 30°C. Отбор проб жидкой (0,8 мл) и газовой (0,2 мл) фазы осуществляют в нулевой точке и каждые 24 ч (48 ч) стерильными шприцами, без нарушения анаэробноа.

В эксперименте по биоразлагаемости (1 на рис. 14.10) сравнивают изменение концентраций азокрасителя, промежуточных (H_2 , ароматических аминов, ацетата и др. ЛЖК и спиртов) и конечных (метана, углекислоты, аммония и сульфида) продуктов, а также прирост биомассы в опытном и трех контрольных вариантах. Выявленные ароматические интермедиаты определяют с помощью ВЭЖХ и по максимумам поглощения при спектрофотометрии. Описывают характерные культуральные свойства и микроскопическую картину сообществ из разных вариантов. Полученные данные представляют в виде таблиц, спектров азокрасителя и ароматических производных, а также графиков зависимости содержания всех вышеперечисленных веществ (в мМ) и биомассы (в мг/л) от времени (в сут.). Делают выводы о биологической природе процесса, роли адсорбции, последовательности появления и химической структуре ароматических интермедиатов, а также о возможных механизмах конверсии азокрасителя. Анализируют соответствие различных фаз процесса биодеструкции азокрасителя изменениям в микробном составе анаэробной ассоциации.

В эксперименте по изучению влияния дополнительного источника углерода — пирувата (2 на рис. 14.10) сравнивают те же параметры, что и в предыдущем эксперименте, но во флаконах с активным илом и азокрасителем с или без пирувата. Данные представляют в виде таблиц и графиков, делают выводы об изменении хода процесса биодеструкции красителя в присутствии легкодоступного субстрата (увеличении скорости, изменении состава и соотношения продуктов, приросте биомассы, изменении микроскопической картины активного ила).

Для накопления и определения интермедиатов распада азокрасителя проводят эксперимент по элиминированию последней стадии биодеградации в анаэробных условиях — метанообразования (3 на рис. 14.10). Во флаконы с активным илом и азокрасителем, содержащие и не содержащие дополнительный источник углерода пируват, вносят ингибитор метанообразования — бромэтансульфоновую кислоту (БЭСК) в концентрации 45 мМ. За процессом следят по виду спектра культуральной жидкости, хроматограммы ВЭЖХ, накоплению интермедиатов в жидкой фазе. Определяют морфологические и культуральные изменения в разных вариантах. Результаты представляют в виде таблиц и графиков. Уточняют данные о химической структуре кольцевых и линейных интермедиатов. Делают выводы о влиянии метаногенной стадии на скорость процесса биодеградации азокрасителя в условиях, когда он является единственным источником углерода и энергии или имеется также другой легкодоступный субстрат.

Исследование токсичности азокрасителя (4 на рис. 14.10) проводят на фоне стандартного метода определения ацетокластической метаногенной активности анаэробной биомассы. Во все пузырьки вносят раствор ацетата натрия до конечной концентрации 6 мМ в качестве основного суб-

страта и азокраситель, конечная концентрация которого должна составить 0,7; 1,4; 2,1; 2,8 и 3,5 мМ. В качестве контрольных используют пузырьки без добавления азокрасителя. Через каждые 24 ч (48 ч) измеряют концентрацию метана в газовой фазе, а полученные результаты представляют в виде графика зависимости количества метана от времени. Измерения сопровождаются приготовлением фиксированных окрашенных препаратов культуральной жидкости. Значение ацетокластической активности анаэробного ила рассчитывают по тангенсу угла наклона линейного участка этой кривой. За 100% активности принимают тангенс угла наклона линейного участка кривой зависимости концентрации метана от времени в эксперименте без добавления азокрасителя. Поскольку скорость разложения самого азокрасителя в этих условиях существенно ниже скорости ацетокластической реакции, его вкладом в образование метана можно пренебречь. Результаты представляют в виде графиков зависимости ацетокластического метаногенеза от времени для разных концентраций красителя, а также кривой зависимости образования метана (в %) от концентрации азокрасителя (в мМ). Определяют LD_{50} для данного азокрасителя и делают вывод о его токсичности по отношению к метаногенной активности анаэробного ила. Анализируют изменение микроскопической картины в зависимости от концентрации красителя и делают вывод об изменении микробного состава активного ила при увеличении «давления» ксенобиотика.

Рекомендуемый план проведения работы и приблизительная длительность операций

Занятие 1

Подготовка и стерилизация минеральной среды. Расчет необходимых количеств веществ для приготовления концентрированных растворов азокрасителя и добавок. Приготовление и стерилизация растворов добавок и инструментов (4 ч). Приготовление концентрированного раствора азокрасителя (48 ч).

Занятие 2

Приготовление реактивов, растворов и стандартов для определения необходимых веществ. Построение калибровочных кривых и снятие спектра раствора азокрасителя (4 ч).

Занятие 3

Засев флаконов активным илом, внесение субстрата и необходимых добавок. Отбор проб в нулевой точке и проведение всех необходимых определений. Описание культуральных признаков и приготовление фиксированных окрашенных препаратов (4 ч). Инкубация посевов (20 сут.).

Занятия 4–13

Отбор проб каждые 24 ч (48 ч). Описание культуральных признаков и приготовление фиксированных окрашенных препаратов. Проведение необходимых определений. Занесение результатов в таблицы. Закладка на хранение проб для ВЭЖХ (4 ч).

Занятие 14

Отбор и приготовление стандартов для ВЭЖХ. Проведение ВЭЖХ для всех хранящихся проб (8 ч).

Занятие 15

Оформление результатов (4 ч).

Глава 15

РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭВОЛЮЦИИ БИОСФЕРЫ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- эволюцию биосферы и роль микроорганизмов в ее становлении;

уметь

- объяснить теорию симбиогенеза;

владеть

- приемами представления различных теорий зарождения жизни на Земле.
-

15.1. Современные представления об эволюции биосферы и роли микроорганизмов в этом процессе

15.1.1. Гипотезы возникновения и развития жизни на Земле

Ученые определяют время зарождения Земли и протекание на ней различных процессов с помощью радиоактивных изотопов, чей распад не зависит от температуры и давления и пропорционален времени. Наиболее точно можно определять геологические времена с помощью ^{40}K , который превращается в ^{40}Ar с периодом полураспада, равным 1,26 млрд лет. Изотопный метод применяют и для установления времени формирования различных слоев в осадочных породах, что позволяет датировать протекание тех или иных процессов на Земле. По современным представлениям наша Солнечная система возникла около 4,5 млрд лет назад в результате конденсации космической пыли из облаков и затем под действием сил притяжения сформировалась как система планет с Солнцем в центре. В течение следующих за формированием Земли 600 млн лет происходила «тяжелая бомбардировка» поверхности Земли большими астероидами и кометами. Некоторые из таких столкновений были столь мощные, что привели к формированию Луны, другие могли разогревать поверхность Земли до стерилизующих температур. Такие удары и нагрев удаляли с поверхности легкокипящие вещества, например воду. Поэтому в этот период Земля была непригодна для жизни, поскольку на ней практически не было воды. Позднее вода была принесена малыми кометами и астероидами, и с окончанием «тяжелых бомбардировок» на Земле стали формироваться условия для жизни.

Частичной реконструкции поддаются физико-химические условия на ранних этапах истории нашей планеты. Поскольку жизнь невозможна без жидкой воды, то температура Земли к моменту возникновения жизни

должна была находиться в пределах 0—100°C (при нормальном давлении). Известно также, что ранняя атмосфера была бескислородной. Другим условием возникновения жизни является наличие органических веществ, образованных абиогенно. Проведенные С. Миллером в 1953 г. эксперименты по имитации пребиотических условий на Земле показали, что простые органические вещества (аланин, глицин, лактат, гликолат, ацетат, формиат и др.) могли синтезироваться из смеси газов (CH_4 , NH_3 , H_2) и водяного пара под действием «молний» зарядом 60 000 вольт после нескольких суток работы установки. Другие экспериментаторы повторяли и усложняли опыты Миллера, вводя в состав действующих газов CO_2 , N_2 , SO_2 , H_2S . Эти газы могли выделяться на ранних этапах развития Земли из мантии в результате извержений вулканов. Не исключено, что органическое вещество могло быть перенесено на Землю и из межгалактического пространства кометами и астероидами, в составе которых обнаруживают как простые соединения типа аминокислот, так и более сложные, подобные полициклическим ароматическим углеводородам.

Итак, первичная «восстановленная» атмосфера Земли формировалась в основном за счет вулканической активности и состояла из водяных паров, водорода, метана, аммиака, угарного газа и сероводорода. Анаэробные условия сопровождались отсутствием света, поскольку бурная вулканическая деятельность способствовала образованию пепла, не пропускавшего солнечный свет к поверхности планеты. Из извергающихся вулканических газов и паров воды под действием разрядов атмосферного электричества могли быть сформированы первые простые органические вещества, которые затем были дополнены привнесенными из межгалактического пространства с кометами и астероидами более сложными органическими соединениями. По прошествии 1 млрд лет, приблизительно, со времени образования планеты на ней появились первые микроорганизмы.

В 50-х гг. XX столетия американские ученые С. Тайлер и Э. Баргхурн заявили об открытии окаменевших микроорганизмов в осадках, датированных Прекембрийской эрой. Это было убедительным доказательством того, что первичными живыми существами на Земле являлись микроорганизмы. Позднее было показано, что окаменевшие остатки микроорганизмов (**микрофоссилии**) присутствуют в особых слоистых осадочных породах (**строматолитах**) возраста 3,5 млрд лет. Это подтверждает гипотезу о возникновении жизни на Земле приблизительно через 1 млрд лет после образования самой планеты (около 3,6 млрд лет назад). Первыми обитателями Земли были микроорганизмы-прокариоты, и почти 2,0 млрд лет биосфера развивалась как прокариотическая. Эукариоты появились значительно позже как надстройка, зависящая от прокариот, жизнедеятельность которых и привела к формированию физико-химических условий, пригодных для существования более высокоорганизованных существ. Общая гипотетическая схема, отражающая глобальные события в развитии жизни на Земле, представлена на рис. 15.1.

Древними свидетельствами развития микробной жизни являются микрофоссилии (ископаемые остатки микроорганизмов), датированные 1,7—3,2 млрд лет. Это окаменевшие оболочки, чехлы, цисты и иногда отдель-

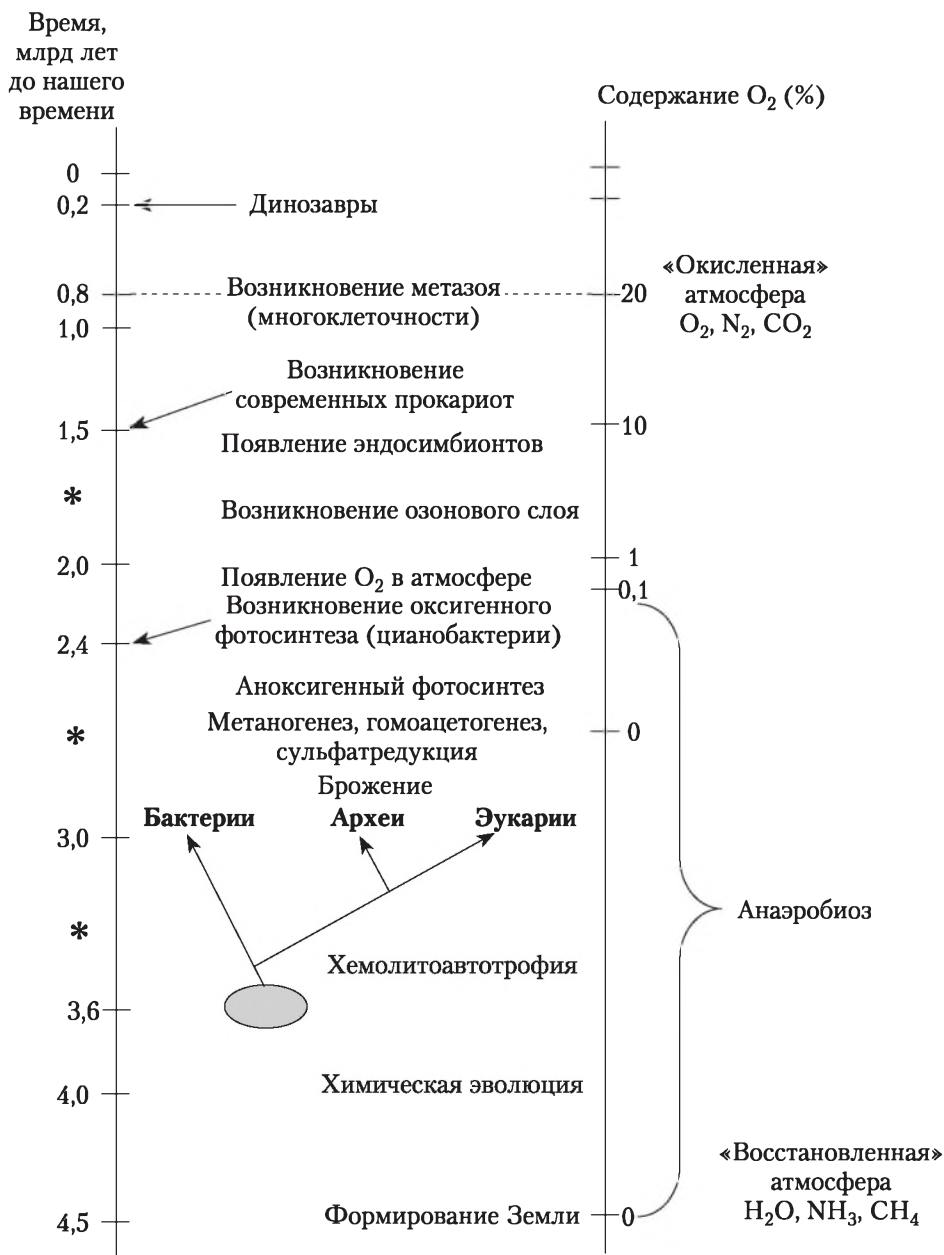


Рис. 15.1. Основные события в эволюции Земли и участие в них микроорганизмов:

* — времена, которыми датируются самые древние три образца ископаемых остатков прокариот

ные структуры нитчатых микроорганизмов, в частности, цианобактерий. Сохранение ископаемых остатков этих микроорганизмов в течение столь длительного исторического времени объясняется уникальными свойствами их чехлов подвергаться мумификации, литификации и инкрустации соеди-

нениями кремния, кальция, железа и т.д. Под действием древних микробных сообществ путем осаждения нерастворимых минеральных веществ, в основном, бикарбонатов в процессе жизнедеятельности микроорганизмов формировались также строматолиты. Образование строматолитов в настоящее время удастся смоделировать в лабораторных условиях, что еще раз доказывает их микробное происхождение в процессе эволюции. Другими древними микробными продуктами являются **хемофоссилии** — особые органические соединения, обнаруживаемые в горных породах и залежах полезных ископаемых.

Многие ученые полагают, что жизнь на Земле зародилась в глубинах океана, а не на мелководье, поскольку в этом случае последствия «тяжелых метеоритных бомбардировок» были более выражены. Такие глубоководные местообитания, как «черные курильщики» или ареалы вокруг придонных газовых сипов, вполне могут быть первичными местами зарождения жизни на Земле, так как они не подвергались действию метеоритных дождей.

Исследователи полагают, что первыми живыми организмами могли быть анаэробные термофилы, обитавшие в гидротермальных системах или внутри мантии, где отсутствовал молекулярный кислород, а температура была довольно высокой. Доказательством этой гипотезы является то, что на универсальном древе живых организмов, построенном на основании сиквенса 16S рРНК (ДНК), самые глубокие филогенетические ветви занимают микроорганизмы-термофилы. Профессор К. Вез, разработавший концепцию универсального филогенетического древа живых организмов, считает, что древний предшественник архей, бактерий и эукарий (прогенот) обладал цитоплазматической мембраной без клеточной стенки, т.е. напоминал современных риккетсий. ЦПМ, по мнению Веза, уже тогда была способна концентрировать некоторые питательные вещества и проводить простые биохимические реакции. По предположению немецкого биохимика В. Циллига, возникновению доменов *Bacteria* и *Archaea* могло способствовать физическое (географическое) разделение популяции прогенот на два кластера еще на стадии ранней Земли.

В соответствии с гипотезой советского биохимика и эволюциониста академика А. И. Опарина первичный организм мог быть гетеротрофом. Ученый отмечал, что хотя автотрофы способны расти за счет простых неорганических субстратов, они устроены гораздо более сложно, поскольку должны содержать не только систему получения энергии, но также обеспечивать сложные пути фиксации углекислоты для превращения ее в органический материал. Напротив, гетеротрофы-бродильщики нуждаются лишь в нескольких ферментах для запасаания энергии, и они могут жить за счет органических субстратов, образованных на Земле абиотически.

По современным представлениям первые живые организмы, скорее всего, существовали хемолитотрофно, строя вещества клетки из неорганических соединений, которые обильно поступали из земных недр, например, это могли быть бактерии и археи, окисляющие молекулярный водород для получения энергии. Они имели простые ростовые потребности и развивались в анаэробных условиях ранней Земли автотрофно, фиксируя CO_2 . Активность автотрофных микроорганизмов на ранней Земле подтвержда-

ется исследованием изотопного состава углерода в окаменевшем органическом веществе той эпохи. Оказалось, что оно обогащено легким изотопом углерода (^{12}C) по сравнению с минеральными соединениями углерода (мела) того же возраста. Это свидетельствует о его образовании путем биологических реакций, в которых предпочтительно использовался CO_2 с более легкими изотопами углерода.

Увеличению концентрации органических веществ в окружающей среде способствовали размножение и отмирание первичных микроорганизмов. Наличие мортмассы обеспечило возможность гетеротрофного существования ряда микроорганизмов сначала путем брожения, а затем с помощью анаэробного дыхания. Поднятие вод Мирового океана сделало извержения вулканов подводными и прекратило выбросы вулканического пепла в атмосферу, которая постепенно очистилась от взвешенных частиц. Достигающий теперь поверхности Земли солнечный свет стал источником энергии сначала для аноксигенных, а затем для оксигенных фототрофов. Считают, что хотя фототрофные прокариоты и не были первыми обитателями на ранней Земле, способность расти за счет преобразования бактериохлорофиллами солнечной энергии в химическую возникла довольно рано. Несколько групп бактерий способны к такому фотосинтезу, в то время как для архей эта возможность пока не отмечена. Первые фототрофы напоминали современных фотосинтезирующих протеобактерий или хлоробий из домена *Bacteria*, что согласуется с последними молекулярными данными о происхождении фотосинтеза. Такие бактерии осуществляли аноксигенный фотосинтез, используя сероводород или элементную серу для фиксации CO_2 на свету по реакциям



где $(\text{CH}_2\text{O})_n$ обозначает органическое вещество.

Вулканическая атмосфера ранней Земли была пригодна для развития таких организмов, поскольку в ней было много CO_2 и H_2S , необходимых для роста фототрофов. Этот тип фотосинтеза был назван аноксигенным, поскольку он протекает в анаэробных условиях и не сопровождается выделением молекулярного кислорода. Аноксигенные фототрофы могли появиться на планете 3,0—3,5 млрд лет назад и использовать все пригодные для жизни водные пространства планеты. Фотосинтез внес громадный вклад в развитие биосферы на Земле. Образуя большие количества органического вещества, он стимулировал развитие огромного количества гетеротрофов.

Одним из замечательных открытий современности является установление способности цианобактерий проводить аноксигенный фотосинтез с сероводородом в качестве донора электронов. Это свидетельствует в пользу гипотезы, что цианобактерии могли вести свое происхождение от аноксигенных бактерий-предшественников, подобных зеленым или пурпурным серным бактериям. Данные молекулярных исследований двух фотосистем поддерживают эту гипотезу. Одна из этих систем, как полагают, могла произойти от фотосистемы предшественников современных хлоробий, а другая — от фотосистемы предшественников современных

гелиобактерий. Считают, что сформировавшаяся фотосистема II вначале могла работать с двухвалентным железом как донором электронов, а затем перейти на окисление воды. Также к возникновению варианта, способного использовать воду в качестве донора электронов для фотосинтеза с высвобождением кислорода, мог привести мутационный процесс. Это важное изменение могло закрепиться в результате естественного отбора, когда концентрация сероводорода стала слишком низкой, а воды для проведения окисленного фотосинтеза всегда было в достатке.

Возникновение окисленного фотосинтеза (примерно 2,3 млрд лет назад) явилось событием колоссальной важности, кардинально изменившим физико-химические условия земной атмосферы и приведшим в конечном итоге к существенному накоплению органического вещества. Это подтверждается результатами целого ряда изотопных, биохимических и молекулярно-биологических исследований, а также обнаружением значительного количества ископаемых остатков нитчатых фототрофных микроорганизмов, в частности, цианобактерий. Следует отметить, что цианобактерии были первыми организмами на Земле, развившими у себя способность к окисленному фотосинтезу, и с их появлением и благодаря их активности, как полагает большинство ученых, на Земле появился доступный молекулярный кислород. С появлением такого мощного окислителя организмы получили возможность запасать гораздо больше энергии в окислительных процессах, где донорами электронов являются органические и неорганические вещества. Цианобактерии возникли в период между 2,5 и 3,0 млрд лет назад, еще на бескислородной Земле, о чем свидетельствуют окаменевшие их остатки, обнаруживаемые в соответствующих отложениях. Полагают, что свободный кислород в атмосфере Земли появился в период между 2,5—1,5 млрд лет назад, поскольку оксиды железа (FeO и Fe_2O_3), способные образоваться лишь в присутствии молекулярного кислорода в атмосфере, впервые обнаруживают в осадках, датируемых именно этим отрезком времени. Такие слоистые железистые формации в настоящее время не образуются, поскольку концентрация кислорода в атмосфере и океанах слишком велика для такого процесса. При этом содержании кислорода в атмосфере (21%) идет процесс формирования «красных» отложений, состоящих из более окисленных гематитов (Fe_3O_4).

Образованные цианобактериями небольшие количества кислорода сначала окисляли восстановленные и растворенные в воде соединения, например, Fe^{2+} и H_2S , что препятствовало быстрому накоплению кислорода в атмосфере. После перемещения легкоокисляемых металлов в ядро Земли избыток кислорода стал постепенно накапливаться, поэтому концентрация кислорода в атмосфере Земли увеличивалась очень медленно, как полагают, на протяжении 2—3 млрд лет до достижения современного уровня в 21%.

Появление кислорода в атмосфере немедленно и в большой мере сказалось на ходе эволюции биосферы. Это привело к окислению многочисленных восстановленных соединений на поверхности Земли и в ее атмосфере, таких как сульфиды железа, в огромном количестве присутствовавшие на ранней Земле. Возникли условия для появления и развития железоо-

кисляющих бактерий. Кислород, однако, явился ядом для многих к тому времени развитых групп анаэробных микроорганизмов и отрицательно повлиял на процессы азотфиксации, которые проходят в анаэробных условиях. Появление кислорода привело к развитию аэробно дышащих микроорганизмов, которые имеют более эффективные системы запасаения энергии. Часть образованного органического вещества откладывалась в виде залежного углерода, что способствовало сохранению постоянной концентрации кислорода в атмосфере.

Около 1,8 млрд лет назад возник озоновый слой, защищающий клетки от губительного ультрафиолетового излучения. Некоторые водные формы живых существ, устойчивые к действию УФ-света, возникли и существовали на Земле до возникновения озонового слоя, поскольку вода сильно поглощает УФ-лучи. Наличие озонового слоя позволило микроорганизмам начать освоение наземных местообитаний.

Поскольку прокариоты, бактерии и археи, возникли более чем за 3 млрд лет до появления растений и животных, они сформировали большое количество самых разнообразных по функциям и способам питания групп, которые были способны использовать все природные вещества, из которых можно извлечь биогенные элементы и (или) энергию. Прокариоты были способны обеспечить все биологические превращения в циклах биогенных элементов на Земле, поддерживая баланс между процессами деструкции и окисления отмерших органических веществ до CO_2 и H_2O , и первичной продукцией органических соединений путем фиксации CO_2 . Формирование «окисленной» атмосферы существенно ускорило процессы эволюции биосферы в целом, что привело к появлению клеток с эукариотической организацией. Первые эукариоты образовались примерно 1,5 млрд лет назад путем эндосимбиоза. Часть образовавшихся эукариот освоила принципиально новый тип питания — эндоцитоз, однако в целом их метаболические возможности по сравнению с прокариотами значительно сузились. Это отчасти компенсировалось образованием симбиозов из компонентов с разной клеточной организацией. Например, сложные сообщества микробных матов могли участвовать в формировании наземных экосистем еще до развития сосудистых растений. Около 800 млн лет назад тесное сосуществование разных одноклеточных эукариот привело к возникновению многоклеточности. Таким образом, многоклеточные организмы формировались и развивались в условиях, созданных прокариотами, вступали с ними в тесные симбиозы и далее эволюционировали совместно. Появление кислорода и затем формирование озонового слоя вызвали мощный толчок эволюции высших форм жизни на Земле. За последние 600 млн лет появились и эволюционировали множественные формы многоклеточных организмов, особенно разнообразные в условиях наземного существования. По сравнению с ними прокариоты, которые эволюционируют уже более 3,5 млрд лет, имеют сравнительно простые структуры, но при этом обладают огромным разнообразием метаболических, физиологических и генетических особенностей и возможностей.

Активное воздействие человека на окружающую среду (развитие промышленности, сельского хозяйства, рубка лесов, добыча и переработка

полезных ископаемых) привело к значительному изменению соотношения залежного и «живого» органического вещества в глобальном масштабе (рис. 15.2).

Содержание
органического
вещества, усл. ед.

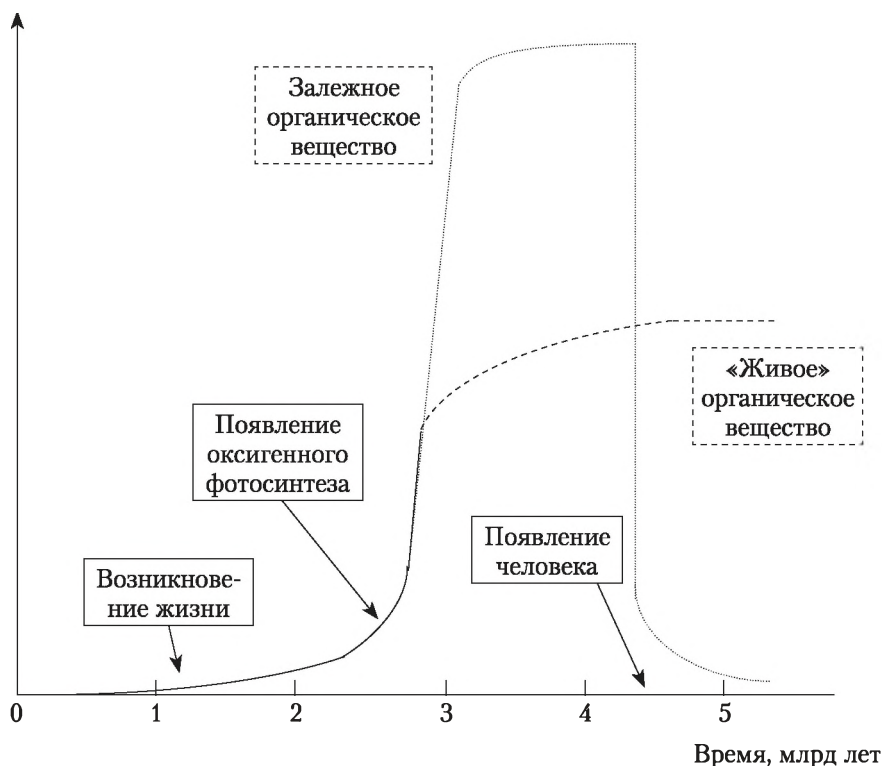


Рис. 15.2. Изменение соотношения залежного и «живого» органического вещества за счет антропогенного фактора

15.1.2. Теория симбиогенеза

Наиболее популярными среди ученых гипотезами о возникновении и эволюции эукариот являются теории профессоров Л. Маргулис (США) и В. Зиллига (ФРГ). Последний предполагает, что эукарии возникли в результате слияния предшественников современных архей и бактерий. Согласно его теории, прогеноты имели легко проницаемую мембрану (возможно, белковую), которая позволяла обмениваться генетическими элементами с другими видами. Эволюционное развитие или какие-то события затем разделили про-архей и про-бактерий на две различные, возможно географически удаленные, популяции. За время раздельного существования две группы прокариотических организмов приобрели различные метаболические особенности, генетические системы и сформировали собственные характерные липидные клеточные мембраны: со сложными эфирными связями жирных кислот с глицеролом для предка бактерий

и с простыми эфирами изопреноидных спиртов с глицеролом для предка архей. Согласно Зиллигу, примерно в это же время произошло слияние клеток этих двух эволюционных линий прокариот с возникновением пре-эукариотической клетки.

Сходные черты эукариев, архей и бактерий рассматривают как свидетельства в поддержку этой гипотезы. Например, клеточные мембраны эукариев и бактерий содержат жирные кислоты, связанные с глицеролом сложноэфирными связями. У архей, в противоположность этому, липиды состоят из глицерола, связанного простыми эфирными связями с длинноцепочечными спиртами. Этот факт свидетельствует в пользу того, что если слияние произошло, то это случилось уже после того, как бактериальный предшественник приобрел способность формировать свои липидные мембраны с жирными кислотами. Ни бактерии, ни археи не имеют митохондрий, тогда как у животных и растений в этих органеллах происходит аэробное дыхание. Сами митохондрии являются потомками бактерий, о чем свидетельствуют следующие факты:

1) митохондрии содержат свою собственную ДНК, не окруженную мембраной;

2) митохондрии имеют собственные рибосомы, которые сходны с 70S рибосомами бактерий;

3) размер и структура митохондрий соответствуют характеристикам граммотрицательных бактерий без клеточных стенок;

4) анализ последовательностей 16S рРНК митохондрий показал, что они произошли от пре-бактерий, а их ближайшими родственниками являются протеобактерии.

Подобно митохондриям, хлоропласты водорослей и высших растений чрезвычайно похожи на прокариотические клетки другой группы — цианобактерий. Они, как и митохондрии, не имеют ядерной мембраны, обладают собственной ДНК, имеют 70S рибосомы, лишены клеточной стенки, а анализ последовательностей 16S рРНК показывает, что они располагаются на универсальном филогенетическом древе возле цианобактерий в домене *Bacteria*. **Теория симбиогенеза** (эндосимбиоза), сформулированная Л. Маргулис, была выдвинута для объяснения симбиотического происхождения хлоропластов и митохондрий. Согласно этой теории, в ранней эволюции прокариот некоторые прокариотические организмы (т.е. пре-митохондрии и пре-хлоропласты) стали внутриклеточными симбионтами эукариотической клетки. Со временем члены этих симбиозов становились все более зависимыми друг от друга, пока бактерии не стали органеллами внутри эукариотической клетки.

Дальнейшую поддержку эндосимбиотическая теория получила при изучении внутриклеточных ассоциаций бактерий с простейшими. Так, некоторые простейшие содержат внутри клетки в качестве эндосимбионтов клетки бактерий, осуществляющих уникальные процессы или функции, важные для клетки хозяина. Например, клетки простейшего *Paramecium* sp., содержащие в качестве эндосимбионтов клетки бактерий, называемые «капучастиками», приобретают способность убивать не содержащих таких частиц парамеций. Такая симбиотическая ассоциация получила название

«убийца парameций», так как «каппа-частицы» вырабатывают органические соединения, токсичные для не несущих эндосимбионтов парameций. «Каппа-частицы» сохраняют собственную клеточную стенку, т.е. этот вид симбиоза не столь высокоразвит по сравнению с митохондриальным. Другие примеры эндосимбиозов представляют собой сожительство некоторых жгутиковых и амeбовидных простейших с фотосинтетическими партнерами, называемыми цианеллами. Цианеллы — это цианобактерии-эндосимбионты, которые имеют все бактериальные составляющие клетки, включая собственную клеточную стенку.

15.2. Гипотеза о зарождении жизни вне Земли. Теория панспермии

Еще в 70-х гг. XX столетия один из индийских математиков рассчитал вероятность зарождения жизни на Земле от синтеза простых молекул до появления генетического кода, механизма синтеза белка и прохождения всех этапов эволюции живого на планете за тот период времени, когда жизнь на Земле, как считается, стала возможной, т.е. поверхность планеты в достаточной степени остыла (около 3,5 млрд лет назад). Его расчеты показали, что эта вероятность составляет одну квадрильонную долю процента, т.е. зарождение жизни на нашей планете и прохождение биологической эволюции за рассчитанный период времени представляется абсолютно невероятным событием. Поэтому многие ученые в настоящее время склоняются к мнению, что жизнь на Землю была привнесена с других планет, возможно, даже из другой солнечной системы или галактики. На Земле появился готовый, сформировавшийся в космосе задолго до появления планеты, генетический код и механизм синтеза белка, причем, возможно, что такие заносы случались неоднократно. Одной из гипотез появления жизни на Земле является **теория панспермии** о возникновении жизни на других планетах и последующем переносе микроорганизмов на Землю. Весьма вероятно, что первыми обитателями Земли были споровые бактерии и грибы. От них за время, отведенное для эволюции живого на планете, были образованы и все другие живые организмы. Недавно британский астроном Ф. Хойл получил доказательства в поддержку этой гипотезы, основанные на поглощении радиации межгалактической пылью. Хойл утверждает, что межгалактическая пыль может содержать споры грибов и бактерий, которые прекрасно переносят жесткие условия космоса: абсолютный вакуум, низкую температуру, отсутствие влаги и высокую радиацию. Голландские ученые из Лейденского университета изучили влияние высокого вакуума, низких температур и УФ-радиации на выживание спор *B. subtilis*. Данные их экспериментов свидетельствуют, что споры в межзвездном космическом облаке могут выжить в течение 4,5–45 млн лет. Молекулярные межзвездные облака перемещаются по космическому пространству со скоростью, достаточной для переноса живых спор от одной солнечной системы к другой за этот рассчитанный период времени. И хотя эти результаты однозначно не доказывают факт зарождения жизни вне Земли и привнесения ее на нашу планету извне, они могут быть приняты

во внимание при рассмотрении такой гипотезы и доказывают возможность путешествия живых организмов через космическое пространство от одной планеты к другой.

Подтверждением гипотезы панспермии служит также обнаружение в одной из групп метеоритов окаменелостей, морфологически сходных с земными цианобактериями и плесневыми грибами. Возраст таких метеоритов (4,6 млрд лет) соответствует времени формирования Земли. Если будет доказано, что это действительно остатки древних микроорганизмов, то можно будет говорить о возникновении микробной жизни во вселенной раньше, чем на Земле. Однако поскольку ни в одном метеорите не найдены живые представители мира микробов, пока рано говорить о возможности занесения из космоса прокариотических клеток, давших начало земной биологической эволюции.

Резюме

Прокариотические микроорганизмы были первыми обитателями нашей планеты, которые сформировали биосферу, пригодную для существования более высокоорганизованных существ. Первые прокариоты, по-видимому, существовали хемолитотрофно, строя вещества клетки из минеральных соединений. «Восстановленная» атмосфера состояла из водяных паров, водорода, метана, аммиака, угарного газа и сероводорода (анаэробные условия). Размножение и отмирание первичных микроорганизмов привело к увеличению концентрации органических веществ в окружающей среде. Гетеротрофы стали получать энергию сначала путем брожения, а затем анаэробного дыхания. После очищения атмосферы от вулканического пепла смогли развиваться сначала аноксигенные, а затем и оксигенные фототрофы. Накопление избытка кислорода в атмосфере вызвало появление аэробно дышащих микроорганизмов. Постоянству содержания кислорода в атмосфере способствовало захоронение части образованного органического вещества в виде залежного углерода. Возникновение озонового слоя позволило микроорганизмам начать освоение наземных местообитаний. Затем путем эндосимбиоза образовались первые эукариоты. Тесное сосуществование разных одноклеточных эукариот привело к возникновению многоклеточности.

Находка в древних метеоритах окаменевших включений, морфологически сходных с земными микроорганизмами, говорит о том, что микробная жизнь могла возникнуть во вселенной раньше, чем на Земле.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Какие события эволюции микроорганизмов сыграли существенную роль в становлении современной биосферы?
2. Почему многоклеточные организмы считают «настройкой» мира прокариот?
3. Попробуйте привести факты «за» и «против» гипотезы занесения жизни на Землю с других планет.

Семинар 1

Изменение представлений об эволюции жизни на Земле и об участии в ней микроорганизмов

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендуемой литературы.

Раздел V
НАРОДНОХОЗЯЙСТВЕННОЕ
ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ



Глава 16

ЗНАЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- человеческий опыт применения активности микроорганизмов;

уметь

- объяснять причины порчи полезных продуктов микроорганизмами;

владеть

- приемами выделения полезных микроорганизмов из пищевых продуктов и подавления роста нежелательных микробов.
-

16.1. «Польза» и «вред» микробных процессов. Области применения микроорганизмов

Свойства микроорганизмов, важные для человеческой практики, условно подразделяют на два больших кластера:

- 1) полезные для человека;
- 2) негативные по отношению к интересам человека.

Однако «пользу» и «вред» следует рассматривать с точки зрения человеческой практики, что далеко не всегда совпадает с положительным или отрицательным влиянием на природные процессы. Например, безусловно, вредный для человека процесс порчи продуктов и биокоррозии материалов является необходимой частью полезного природного процесса деструкции органических веществ.

Микроорганизмы давно и успешно используются человеком для своих нужд, прежде всего, в микробиологических производствах продуктов питания (кваса, пива, вина, уксуса, хлеба, кисломолочных, заквашенных и соленых продуктов), кормов для животных и пищевых добавок. Многие индивидуальные вещества, которые не могут быть получены химическим путем или их синтез чрезвычайно дорог, образуются в процессе микробного метаболизма. При получении препаратов для медицины, ветеринарии и сельского хозяйства микроорганизмы играют определяющую роль. Микробиологические стадии присутствуют в производственном процессе ряда добывающих и обрабатывающих отраслей, таких как извлечение металлов из бедных руд, изготовление льняных волокон и табачных изделий. Микроорганизмы являются основными агентами переработки и очистки окружающей среды от отходов сельского хозяйства, промышленности, продуктов жизнедеятельности человека и соединений-ксенобиотиков. Участие микро-

организмов необходимо для создания замкнутых систем жизнеобеспечения в космических кораблях и подводных лодках, находящихся в автономном плавании. При этом объединяются возможности разных функциональных групп микроорганизмов, перерабатывающих продукты жизнедеятельности человека, производящих кислород для дыхания, пищевой и кормовой белок для питания членов экипажа и выращиваемых животных (оксигенных и аноксигенных фототрофов, гидролитиков, бродильщиков, метилотрофов, метаногенов и т.д.). С помощью генно-инженерных методов путем введения определенных генов в микробную клетку микроорганизмы могут быть превращены в «фабрики» по производству нужных человеку сложных природных соединений в сверхколичествах. На основе микробных клеток или их частей создаются тест-системы и биосенсоры с высокой чувствительностью. В научных исследованиях микроорганизмы в качестве моделей с успехом применяют специалисты разных отраслей биологии.

Вредная для человека деятельность микроорганизмов проявляется в процессах порчи пищевых продуктов и микробного повреждения промышленных и бытовых объектов и материалов. Патогенные для людей, животных и растений микроорганизмы способны нанести существенный ущерб здоровью и развитию человеческой популяции.

16.2. Общие принципы организации и совершенствования микробиологических производств

Создание микробиологического производства требует предварительного проведения лабораторных исследований, заключающихся в поиске продуцента, изучении его свойств и оптимизации способа его культивирования. Следующей стадией является переход от маленьких объемов (в колбах и лабораторных ферментерах) к большим (масштабирование) с последующим испытанием микробного процесса в промышленных условиях. В состав микробиологического предприятия должна входить лаборатория, которая осуществляет постоянный мониторинг за свойствами продуцента и стерильностью процесса, контролируя отсутствие посторонних микроорганизмов и бактериофагов. Микробиологическая лаборатория завода следит за состоянием культуры в процессе хранения и производства, проводя периодические рассевы, отбирая высокопродуктивные колонии и создавая условия для поддержания активности.

Одним из путей совершенствования микробиологических производств является применение мутантных и генно-инженерных продуцентов. Например, для получения промежуточных соединений различных циклов (ЦТК) используют регуляторные мутанты, что позволяет накапливать органические и аминокислоты. Генно-инженерные методы позволяют получать продуценты с заданными свойствами и производить уникальные вещества в промышленных масштабах. Среди них — высокотермостабильные ферменты, искусственно сконструированные пептиды и белки, человеческие терапевтические агенты (инсулин, интерферон, эпидермальный фактор роста, поверхностный антиген вируса гепатита В и т.д.).

Для отбора продуцентов, их поддержания в активном состоянии и хранения применяют как классические, так и новые методы. Например, для получения активных продуцентов у дрожжей и плесневых грибов после ферментативного удаления клеточной стенки и частичного растворения ЦПМ под действием полиэтиленгликоля производят слияние протопластов двух штаммов (рис. 16.1).

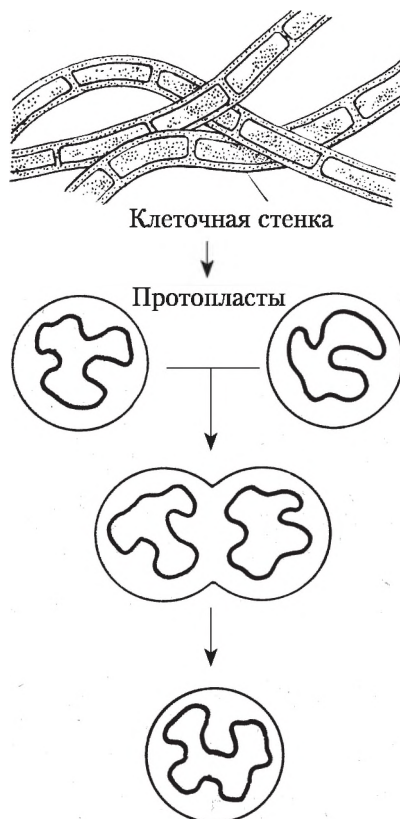


Рис. 16.1. Слияние протопластов

При этом их генетический материал «перемешивается», поэтому после регенерации клеточной стенки полученный продуцент будет иметь другие свойства. Такие микроорганизмы менее стабильны, чем «дикие», поэтому необходимо применять соответствующие методы сохранения их активности. Из относительно новых способов хранения можно назвать лиофилизацию и хранение под жидким азотом.

Еще один путь совершенствования микробиологических процессов — это разработка новых технологических подходов. Постоянно ведется работа по совершенствованию аппаратов для культивирования и полной автоматизации и компьютеризации процесса. Удобство работы с культурой повышается при иммобилизации клеток и (или) ферментов на(в) твердом носителе. В зависимости от природы носителя и механизма прикрепления различают несколько видов иммобилизации (рис. 16.2).

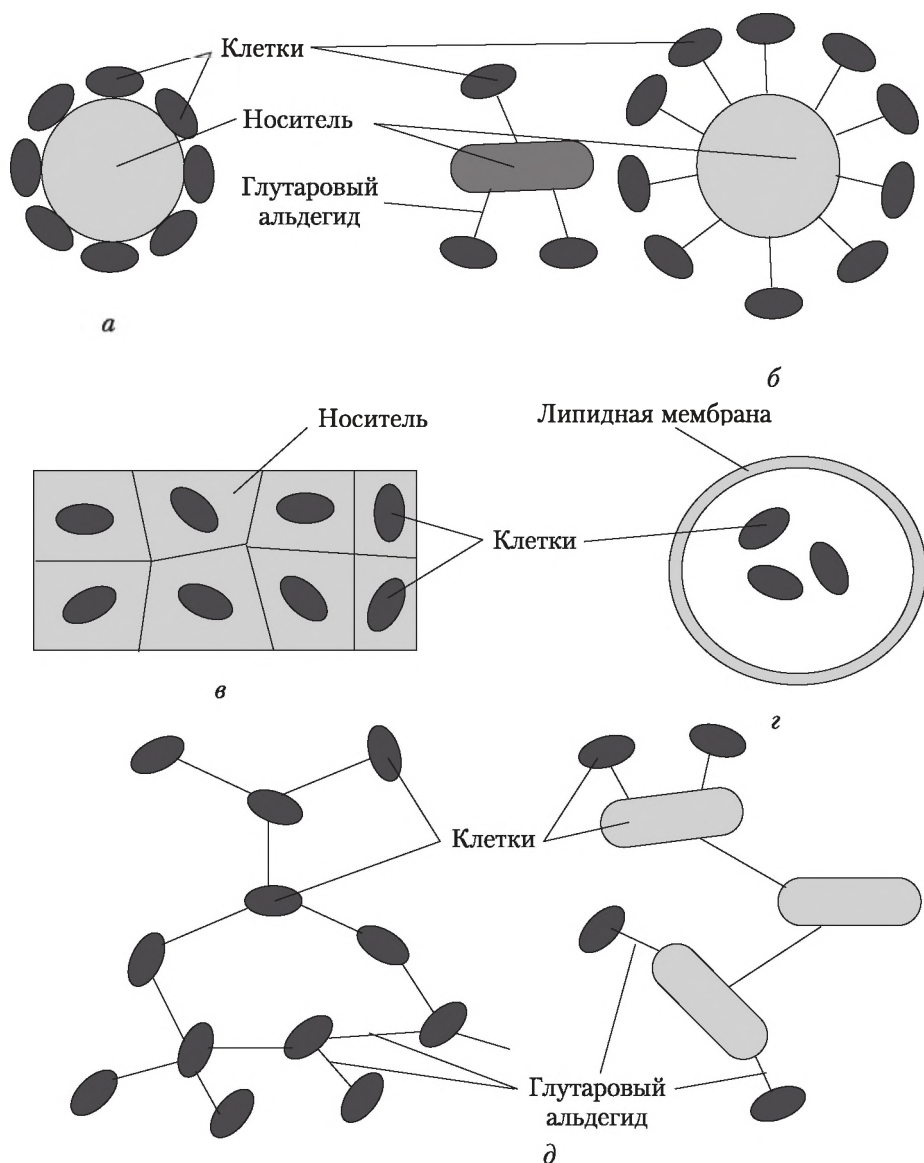


Рис. 16.2. Виды иммобилизации:

a — физическая (абсорбция: керамические бусины, стеклянные ерши, поролон);
б — химическая (ковалентное связывание: инертный носитель + клетки + глутаровый альдегид);
в — физико-химическая (включение в полимерную матрицу: ПААГ, агар, каррагинан, альгинат, криогели);
г — физическая (микроинкапсулирование: липосомы);
д — химическая (сшивание: клетки + глутаровый альдегид)

При иммобилизации изменяется не только пространственное положение продуцента (конгломераты клеток на(в) носителе представляют собой уже макрообъекты), но и значительно преобразуется его жизнедеятельность. При взаимодействии с носителем изменяются свойства поверхностных структур клетки (в частности, ЦПМ) и образуется новая поверхность раз-

дела фаз. Примеры некоторых производственных процессов, основанных на использовании закрепленных клеток, приведены в табл. 16.1.

Таблица 16.1

**Производственные процессы, основанные на использовании
иммобилизованных клеток**

Процесс	Продукт или активность	Микроорганизм
Производство антибиотиков	Пенициллин	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Бацитрацин	<i>Bacillus</i> sp.
	Цефалоспорины	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Производство аминокислот	L-аланин	<i>Corynebacterium dismutans</i>
	L-глутамат	<i>C. glutamicum</i>
	L-триптофан	<i>E. coli</i>
	L-лизин	<i>Microbacterium ammoniaphila</i>
Производство ферментов	Кофермент А	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>
	Протеаза	<i>Streptomyces fradiae</i>
Производство витаминов	Пантотеновая кислота	<i>E. coli</i>
Трансформация стероидов	Преднизолон	<i>Curvularia lunata</i> , <i>Corynebacterium simplex</i>
Производство продуктов брожения	Этанол	<i>S. cerevisiae</i>
	Лактат	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Очистка окружающей среды	Расщепление <i>пара</i> -нитрофенола	<i>Pseudomonas</i> spp.
	Расщепление фенола	<i>Candida tropicalis</i>
	Денитрификация	<i>Micrococcus</i> spp.
	Сорбция тяжелых металлов (уран, плутоний)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i>

Резюме

Микроорганизмы издавна широко используются человеком для своих нужд. Понятие «полезность» является относительным, и часто те процессы, которые вредны для человека, для природы в целом имеют положительное значение.

К полезным для человека областям деятельности микроорганизмов относятся, прежде всего, микробиологические производства продуктов питания и индивидуальных веществ и препаратов. Некоторые отрасли добывающей и обрабатывающей промышленности требуют участия микроорганизмов в производственном процессе. Микроорганизмы помогают перерабатывать отходы сельского хозяйства и промышленности и очищать окружающую

среду от вредных соединений. Вредной для человека деятельностью микроорганизмов являются порча пищевых продуктов и микробное повреждение промышленных и бытовых объектов и материалов. Существенный ущерб человечеству наносят болезнетворные для людей, животных и растений микроорганизмы.

Для создания микробиологического производства сначала необходимо провести лабораторные исследования, заключающиеся в поиске продуцента, изучении его свойств и оптимизации способа культивирования. Следующей стадией является испытание микробного процесса в промышленных условиях. Микробиологическая лаборатория завода постоянно следит за состоянием продуцентов в процессе хранения и производства. Для биотехнологических целей часто используют мутантные и генетически измененные микроорганизмы. Постоянно совершенствуются аппараты для культивирования, внедряется полная автоматизация и компьютеризация процесса. Перспективна такая технологическая форма продуцента, как иммобилизованные клетки и (или) ферменты.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Разделите микробные процессы на полезные и вредные для человека. Какие из них были известны задолго до открытия их микробиологической природы?
2. Перечислите приемы совершенствования микробиологических производств.
3. Чем иммобилизованные продуценты лучше обычных производственных культур?

Глава 17

ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- примеры применения микроорганизмов в биотехнологии;

уметь

- объяснять способы использования микроорганизмов на практике;

владеть

- приемами выделения полезных микроорганизмов из пищевых продуктов.

17.1. Микроорганизмы в пищевых производствах

17.1.1. Традиционные микробиологические способы приготовления пищевых продуктов с помощью микроорганизмов

Человечество для своих нужд с давних пор широко использовало многие процессы, не догадываясь об их микробиологической природе. Еще задолго до того, как стали понятны механизмы микробного преобразования продуктов, человек интуитивно научился использовать их в своей жизни. Так, приготовление пива было известно еще в Древнем Египте более 6 тыс. лет назад. Давно начали применять выпечку хлеба, приготовление кваса и вина. Например, у народов Севера с древних времен и до наших дней сохранился способ приготовления китового мяса, позволяющий им восполнять недостаток витаминов и аминокислот: сырое мясо заворачивают в шкуру и кладут под снег для «вызревания», развивающиеся в нем микроорганизмы образуют витамины и осуществляют частичный гидролиз белка, образуя пептиды и аминокислоты.

Микроорганизмы издавна применяются человеком для производства молочных продуктов, сыра, хлеба, квашеной капусты, маринадов, пива, вина, некоторых мясных изделий и различных национальных кушаний (табл. 17.1).

Таблица 17.1

Пищевые продукты разных групп, при изготовлении которых используют микробные процессы

Готовый продукт	Сырье	Микроорганизмы
Пиво	Зерно	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Хлеб ржаной	Ржаная мука	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i>

Готовый продукт	Сырье	Микроорганизмы
Хлеб белый	Пшеничная мука	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ветчина	Свинина	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
Соленые огурцы	Свежие огурцы	<i>Lactobacillus plantarum</i> и другие виды, <i>Pediococcus</i> sp.
Квашеная капуста	Свежая капуста	<i>Lactobacillus plantarum</i> и другие виды, <i>Leuconostoc</i> sp.
Колбаса	Говядина, свинина	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
Соевый соус	Рис, соевые бобы	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>
Вино	Виноградный сок	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. champagnii</i>

Поскольку неконтролируемый рост микроорганизмов в пищевых продуктах может вызвать их порчу, задача микробиологов, работающих в современной пищевой промышленности, не только следить за правильным использованием микробных культур, но и совершенствовать методы, увеличивающие сроки хранения таких продуктов.

17.1.2. Молочнокислые бактерии и продукты, приготовленные с их помощью

С незапамятных времен люди готовили большое количество кисломолочных продуктов. Эти продукты различались вкусом, ароматом и питательными свойствами, однако все содержали большое количество молочной кислоты, полученной при сбраживании сахара, что приводило к снижению pH и предотвращало развитие гнилостных микроорганизмов.

Молоко — это один из основных сельскохозяйственных продуктов, обладающих высокой питательной ценностью и являющихся источником белка, углеводов, минералов и витаминов для человека. Однако эти же качества делают молоко прекрасной средой для роста микроорганизмов. Сырое молоко содержит микробные клетки, попавшие в него при дойке, а также при перевозке и хранении. Сбраживание (сбраживание) сырого молока в течение тысячелетий использовалось людьми для сохранения этого продукта без охлаждения в виде напитков с приятным вкусом и ароматом. К тому же кисломолочные продукты усваиваются в организме человека втрое быстрее обычного молока. В настоящее время производят большое количество разных видов кисломолочных продуктов, некоторые из которых приведены в табл. 17.2.

Таблица 17.2

Некоторые кисломолочные продукты и микроорганизмы, применяемые при их изготовлении

Продукт(ы)	Субстрат	Стартовые культуры	Особенности
Ацидофилин	Снятое молоко	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Подавляет развитие гнилостной микробиоты

Продукт(ы)	Субстрат	Стартовые культуры	Особенности
Болгарская простокваша	Снятое молоко	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	То же
Простокваша	Цельное молоко	<i>Leuconostoc cremoris</i> или <i>L. dextranicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> или <i>lactis</i>	То же
Кефир	Коровье, овечье или козье молоко	Различные виды и подвиды родов <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp., иногда уксуснокислые бактерии — в виде «кефирных зерен»	Содержит до 1% этанола, подавляет развитие гнилостной микробиоты
Кумыс	Кобылье молоко	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. leichmanii</i> , <i>Torula</i> spp.	Содержит до 2–10% этанола, подавляет развитие гнилостной микробиоты
Сметана	Сливки	<i>Leuconostoc cremoris</i> или <i>L. dextranicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> или <i>lactis</i>	Может быть высокой жирности
Йогурт	Концентрированное снятое молоко	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Изготавливается из коровьего молока низкой жирности, в продукт добавляют стабилизаторы типа желатина
Бифидопродукты	Снятое молоко или сливки	Основные стартовые культуры + <i>Bifidobacterium</i> spp.	Образуются ацетат и лактат, подавляет развитие гнилостной микробиоты

Сквашенное молоко образуется после добавления в него стартовых культур молочнокислых бактерий (МКБ). Стартовые культуры в процессе брожения не только подкисляют молоко, но и образуют ароматические вещества. Так, при получении простокваши и сметаны *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и *lactis* применяют для образования молочной кислоты, а бактерии рода *Leuconostoc* — для синтеза ароматизаторов (ацетата и ацетилметилкарбинола). Для приготовления йогурта снятое молоко сначала концентрируют упариванием, а затем добавляют *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и смесь выдерживают при 45°C несколько часов. Характерный вкус йогурта складывается из сочетания вкусов молочной кислоты и ацетальдегида, образуемого *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus*. Чтобы замаскировать резкий вкус ацетальдегида, в йогурты часто добавляют фрукты. Для приготовления ацидофилина используют стерильное молоко с добавлением *Lactobacillus acidophilus*. Необходимость стерилизации молока перед добавлением стартовой культуры объясняется тем, что рост *L. acidophilus* легко подавляется другими культурами. Кефир готовят из коровьего, овечьего или козьего молока в процессе одновременного молочнокислого и спиртового брожений. МКБ образуют молочную кислоту, а дрожжи — этанол. Эти смешанные культуры растут в виде консорциумов **кефирных зерен**, которые могут быть отделены от продукта, сохранены и вновь использованы как стартовые культуры. Кефирные зерна (рис. 17.1) представляют собой тесное микробное сообщество, где клетки бактерий и дрожжей погружены в полисахаридный матрикс (рис. 17.2). Они имеют вид слизистых беловатых гранул, похожих на разваренный рис.



Рис. 17.1. Кефирные зерна

Кумыс готовят по той же технологии, но из кобыльего молока. И кефир, и кумыс являются слабоалкогольными напитками, содержащими обычно 1—2% спирта (крепкий кумыс может содержать до 10% спирта). Особенностью бифидопродуктов является наличие в стартовых культурах представителей рода *Bifidobacterium* либо внесение живых клеток этих микроорганизмов в уже сквашенные молочные продукты.

Приготовление масла является распространенным методом хранения молочного жира. Масло готовят путем взбивания сливок до момента, когда глобулы молочного жира хорошо отделяются от остального содержимого. Для получения масла можно использовать как свежие сливки, так и сливки, сквашенные с помощью МКБ, обычно лактококков (например, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* или *lactis*). При брожении белки молока теряют свою структуру, что облегчает их удаление из продукта, а диацетил, образуемый этими бактериями, придает маслу его характерный запах, цвет и вкус. Масло хранится дольше, чем свежее молоко, так как высокое содержание жира и низкая активность воды препятствуют микробной порче.

Сыроделие возникло в Азии более 8 тыс. лет назад. В настоящее время известно около 2 тыс. разновидностей сыра, изготавливаемых во всем мире. Большинство сыров готовят из коровьего молока (цельного или снятого),

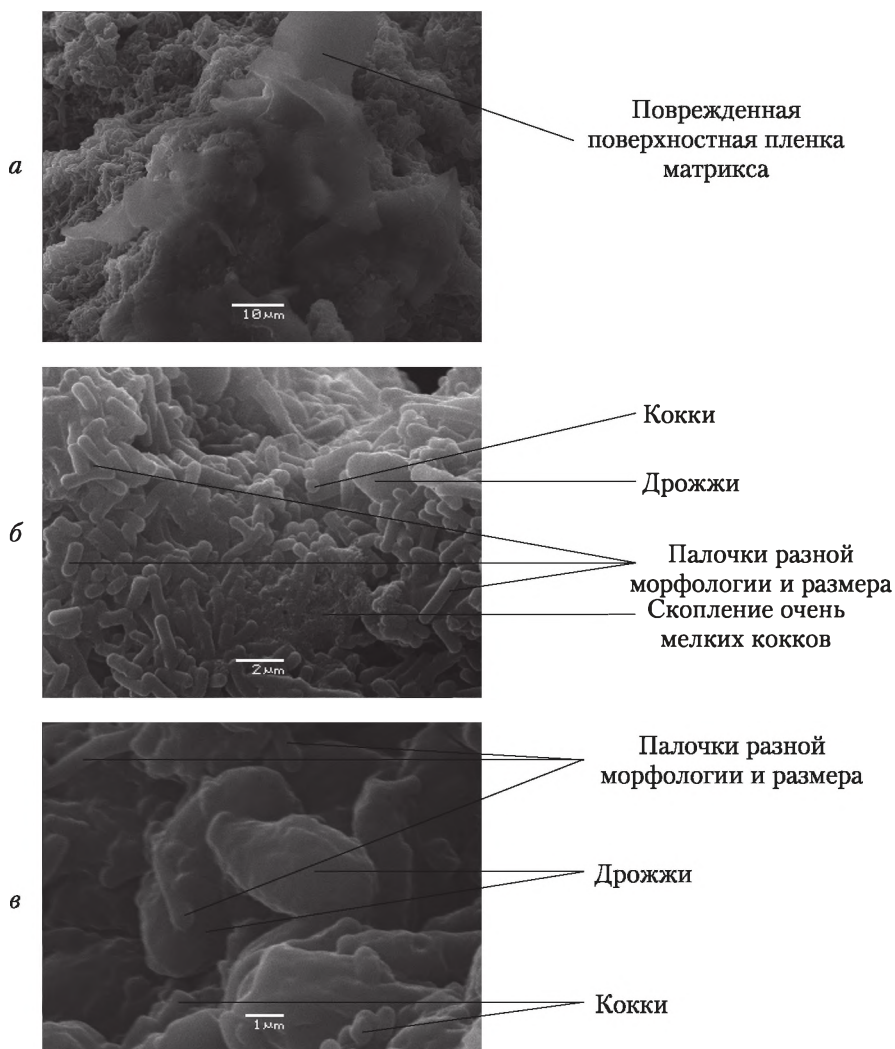


Рис. 17.2. Сканирующая электронная микроскопия кефирного зерна:

a — матрикс; *b*, *v* — морфотипы клеток

но есть сорта, приготовленные из сливок или молока других животных. В Европе и Юго-Западной Азии в основном используют овечье или козье молоко, а в некоторых странах для приготовления сыра применяют буйволиное, верблюжье и молоко лам. Тип используемого молока влияет на его аромат и цвет. Овечьи и козьи сыры более острые и ароматные по сравнению с сырами из коровьего молока из-за значительного содержания особых жирных кислот, придающих резкий вкус молоку. Цвет сыра зависит от количества β -каротина в нем. Сыры из коровьего молока имеют желтоватый оттенок, тогда как сыры, изготовленные на основе молока других животных (коз, овец, буйволов и т.д.), обычно белого цвета. Сыры различаются по периоду созревания (табл. 17.3) и делятся на незрелые (невыдержанные) и зрелые (выдержанные). Выдержанные сыры созревают от 1

до 16 мес., невыдержанные используют сразу после отделения молочно-белкового сгустка.

Таблица 17.3

**Некоторые сорта сыров и микроорганизмы,
используемые при их изготовлении**

Тип сыра	Название	Микроорганизмы
Мягкие, невыдержанные	Творог	<i>Leuconostoc citrovorum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	Сливочный	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	Нефшатель	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>diacetilactis</i>
Мягкие, выдержанные	Бри	<i>Brevibacterium linens</i> , <i>Penicillium camemberti</i> , <i>P. candidum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Камамбер	<i>P. camemberti</i> , <i>P. candidum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Лимбургский	<i>B. linens</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
Полутвердые, выдержанные	Блю	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Брик	<i>B. linens</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Жак Монтерей	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Мюнстерский	<i>B. linens</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Рокфор	<i>P. roqueforti</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
Твердые, выдержанные	Чеддер	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>durans</i> и <i>lactis</i>
	Колби	<i>Lb. casei</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>durans</i> и <i>lactis</i>
	Эдамский	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Гауда	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Швейцарский	<i>Lactobacillus helveticus</i> и <i>Propionibacterium frendenreichii</i> var. <i>shermanii</i> или <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> и <i>P. frendenreichii</i> var. <i>shermanii</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Очень твердые, выдержанные	Пармезан	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> и <i>lactis</i>
	Романо	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>

Стартовые культуры МКБ добавляют к свежему молоку для образования творожистого сгустка. Молоко подогревают до температуры, оптимальной для роста бактерий. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* и *lactis* обычно развиваются при 20—27°C. Некоторые сыры (например, Швейцарский) готовят при нагревании сгустка до высоких температур (50—54°C). В таких случаях стартовые культуры содержат бактерии, выдерживающие такой нагрев (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* или *Lb. helveticus*). Для образования гладкого и твердого сгустка в молоко также добавляют фермент ренин, который

помогает коагулировать белки молока. Раньше ренин добывали из желудка телят, сейчас его получают из специальных микроскопических грибов. Сырный сгусток отделяют от молочной сыворотки, перед созреванием прессуют и помещают в солевой раствор. Просаливание сыров снижает вероятность роста нежелательных микроорганизмов, а также придает им необходимый вкус и аромат. Затем сыр определенное время выдерживают. Микроорганизмы, участвующие в приготовлении сыра на стадии его созревания, могут быть введены в процесс в разное время. Например, пропионовые бактерии, лактобациллы и лактококки для швейцарских сыров добавляют в молоко до стадии образования сгустка, а *P. roqueforti* для Рокфора и прочих голубых сыров вводят в уже сформированный сгусток.

При созревании многие МКБ стартовых культур погибают, выделяя внеклеточные ферменты, которые участвуют в превращениях жиров, углеводов и белков в сгустке. Микроорганизмы стадии созревания, добавленные к уже сформированному сгустку, сбраживают остающиеся в сгустке углеводы и молочную кислоту с образованием характерных ароматических и вкусовых веществ. Микробные продукты влияют и на физические особенности сыра. Так, «глазки» Швейцарского сыра образуются как пузыри углекислого газа, выделяемые при развитии пропионовых бактерий. Голубой цвет и характерный вкус Рокфора и других голубых сыров обусловлены ростом на поверхности сгустка голубой плесени *P. roqueforti*. Настоящий сыр Рокфор готовят и выдерживают в известняковых пещерах в области Рокфор во Франции. Твердость сыра определяется длительностью его выдержки. Твердые сыры выдерживают от 2 до 16 мес., полутвердые — от 2 до 3 мес., а мягкие сыры — еще меньше. Невыдержанные мягкие сыры (творожные, сливочные, рикотта) не требуют выдержки и могут употребляться в пищу сразу после образования сгустка.

МКБ используют в качестве заквасок для мясных и рыбных продуктов, часто являющихся принадлежностью национальной кухни. Так готовят некоторые сорта сосисок, колбасы типа салями, сервелат и различные мясные и рыбные блюда японской и корейской кухни. Стартовые культуры для этих процессов включают некоторые штаммы видов *Pediococcus cerevisiae* и *Lactobacillus plantarum*, а на стадии дозревания иногда используют плесневые грибы *Aspergillus glaucus*. Кислоты, образуемые в результате гетероферментативного молочнокислого брожения, снижают pH, защищают мясо и рыбу от порчи и придают им характерный резкий привкус.

При приготовлении квашеных овощей и кислой капусты также происходит молочнокислое брожение. Образованная молочная кислота и низкие значения pH выступают в этих продуктах в качестве естественных консервантов. Молочнокислому брожению традиционно подвергают такие овощи, как капуста, морковь, огурцы, зеленые томаты, листовые овощи, зелень и оливки. При переработке соевых бобов применяют несколько видов брожений, в том числе и с участием МКБ, для получения специфического вкуса, аромата и физического состояния у готового продукта.

Квашеную капусту готовят путем молочнокислого сбраживания нарезанных и перетертых с солью капустных листьев. Для хорошего выделения капустного сока и предотвращения роста нежелательных микроорганиз-

мов к капустным листьям добавляют от 2,25 до 2,5% по массе поваренной соли. В результате продолжающегося дыхания самих листьев и потребления кислорода аэробными микроорганизмами, всегда присутствующими на листьях, в нарезанных капустных листьях и в окружающем их соке быстро создаются анаэробные условия. Процесс сквашивания капусты сопровождается сукцессией бактериальной популяции. В начальный период в бродящей массе капусты могут преобладать колиформные бактерии *Enterobacter cloacae*, образующие углекислый газ, смесь летучих жирных кислот и небольшое количество лактата. Постепенное накопление молочной кислоты приводит к подавлению роста энтеробактеров и преобладанию *Leuconostoc mesenteroides*, который растет при 21°C и устойчив к действию 2,5% NaCl. При содержании лактата до 1% по объему на поверхности бродильного чана могут расти дрожжи и некоторые бактерии. Дальнейшее накопление молочной кислоты стимулирует рост *Lactobacillus plantarum*, которая образует кислоты, но не газы. Развитие этих микроорганизмов приводит к возрастанию концентрации лактата до 1,5–2%, а также к снижению содержания образованного лейконостоком горького маннитола. Обычно на этой стадии процесс сквашивания останавливают, охлаждая бродящую массу. В случае продолжения процесса брожения преимущественное развитие получает *Lactobacillus brevis*, повышающая концентрацию лактата до 2,4% с одновременным появлением горького вкуса у капусты и образованием газа. Высококачественная квашеная капуста имеет содержание молочной кислоты 1,7% и низкую концентрацию диацетила, придающего вкус и аромат конечному продукту.

Соленые огурцы получают традиционным методом засолки с использованием природной микробиоты, находящейся на поверхности этих овощей. Для контроля за процессом брожения необходимо строго выдерживать температуру и соленость раствора для засолки. Контролируемый процесс засолки происходит при введении в бродильный чан *L. plantarum* и *Pediococcus cerevisiae*. В течение в 6–8 недель концентрацию соли постепенно увеличивают, доводя ее до 15,9% NaCl. В начале брожения при небольшой концентрации соли в засолочной массе могут развиваться представители псевдомонад, флавобактерий и бацилл. С увеличением содержания соли получают преимущества в развитии *L. mesenteroides*, *Enterococcus faecalis* и *P. cerevisiae*. При повышении концентрации лактата и соли начинают доминировать *Lb. plantarum*. На поздних стадиях брожения преимущества в росте получают дрожжи, которые способны расти при высоких (> 10%) концентрациях соли и некоторые углеводы превращать в этанол. Рост пленкообразующих дрожжей родов *Debaryomyces*, *Pichia*, *Endomycopsis* и *Candida* снижает концентрацию лактата. Из-за сложности смены доминирующих популяций микроорганизмов при таком естественном брожении процесс часто заканчивается порчей продукта. Из-за избыточного газообразования огурцы могут всплывать и взрываться. Некачественные «пустые» огурцы образуются при сжатию их внутреннего содержимого из-за высокой концентрации соли или уксусной кислоты. Дурно пахнущие овощи получаются при повышенном образовании сероводорода. Огурцы могут окрашиваться в черный цвет синтезируемым бактериями пигментом

и размягчаться под действием грибных протеаз. Развитие на поверхности соленых огурцов капсульных форм бактерий приводит к их ослизнению. Перед внесением заквасок с поверхности огурцов при помощи фумигации или хлорирования удаляют естественную микробиоту. Некоторые виды солений производят с изменением основной технологии. Например, при пониженном содержании соли для предотвращения развития нежелательных микробов добавляют уксус, а также различные специи. Кислотность солений отражает количество молочной кислоты, образующейся при брожении.

Молочнокислое брожение при приготовлении оливок длится в течение 2—10 мес. Собранные плоды промывают раствором едкого натра, который удаляет большую часть олеuropeина, горького фенольного гликозида, придающего свежим оливкам очень неприятный вкус. Затем плоды помещают в солевой раствор, где через две недели начинается развитие микробной популяции, использующей экстрагируемые из оливок вещества. На промежуточной стадии, длящейся от 2 до 3 недель, доминирующим бактериальным родом является *Leuconostoc* и происходит накопление молочной кислоты. На конечном этапе брожения преобладают *Lb. plantarum* и *Lb. brevis*, встречаются также дрожжи и различные бактерии. В готовом продукте содержится около 7,1% молочной кислоты.

В современной кулинарии широкое распространение получил соевый соус — коричневая соленая жидкость с резким вкусом, которую используют как приправу или как основу для приготовления других соусов. Закваску для приготовления соевого соуса готовят путем сбраживания влажной смеси соевых бобов и зерен пшеницы. Смесь засевают спорами плесневого гриба *Aspergillus oryzae*, который, развиваясь на ее поверхности, выделяет различные внеклеточные ферменты, в том числе протеазы и амилазы. Одновременно в смеси присутствуют и разные бактерии, среди которых преобладают МКБ. Готовую закваску высушивают и экстрагируют. Экстракт вносят в смесь размолотых соевых бобов, размолотой и разваренной пшеницы и пропаренных отрубей и выдерживают несколько дней при 30°C на плоских поддонах, а затем смачивают концентрированным соевым раствором. Дальнейшее выдерживание смеси может продолжаться от нескольких недель до года в зависимости от температуры. При созревании вступают в действие амилазы, протеазы и другие ферменты закваски, а также происходит смена микробных популяций. Сначала преобладают МКБ, в том числе *Pediococcus soyae*, а затем развиваются этанообразующие дрожжи *Saccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces soyae* и *Torulopsis* spp. Образование значительного количества естественного консерванта лактата и спирта усиливает специфический вкус конечного продукта.

Популярное на островах Полинезии блюдо — пои, готовят из растения таро, части которого кипятят, размалывают и смесь подвергают брожению от 1 до 6 дней. В течение первых нескольких часов в бродящей массе развиваются колиформные энтеробактерии, псевдомонады и другие микроорганизмы. Затем в результате сукцессионного процесса начинают доминировать представители родов *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Leuconostoc*. В конце процесса развиваются дрожжи и гриб *Geotrichum candidum*. Про-

дукты брожения, в основном, молочная, уксусная и муравьиная кислоты, этанол и углекислота приносят в готовый аромат, вкус и характерную консистенцию.

С помощью молочнокислого брожения растительный материал (трава, сочные корма, а также капуста, огурцы и помидоры) можно сохранить для скармливания скоту в виде силоса. Брожение происходит под действием природных популяций микроорганизмов, населяющих наземные части растений. Образующаяся при силосовании молочная кислота снижает pH корма и тем самым консервирует его. После силосования корма могут храниться довольно долго, но, как правило, их хранят до следующего урожая. Самый хороший силос получается из зеленой массы кукурузы, большинства зерновых, подсолнечника и турнепса, которые богаты углеводами и содержат относительно немного белка и воды. Медоносные травы, клевер, сено обычно силосовать труднее, а вика и горох не подвергаются силосованию. Скошенную траву или сочные корма, приготовленные для силосования, режут, подсушивают, прессуют и закладывают в силосные башни, наземные хранилища или в силосные ямы для создания анаэробных условий. Кислород, находящийся в растительной массе, быстро потребляется аэробами и факультативными анаэробами (энтеробактериями). Развивающиеся далее гомоферментативные лактобациллы, лактококки и лейконостоки образуют молочную кислоту и постепенно снижают pH до 4,0. Если закисление происходит недостаточно быстро, то может начаться рост *Clostridium butyricum*, который превращает лактат в масляную кислоту, имеющую неприятный вкус и запах. Силос становится несъедобным для животных. Уменьшение значения pH ниже 4,5 препятствует развитию этих клостридий. На более поздних стадиях процесса приготовления силоса преобладают кислотоустойчивые *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum* и *L. brevis*. Хороший силос характеризуется высокой концентрацией молочной кислоты (до 72 г/кг) и pH 3,7. Содержание масляной кислоты должно быть низким (не более 0,12 г/кг). При хранении силос не должен соприкасаться с кислородом.

Другой вид корма — сенаж, готовится из подсушенной растительной массы с влажностью 50—65%. При пониженной активности воды преимущества в росте получают лактобациллы, а развитие гнилостных бактерий подавляется, хотя значение pH составляет около 5. Сенаж содержит умеренные количества молочной и уксусной кислот.

17.1.3. Дрожжи и процессы приготовления пищевых продуктов с их использованием

Хлеб — это один из основных продуктов питания, приготовление которого включает целый комплекс процессов, связанных с микробным метаболизмом и действием ферментов муки. Мука содержит питательные вещества, способные поддерживать рост многих микроорганизмов. Микробные клетки попадают в муку при сборе и обработке зерна, а также при приготовлении теста. Микроорганизмы, специально вносимые в тесто, используются при хлебопечении с двумя целями: для образования большого количества углекислого газа, который поднимает тесто и для син-

теза дополнительных соединений, придающих специфический вкус и аромат определенным сортам хлеба. Ведущая роль в формировании свойств хлеба отводится пекарским дрожжам. Для изготовления хлеба применяют специальные дрожжевые закваски, причем для хлеба, пива, кваса, вина, спирта в настоящее время используют разные расы дрожжей одного вида *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи для хлебопечения в условиях недостатка кислорода проводят спиртовое брожение, превращая углеводы теста в этанол и углекислый газ, поднимающий опару. Такие дрожжи должны активно расти на глюкозе с обильным газообразованием и переносить высокие концентрации сахаров и поваренной соли в среде. При выпечке хлеба этанол испаряется, а сами дрожжи обычно погибают. Углекислый газ задерживается в тесте и при выпечке формирует характерную пористую структуру хлеба. Некоторые побочные продукты, образуемые дрожжами при спиртовом брожении, могут вносить вклад в окончательный вкус хлеба, однако основную роль в формировании вкусовых качеств специальных сортов хлеба играют бактерии. В настоящее время в закваски для некоторых видов хлеба добавляют пропионовые и молочнокислые бактерии. Например, резкий и кислый вкус рисового хлеба обусловлен развитием в опаре гетероферментативных *Lactobacillus brevis* и *Leuconostoc mesenteroides*. Характерная консистенция и вкус традиционного русского черного хлеба возникает при добавлении к приготовленной на основе ржаной муки опаре заквасок, содержащих наряду с пекарскими дрожжами чистые культуры гомоферментативных МКБ. Закваски для хлебопечения не должны содержать посторонних микроорганизмов и должны быть устойчивыми при хранении.

Дрожжи-сахаромицеты — это основной действующий элемент в процессах приготовления алкогольсодержащих напитков (вина и пива). Такие продукты могут быть получены из различного растительного сырья, которое содержит доступные углеводы. Наиболее традиционным способом приготовления вина является сбраживание виноградного сока. Сначала отжимают сок из ягод винограда (красные сорта винограда используют для красных и розовых вин, а белые сорта — для белых вин). В случае приготовления белых и розовых вин отжимки отбрасывают, а для красных вин их оставляют в соке. Далее возможно сбраживание виноградного сока дрожжами, которые являются естественной микробиотой винограда, или заквасками винных рас сахаромицетов (например, *S. cerevisiae* var. *ellipsoides*). Такие винные дрожжи специально отбирают среди штаммов *Saccharomyces cerevisiae* и поддерживают на винодельческих предприятиях. Перед внесением заквасок виноградный сок освобождают от естественной микробиоты путем пастеризации или стерилизации. Сбраживание виноградного сока обычно происходит в течение 3—5 дней при температуре 20—28°C. Конечная концентрация спирта в вине составляет от 10 до 12%. Затем отделяют биомассу дрожжей от вина и производят его охлаждение. Некоторые сорта вин могут подвергаться дображиванию или вторичному брожению. В первом случае происходит яблочно-молочнокислое брожение под действием МКБ родов *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, при котором яблочная кислота превращается в молочную, что приводит к снижению кислотности вина. Вторичное брожение характерно, например, для

игристых (шампанских) вин, когда в вино вносят дополнительное количество сахара, укупоривают его под давлением в бутылки из толстого стекла и оставляют для сбраживания этого сахара. Вторичное брожение хересных вин начинается с добавления спирта до 15% и выдержки вина на воздухе. В таких условиях на поверхности в виде пленки развиваются особые дрожжи, выделяющие ароматические вещества, придающие вину характерные вкус и запах грецкого ореха. Для формирования окончательного вкуса и букета готовые вина выдерживают в больших резервуарах (бочках) или в бутылках. При выдержке в вине идут химические и биохимические реакции, приводящие к стабилизации и созреванию напитка. Эта стадия длится от нескольких месяцев до нескольких лет. Перед продажей вино из больших емкостей разливают в бутылки, при этом иногда смешивают (купажируют) разные партии вина. По содержанию остаточных сахаров вина подразделяются на сухие и сладкие. Дрожжевое брожение прекращается при достижении $\approx 12\%$ -го содержания спирта в вине. Если начальное количество сахара больше, чем то, что может переработаться в алкоголь, то после прекращения процесса брожения еще останется несброженный сахар. Сухие вина не содержат остаточных сахаров, а в сладких — могут оставаться. В современном виноделии применяют внесение различных ароматических добавок, принудительное нагнетание CO_2 (для искристых вин), дополнительное внесение спирта (для крепленых вин). Для получения сладких десертных вин используют виноград, специально зараженный грибом *Botrytis cinerea*. Развитие гриба приводит к обезвоживанию ягод и повышению содержания сахара в них. Сок из такого винограда сбраживают специальные дрожжи, быстро перерабатывающие глюкозу и не использующие фруктозу, что и обеспечивает повышенную сладость этого вина.

Приготовление пива отличается использованием зернового сырья, не содержащего сбраживаемых сахаров. Сами дрожжи, как правило, не обладают амилазами, поэтому крахмал зерна должен быть сначала гидролизован до олиго- и моносахаридов (осахарен). Традиционно в Европе для пивоварения применяется ячмень, в Америке — кукуруза и на Востоке — рис. При использовании ячменя осахаривание крахмала зерна происходит под действием самих ячменных амилаз. Для их активирования проводят замачивание и проращивание зерен ячменя с последующим высушиванием при разных температурах. Такие пророщенные сухие зерна ячменя называют солодом, которые имеют тем более темный цвет, чем выше была температура сушки — 110, 120 или 140°C. Перед использованием солод размалывают и добавляют к основной массе ячменя $\approx 15\%$ по весу. После замачивания смеси под действием ферментов солода происходит осахаривание крахмала зерна. По достижении определенной концентрации сахаров ферментативные процессы останавливают кипячением и жидкость (пивное сусло) отделяют от осадка фильтрацией. К фильтрату добавляют хмель, придающий ему характерную горечь и предотвращающий рост бактерий. После охлаждения в пивное сусло вносят пивные расы дрожжей (например, *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis*). Это обладающие нужными свойствами варианты пекарских дрожжей, отобранные и поддерживаемые на пивоваренных предприятиях. Различают пивные дрожжи низового брожения, когда био-

масса располагается на дне емкости в виде осадка, и верховые дрожжи, выносящиеся при брожении на поверхность в «шапку пива». Брожение низовых дрожжей происходит при пониженной температуре (12—15°C) в течение 7—10 дней. Для крепких сортов пива типа эля используют более плотное сусло, сбраживаемое верховыми дрожжами за 3—4 дня при более высокой температуре (18—20°C) и с обильным газовыделением. Затем полученное пиво отделяют от клеток дрожжей фильтрацией и закачивают в большие резервуары (танки). Лагерные сорта пива выдерживают там при 4°C от 7 до 60 дней, а остальные сорта разливают в тару для продажи. Иногда для продления срока хранения перед розливом осуществляют «консервирование» продукта путем пастеризации, ультрафильтрации или внесения бензоата, низина и т.д. На бутылках обычно указывается количество градусов Баллинга (11°Б), что соответствует плотности сусла (содержанию в нем сахара) до начала брожения. Если пиво получается «сухое», т.е. весь сахар переработан в спирт (чего почти никогда не бывает), то содержание спирта в готовом продукте можно рассчитать, умножив цифру градусов Баллинга на коэффициент 0,575.

На Востоке сырьем для алкогольсодержащих напитков (саке) является рис, который осахаривают амилазами плесневого гриба рода *Aspergillus*. Споры гриба переносят на увлажненный рис и выращивают мицелий, который пронизывает всю массу зерна. Гриб выделяет внеклеточные ферменты, гидролизующие крахмал риса. По достижении определенной концентрации сахаров в массе зерна начинается брожение под действием естественной микробиоты риса или *S. cerevisiae* var. *sake*. Наряду с дрожжевым спиртовым брожением происходит и образование молочной кислоты молочнокислыми бактериями. Процесс изготовления саке длится до 1 мес., и конечная концентрация спирта в продукте может достигать 18—20%.

Американские индейцы, изготавливая пиво из зерен кукурузы, используют собственную слюну, содержащую амилазы. Они пережевывают кукурузные зерна и выплевывают в емкость с основной массой увлажненных зерен, активируя тем самым осахаривание крахмала. Появление свободных сахаров стимулирует спонтанное спиртовое брожение диких дрожжей.

Более крепкие напитки получают отгонкой спирта из вина или пива. Они различаются начальным субстратом и модификацией отгоночных операций. Например, водки изготавливают путем дистилляции спирта после сбраживания крахмала ржи, пшеницы или картофеля, кукурузный виски (бурбон) — отгонкой спирта после сбраживания кукурузы, коньяк и бренди получают выдерживанием отогнанного виноградного спирта в дубовых бочках, шотландский виски — дистилляцией неохмеленной ячменной бражки. Разные виды крепких напитков содержат различные добавки (например, джин — это водка из спирта, настоянного на ягодах можжевельника, ликеры содержат большое количество сахара и натуральные или синтетические ароматизаторы и т.д.).

Для производства спирта могут использоваться не только пищевые субстраты и отходы пищевых производств, но и техническое сырье, способное подвергаться гидролизу с образованием сахаров, в том числе неферментативному (например, древесные опилки).

17.1.4. Пищевые производства на основе других групп микроорганизмов

Получение уксуса основано на способности уксуснокислых бактерий осуществлять неполное окисление этанола в ацетат. В производстве используют продуцентов рода *Gluconobacter*, у которых ЦТК незамкнут, так как отсутствует дегидрогеназа α -кетоглутарата. Бактерии рода *Acetobacter*, обладающие полным циклом Кребса, могут осуществлять «переокисление» ацетата до H_2O и CO_2 и поэтому их в производстве не используют. Промышленный процесс проходит в колонне с буковыми стружками, на которых адсорбированы клетки бактерий. Сверху сквозь стружки протекает этиловый спирт, а снизу подается кислород. Образованный клетками уксус стекает на дно колонны. Уксус, полученный из спирта, называют столовым, а более ароматные — яблочный, виноградный и другие уксусы — производят из соответствующих вин.

В производстве ряда национальных продуктов используются плесневые грибы. Например, мисо готовят с помощью *Aspergillus oryzae*. Пропаренный полированный рис выкладывают в неглубокие противни и на нем выращивают стартовые культуры. Затем полученную массу смешивают с размолотыми и разваренными соевыми бобами, добавляют соль и выдерживают при температуре 28°C в течение недели, потом при 35°C в течение 2 мес. и еще несколько недель при комнатной температуре. Мисо затем перемешивают до пастообразного состояния и добавляют в качестве приправы к другим блюдам. Индонезийское кушание темпе готовят из соевых бобов, которые замачивают при 25°C, подсушивают и инокулируют спорами различных видов грибов из рода *Rhizopus*. Смесь выдерживают при 32°C в течение 20 ч, чтобы дать прорасти грибному мицелию. Затем продукт подсаливают и перед едой жарят. Тофу (в Японии) и софу (в Китае) — это продукты, получаемые из бобов сои с помощью грибов рода *Mucor*. Бобы замачивают, размалывают до пастообразного состояния, добавляют соли магния и кальция, а также споры грибов. Сформированные после прессования блоки помещают на противни и выдерживают при 14°C в течение месяца для развития грибного мицелия.

Натто готовят из вареных соевых бобов, которые инкубируют с добавлением *Bacillus subtilis* в течение 1–2 дней. При этом бактериальные протеазы размягчают бобовую смесь и придают ей особый вкус.

Микроорганизмы сами могут быть источником пищи для человека и животных, а также добавками к основной диете, так как содержат в клетках все необходимые питательные элементы. Они быстро растут на простом дешевом сырье и эффективно накапливают белок. Белково-витаминные концентраты (БВК), получаемые на основе клеток дрожжей, широко используют в животноводстве. Известны биологически активные добавки (БАД), производимые из клеток цианобактерии *Spirulina platensis*. Для замкнутых систем жизнеобеспечения разработаны технологии наращивания биомассы одноклеточной зеленой водоросли рода *Chlorella* в качестве пищевого ресурса. Микробиологическое производство пищевого белка пока еще обходится дороже, чем выращивание сои, к тому же соевый белок более привычен для потребителя. Дешевым и безопасным сырьем для роста микроорганизмов могут быть отходы пищевых производств, керосиновые

фракции нефти, природный газ или метанол. Они эффективно перерабатываются в биомассу и легко отделяются от конечного продукта в условиях крупнотоннажного производства. Основными группами продуцентов, биомасса которых рассматривается как потенциальный корм для животных или пища для человека, являются дрожжи, плесневые грибы, метилотрофные и водородные микроорганизмы, цианобактерии и микроводоросли.

17.2. Микроорганизмы в производстве индивидуальных веществ и препаратов

Микробиологические процессы играют значительную роль при получении индивидуальных веществ разного назначения (табл. 17.4). С помощью микроорганизмов получают как простые органические и неорганические вещества, так и соединения со сложной структурой, химический синтез которых невозможен или крайне неэффективен и дорог. В качестве продуцентов используются как микроорганизмы, выделенные из естественных мест, так и мутанты и искусственно «сконструированные» штаммы.

Таблица 17.4

Некоторые индивидуальные соединения, получаемые с помощью микроорганизмов

Продукт	Микроорганизм(ы)
Растворители	
Этанол	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Thermoanaerobacter</i> sp. Гомоацетогены
Ацетон, бутанол, изопропанол	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
2,3-бутандиол	Бактерии родов <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i>
Газы	
Водород	Фотосинтезирующие микроорганизмы
Метан	Метаногенные сообщества микроорганизмов
Органические кислоты	
Ацетат	Бактерии рода <i>Gluconobacter</i>
Цитрат	<i>Aspergillus niger</i>
Фумарат	<i>Rhizopus nigricans</i>
Глюконат	<i>Aspergillus niger</i>
Лактат	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Полимеры	
Декстран	Бактерии родов <i>Klebsiella</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Leuconostoc</i>

Продукт	Микроорганизм(ы)
Полимеры	
Ксантан	<i>Xanthomonas campestris</i>
Пуллулан	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Альгинат	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Полиэферы	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
Циклодекстрины	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.
Поли-β-гидроксibuтират	<i>Azotobacter</i> sp., <i>Alcaligenes eutrophus</i>
Ферменты	
Амилазы, протеазы	Грибы родов <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Trichoderma</i> , бактерии рода <i>Bacillus</i>
Пектиназы	Бактерии рода <i>Erwinia</i>
Липазы	Дрожжи, <i>Rhizopus</i> sp.
Оксидазы: Глюкозооксидаза Глутаматоксидаза Лактатоксидаза	<i>Penicillium</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp. <i>Geothrichum</i> sp.
Другие соединения	
Гиббереллины (стимуляторы роста растений)	<i>Gibberella</i> sp.
Антибиотики	Представители родов <i>Penicillium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i>
Алкалоиды	<i>Claviceps purpurea</i>
Аминокислоты (глутамат, лизин)	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Стероиды	Представители родов <i>Rhizopus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Mycobacterium</i>
Нуклеотиды	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Витамины	Грибы родов <i>Ashbya</i> , <i>Eremothecium</i> , <i>Blakeslea</i> , <i>Saccharomyces</i> , бактерии родов <i>Pseudomonas</i> , <i>Propionibacterium</i>
Человеческие гормоны (инсулин, соматостатин, интерферон и др.)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pichia pinus</i> и другие рекомбинантные штаммы
Акриламид	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>

Наряду с химическим синтезом органических кислот и спиртов из нефти на современном этапе разрабатываются и производственные процессы получения этих соединений биотехнологическим путем. Спирты (в основном, этанол) — это традиционные соединения, которые легко получить с помощью

микроорганизмов. Производство спирта может быть основано на использовании пищевых субстратов и отходов пищевых производств, а также технического сырья, которое подвергают гидролизу, в том числе неферментативному, с образованием сахаров. Например, можно получать спирт на древесных опилках, подвергнутых щелочному гидролизу. Новым направлением в биотехнологии спиртов является применение в качестве продуцентов термофильных анаэробных бактерий, обладающих собственными мощными гидролазами. В этом случае достигается значительное ускорение процесса, так как исключается стадия предварительного гидролиза сырья, а повышенная температура культивирования увеличивает скорость реакций. Повышение активности и стабильности процесса получения спирта из растительной массы может быть достигнуто также при использовании устойчивых микробных ассоциаций. Высокий выход конечного продукта возможен при многократном применении иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Для получения некоторых органических кислот используют плесневые грибы, осуществляющие неполные окисления, а ряд аминокислот образуют коринебактерии. L-формы аминокислот можно синтезировать исключительно микробиологическим путем.

Преобразование сельскохозяйственных отходов в **биогаз** (метан в смеси с углекислым газом) осуществляется под действием естественно сложившихся метаногенных микробных сообществ в анаэробных условиях. Такие микробные сообщества основаны на тесных взаимодействиях микроорганизмов разных систематических и физиологических групп. Процесс начинается с гидролиза биополимеров растительного и животного сырья и отходов внеклеточными ферментами клостридий. Далее продукты гидролиза подвергаются брожениям разных типов под действием энтеробактерий, клостридий, МКБ и других бродильщиков с образованием смеси летучих жирных кислот, спиртов и газов. Потом продукты брожения используются бактериями-синтрофами, продуцирующими субстраты метаногенеза (H_2 , CO_2 и ацетат). Завершающая стадия процесса заключается в образовании биогаза метаногенными археями. Переработку отходов сельского хозяйства в биогаз проводят в специальных резервуарах (**метантенках**) при 54–56°C. Загружаемое сырье содержит некоторое количество кислорода, но он быстро используется естественной аэробной и факультативно анаэробной микробиотой сельскохозяйственных отходов. Повышение температуры процесса не только увеличивает скорость переработки, но и способствует обеззараживанию перерабатываемых отходов. Микробиологическая переработка растительного и животного сырья является наиболее эффективным способом уничтожения сельскохозяйственных отходов, сопровождающееся получением полезных продуктов.

Молекулярный водород выделяется при некоторых видах брожения и при азотфиксации. В качестве продуцентов водорода в настоящее время изучают фототрофные микроорганизмы, способные расти при освещении на очень простых средах (например, пурпурные бактерии). Повышение выхода газа может быть достигнуто путем иммобилизации клеток на пористом стекле или внутри гранул различных гелей.

Убеждение в конечности запасов полезных ископаемых и необходимости перехода на возобновляемые источники энергии диктует необходи-

мость разработки производственных биотехнологических процессов получения **биотоплив** (спиртов, органических кислот и газов) наряду с уже имеющимися химическими путями синтеза топлива из нефти. Спирты (в частности, этанол) давно известны как традиционные энергосоединения и легко могут быть получены с помощью микроорганизмов разных групп, использующих различные виды сырья. Применение микробных сообществ способствует повышению активности и стабильности процесса получения биотоплива из растительной массы и других сельскохозяйственных отходов. Как перспективное возобновляемое биотопливо в настоящее время рассматривают молекулярный водород. Метан в смеси с углекислым газом (биогаз) может быть получен при микробиологической переработке растительного и животного сырья в сельском хозяйстве или при уничтожении промышленных и бытовых отходов. Такая конверсия является не только наиболее эффективным способом преобразования отходов, но и сопровождается получением полезных энергопродуктов. Использование микроорганизмов для получения биогаза позволяет комплексно решать проблемы малой энергетики, получения новых возобновляемых энергоресурсов и перехода к безотходным технологиям.

Значительное место микробиологические процессы занимают в фармацевтической промышленности, в первую очередь при производстве витаминов, антибиотиков, ферментов и стероидных гормонов. Сложный по химической структуре витамин B_{12} синтезируют для медицинских целей бактерии родов *Pseudomonas* и *Propionibacterium*. Кормовой препарат витамина B_{12} получают при экстракции осадков метантенков. Витамин B_2 (рибофлавин) в больших количествах образуют фитопатогенные грибы, выделяя его избыток в среду.

Основными продуцентами при производстве антибиотиков служат плесневые грибы рода *Penicillium* и бактерии родов *Streptomyces* и *Bacillus*. Синтез антибиотиков у микроорганизмов происходит после окончания активного роста культуры, причем на состав продукта сильно влияют компоненты среды и условия культивирования. Получение продуцента антибиотика включает не только его выделение из природной среды, но и часто генетическое преобразование. Отбор мутантов с нарушенной регуляцией вторичного метаболизма и применение генно-инженерных методов позволяют в тысячи раз увеличить выход конечного продукта. Для повышения антибиотической активности иногда проводят химическую модификацию полученного продукта. Использование таких полусинтетических антибиотиков — один из путей преодоления множественной лекарственной устойчивости болезнетворных микроорганизмов.

Стероидные гормоны являются регуляторами метаболизма животных и человека, их широко используют в медицине. Выделение из животного сырья не может обеспечить потребности в этих препаратах, так как в животном организме стероидов синтезируется крайне мало. Химический синтез стероидов из растительного сырья (растительных стеринов) оказался очень дорогим и неэффективным, поскольку требовал проведения тонкой трансформации, затрагивающей только один-два определенных атома стероидного ядра (рис. 17.3). В то же время некоторые микроорганизмы способны

специфически отщеплять или присоединять атомы и группы в нужном положении, тем самым превращая низкоактивные стероиды растительного происхождения в гормональные препараты.

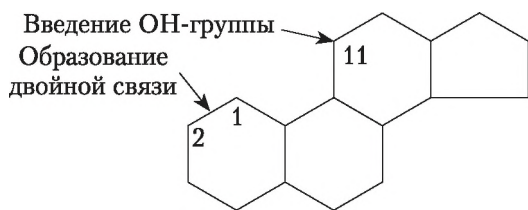


Рис. 17.3. Реакции микробной трансформации стероидного ядра

Так, актиномицеты, микобактерии и коринебактерии применяют для получения преднизолона, а некоторые грибы — для образования кортизона и гидрокортизона. Такие модификации микроорганизмы осуществляют после прекращения роста. Растительные стероиды, нерастворимые в воде, добавляют в культуру в виде тонкодисперсной суспензии, а трансформированные продукты выделяются микроорганизмами в среду. Таким образом, при производстве стероидных гормонов микробиологический процесс используют как одну из стадий синтеза препарата. Перспективны генно-инженерные технологии получения некоторых таких препаратов, когда гены, кодирующие синтез гормонов человека, вводят в геном кишечной палочки или пекарских дрожжей.

Микробные ферменты нашли применение не только в медицине, но и в других отраслях человеческой деятельности. Так, ферменты диастаза, амилаза, протеаза, липаза, целлюлаза, образуемые плесневыми грибами родов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, способствуют пищеварению, стрептокиназа бактерий рода *Streptococcus* и коллагеназа представителей рода *Clostridium* применяются при заживлении ран. Протеазы грибов, стрептомицетов и бацилл добавляют к стиральным порошкам для удаления белковых загрязнений, в пищевой промышленности используют для осветления фруктовых соков пектиназы бактерий рода *Erwinia*, для производства сладостей — диастазу аспергилла и инвертазу пекарских дрожжей.

Ряд таких соединений (органические кислоты, аминокислоты, витамины, ферменты) может быть использован в качестве кормовых добавок, улучшающих структуру и усвоение кормов. С помощью микроорганизмов получают ряд веществ для диагностики и лечения заболеваний (вакцины, сыворотки, антитела, интерферон и т.д.). Для получения вакцин, сывороток и препаратов для животноводства и сельского хозяйства используют как живые ослабленные или видоизмененные возбудители, так и убитые клетки, либо их отдельные части (**антигены**), которые вводят во время прививки в здоровый организм, чтобы с профилактической целью научить его вырабатывать антитела. **Вакцина** — это собственно возбудитель (антиген), а **сыворотка** — это полученные на антиген готовые антитела, вводимые уже заболевшему человеку или животному для быстрого ответа на инфекцию.

Сравнительно новым направлением в медицине и ветеринарии является использование так называемых **пробиотиков**, т.е. культур микроорганизмов,

«дружественных» высшим животным и человеку. Такие препараты, чаще всего содержащие молочнокислые бактерии, применяют для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний разной этиологии. Исследования показывают, что молочнокислые микроорганизмы ингибируют развитие нежелательных бактерий в желудочно-кишечном тракте путем образования молочной кислоты и выработки ряда антибактериальных веществ (низин, бактериоцины), а также препятствуя колонизации эпителия кишечника гнилостными и патогенными микроорганизмами. Молочнокислые бактерии и другие пробиотические виды (родов *Bacillus*, *Escherichia* и др.) помогают поддерживать правильные пути переваривания пищи и способствуют нейтрализации токсических веществ, образуемых некоторыми представителями микробиоты кишечника. Эти свойства наиболее выражены у представителей родов *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*), *Lactococcus* (*L. lactis*), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*). Штаммы микроорганизмов, используемые для биопрепаратов, должны обладать не только высокой и стабильной активностью образования молочной кислоты и антибактериальных метаболитов, но и значительной жизнеспособностью.

Гиббереллины, полученные микробиологическим путем, успешно применяют в сельском хозяйстве для стимуляции роста растений, особенно винограда. Исследования последнего времени показывают перспективность изучения ризосферных микроорганизмов как продуцентов ряда фитогормонов. Препараты для защиты сельскохозяйственных растений создают на основе микроорганизмов-антагонистов фитопатогенных грибов (обычно бактерий родов *Pseudomonas* и *Azotobacter* и грибов рода *Trichoderma*), которые либо вносят в почву, либо обрабатывают ими семена и корни высаживаемых растений. Хорошие результаты показывают препараты на основе псевдомонад, азотобактеров и триходермы. К сожалению, в лабораторных условиях и в природной обстановке активность таких препаратов существенно различается, так как, попадая в почву, вносимые микроорганизмы не всегда способны выдержать конкуренцию с естественной микробиотой почвы. В настоящее время бурно развивается направление по борьбе с вредителями сельского хозяйства биологическими методами. Микробиологическая часть этих методов включает применение бактерий и грибов, вырабатывающих энтомопатогенные субстанции. Например, белковые кристаллы некоторых бацилл (*Bacillus thuringiensis*) вызывают паралич у личинок перепончатокрылых при попадании в их кишечник. Энтомопатогенный препарат представляет собой высушенные клетки бацилл, которые культивируют до начала споруляции, когда образуются белковые кристаллы токсина. Перед применением порошок разводят в воде и распыляют на листья растений. Для защиты растений также используют культуры возбудителей инфекционных болезней насекомых и грызунов, вызывающих эпизоотии среди этих вредителей, но не патогенных для других животных.

Биопрепараты комплексного действия на основе микроорганизмов рассматриваются как заменитель химических препаратов (минеральных удобрений, пестицидов и т.д.) в традиционном земледелии. Во многих странах используют препараты клубеньковых бактерий для предпосевной обработки семян бобовых растений. Наиболее эффективен этот прием

в случае посева культур бобовых на вновь осваиваемых площадях, так как позволяет обеспечить тесный контакт потенциальных симбионтов. Это обеспечивает быстрое образование клубеньков и активную симбиотическую азотфиксацию. Обработка семян препаратами для посева давно возделываемых бобовых культур на прежних площадях также дает прибавку к урожаю за счет обеспечения контакта растения с высокоактивными видоспецифичными штаммами клубеньковых бактерий. Применение таких биопрепаратов позволяет не только снизить дозы минеральных азотных удобрений, но и повышает содержание белка и витаминов в зерне бобовых. Препараты на основе клубеньковых бактерий имеют разные названия (нитрагин, нитразон, ризоторфин и др.), но при их приготовлении используют стерильные или нестерильные носители (почва, торф), содержащие необходимые питательные вещества. В них вносят суспензию клубеньковых бактерий, иногда выдерживают препарат в термостате для подраживания культуры, а затем фасуют в тару различного объема. Перед посевом препарат разводят водой и обрабатывают им семена.

Использование в качестве биопрепаратов связанных с корнями культур микроорганизмов обусловлено не только их способностью к ассоциативной азотфиксации, но и выработкой биологически активных по отношению к растениям веществ (стимуляторов роста, витаминов, антибиотических соединений, активных против фитопатогенных микроорганизмов). Для приготовления препаратов используют чистые или смешанные культуры представителей родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и др. Водной суспензией препарата обрабатывают поверхность семян либо корневую систему растений. Как правило, положительные результаты применения препаратов дает на хорошо окультуренных, богатых органикой почвах (в теплицах, оранжереях). В настоящее время предлагается широкий спектр препаратов под разными названиями и на основе разных микроорганизмов (азотобактерин, азоризин, агрофил, мизорин, ризоагрин, псевдобактерин и т.д.).

Цианобактериальные препараты применяют в ряде стран на обводненных и затопляемых почвах, например, при выращивании риса. Массу цианобактерий получают в специальных бассейнах, внося туда маточную культуру (обычно это представители родов *Anabaena* и *Nostoc*). В некоторых странах Азии в качестве «зеленого удобрения» используют водный папоротник азолла, несущий на листьях симбиотического диазотрофа *Anabaena azollae*. Размножают растение в небольших водоемах, а потом запахивают в почву рисовников либо переносят на поверхность воды рисовых полей. Отмирающая масса папоротника разлагается, и соединения азота становятся доступными растениям риса.

Ряд биопрепаратов применяют для активизации микробиологических процессов в почвах. Это, например, фосфобактерин на основе спор *Bacillus megaterium* для повышения доступности фосфора для растений; бактогумин, содержащий смешанную культуру микроорганизмов разных физиологических групп, для изготовления биологически активных грунтов; комплексные биопрепараты почвенных бактерий для применения под овощные и плодовые культуры, в основном, в защищенном грунте и т.д.

Многие микробные полисахариды находят применение в промышленности, медицине и научных исследованиях в качестве загустителей, смазочных материалов, гелей для иммобилизации, молекулярных сит и сорбентов. Природные термопластики (поли- β -гидроксимасляная кислота) рассматриваются как добавки в полимерные упаковочные материалы, способствующие более быстрому микробному разложению таких отходов. С помощью микроорганизмов получают также вещества для научных исследований (НАДН, НАДФН, цитохромы, убихиноны, пигменты и т.д.).

17.3. Другие непищевые производства с участием микроорганизмов

17.3.1. Получение органических удобрений. Компостирование

В настоящее время наиболее используемыми в сельском хозяйстве органическими удобрениями являются навоз, компост и резка соломы. Свежий навоз, образуемый в значительных количествах в животноводческих комплексах, используется на высокотехнологичных сельскохозяйственных предприятиях с интенсивными методами земледелия. Этот вид удобрений применяют непосредственно «из-под скота» путем гидросмыва («жидкий навоз») как экологически безопасное и не требующее площадей для хранения средство. Содержание сухих веществ в таком навозе близко к обычному, а вода составляет 90–98%. В свежем навозе содержится значительное число микроорганизмов, связанных с желудочно-кишечным трактом животных: преобладают кокки, участвующие в начальных стадиях процесса гниения, много неспоровых энтеробактерий и псевдомонад, осуществляющих аммонификацию. Среди спорообразующих бактерий преобладают бациллы — *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* и др. Существенное место занимают представители родов *Cytophaga*, *Cellvibrio* и *Clostridium*, способных разлагать целлюлозу. В навозе присутствуют микроорганизмы, имеющие разные температурные оптимумы роста, нитрификаторы и денитрификаторы. При внесении «жидкого навоза» в почву активизируется как естественная почвенная микробиота, так и микроорганизмы самого навоза. Проблемой применения такого вида удобрения является возможное наличие в свежем навозе патогенных микроорганизмов, способных в конечном итоге попадать на сельскохозяйственные растения. Использование зелени, овощей и фруктов в свежем виде иногда приводит к возникновению пищевых отравлений и инфекционных заболеваний человека.

При хранении навоза активность и длительность микробных процессов в нем зависит от условий и способа хранения. При холодном способе навоз уплотняют в изолированных от воздуха, забетонированных помещениях, в которых поддерживают температуру не выше 40°C. Микробиологические процессы в этом случае протекают медленно. Развиваются неспорообразующие мезофильные бактерии-сапротрофы, преимущественно группы кишечной палочки и псевдомонады. Количество кокков в навозе постепенно уменьшается, незначительную численность имеют бациллы, грибы и актиномицеты. Преимущественно в верхнем слое навоза активно протекают процессы аммонификации, распада мочевины, нитрификации, разру-

шения целлюлозы. При горячем способе навоз укладывают в хранилище постепенно, слоями. Каждый новый слой выдерживают 2–4 дня в рыхлом состоянии, при этом температура навоза поднимается до 60–70°C. После этого слой уплотняют и на него укладывают следующий. Скорость микробных процессов при таком способе хранения увеличивается. На начальной стадии отмечается усиленный рост аэробных мезофильных неспоровых бактерий, грибов и актиномицетов. Как только кислород исчерпан и поднялась температура, преимущество получают грамположительные термофильные и термотолерантные спорообразующие бациллы и клостридии. Мезофильные микроорганизмы отмирают или переходят в покоящиеся формы. При хранении азотсодержащие органические и неорганические соединения постепенно превращаются в аммиак, который при повышенной температуре улетучивается из навоза. Потери азота происходят также из-за активизации и последовательного протекания процессов нитрификации и денитрификации. Для уменьшения потерь азота в массу вносят различные поглотители аммиака (торф, гипс и т.д.). В навозе при созревании происходит преобразование растительных остатков в гумус, медленно разлагающийся в почве и длительно обеспечивающий сельскохозяйственные культуры. При разложении полисахаридов навоза (целлюлозы, пектина и др.) и сбраживании образовавшихся соединений происходит потеря углерода в виде газов, а соотношение C : N уменьшается. Содержание сухого вещества в навозе при созревании снижается на 20–40%.

В традиционном земледелии большинство органических остатков превращается в органические удобрения в результате компостирования. **Компостирование** — это увеличение скорости природного разложения отмершего органического вещества до простых соединений. Органические отходы смешивают с порцией старого компоста (в качестве «посевного материала») и с органическими веществами, которые перерабатываются медленно (щепа, нарезанная бумага, подсолнечная шелуха), для создания рыхлой структуры и большей вентиляции. Компостирование осуществляют в длинных, но не очень высоких (до 2 м) грядах, которые время от времени перемешивают для более равномерного прохождения процесса. Накрывая компостные кучи слоем почвы, предотвращают появление неприятного запаха сероводорода и меркаптанов. Компостирование начинают мезофильные хемогетеротрофы. Их дыхание приводит к разогреву компостной кучи, вследствие чего мезофилы замещаются термофильными микроорганизмами. Происходит гидролиз полимеров и превращение мономеров в CO₂ и H₂O. Разогрев кучи может достигать до 76–80°C. Такие высокие температуры способствуют уничтожению болезнетворных микроорганизмов, яиц гельминтов и семян сорных растений, однако максимальная активность термофилов наблюдается при температуре от 60 до 65°C. Аэрация, увлажнение и перемешивание компоста предотвращают его перегрев. Перемешивание не только делает конечный продукт более однородным, но и позволяет термофильным микроорганизмам использовать все органические вещества кучи (в противном случае термофильный процесс шел бы только в центре компостной кучи). Часто при перемешивании возникает вторая и даже третья волна подъема температуры компостируемого

материала. В конце концов температура компоста снижается, и мезофилы вновь становятся преобладающей популяцией. Мезофильный процесс, часто длящийся несколько месяцев, завершает компостирование и превращает органические отходы в превосходное органическое удобрение. Наиболее важными микроорганизмами, участвующими в компостировании, являются *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermocellum*, *Pseudonocardia thermophila*, *Thermomonospora* spp. и *Thermoactinomyces* spp. Важную роль играют и грибы родов *Geotrichum*, *Aspergillus* и *Mucor*.

В последние годы при компостировании (после термофильной фазы) применяют круглых земляных червей (красных калифорнийских червей *Eisenia foetida*). Процесс носит название вермикомпостирование. Подобно обычному компостированию, этот процесс требует аэрации, защиты от вредного влияния окружающей среды, поддержания оптимальной температуры и влажности. Необходимо перемешивание и добавление свежего компоста после переработки червями старого. Преимуществами вермикомпостирования являются полностью естественный процесс переработки органического вещества, минимальные затраты труда и ресурсов, снижение уровня патогенных микроорганизмов и семян сорняков, образование ценного готового органического удобрения.

Применение соломы в качестве органического удобрения приводит к обогащению почвы гумусом. Солому нарезают и запахивают в почву, причем чем ниже температура и влажность, тем мельче должна быть заделка в почву. Высокое соотношение C : N в соломе стимулирует процесс микробной азотфиксации в почве. Недостаток азота сразу после заделки соломы может быть восполнен внесением азотных удобрений. При разложении соломы почвенными микроорганизмами выделяются значительные количества углекислого газа, благотворно влияющего на растения. В то же время необходим определенный период времени между внесением соломы в почву и посевом семян, чтобы произошло микробное разложение токсичных для растений соединений, содержащихся в соломе.

17.3.2. Биологические топливные элементы.

Получение электричества с помощью микроорганизмов

Биологические топливные элементы (БТЭ) подразделяют на два типа с разными принципами функционирования. **Микробные топливные элементы (МТЭ)** — это пример микробной биоэлектрической системы, которая превращает энергию, содержащуюся в химических связях органических молекул, в электрическую энергию через посредство микроорганизмов. Этот тип БТЭ предполагает непосредственное участие различных бактерий в разложении органических субстратов в анаэробных условиях с передачей электронов на анод, т.е. осуществление варианта анаэробного «железного» дыхания. В ферментных топливных элементах (ФТЭ) в анодном пространстве происходит **брожение** (маслянокислое и ацетонобутиловое, смешанное, муравьинокислое и т.д.) с выделением водорода, который улавливается иммобилизованной **гидрогеназой** (поглощающей), разлагающей его на протоны и электроны. Электроны поступают на анод и по электрической цепи передаются на катод. В обоих типах топливных

элементов протоны транспортируются через селективную, непроницаемую для кислорода, однако хорошо и быстро переносящую протоны, мембрану в катодное пространство, где на катодном электроде (обычно, платиновом) соединяются с кислородом, образуя воду. Такая электрическая цепь может служить источником энергии для питания потребителей.

Принципиальная схема МТЭ представлена на рис. 17.4, а. В анодной камере происходит окисление органических веществ (органических отходов) микроорганизмами с образованием электронов и протонов. Электроны передаются на анод и по электрической цепи поступают на катод. Образованные в анодной анаэробной камере протоны транслицируются в аэробную катодную камеру, где с помощью катодного электрода восстанавливают кислород с образованием воды, замыкая электрическую цепь с потребителем (например, электрической лампочкой). Таким образом, кислород в этой цепи переноса электронов и протонов становится конечным акцептором.

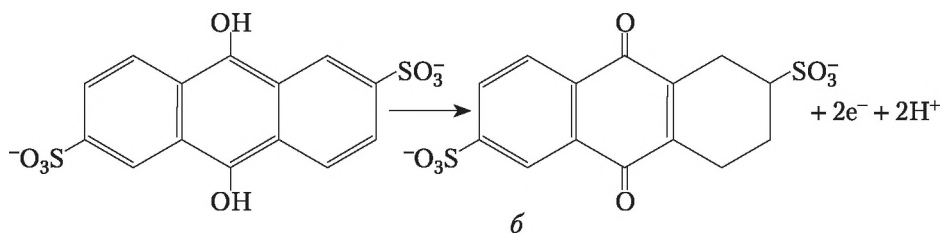
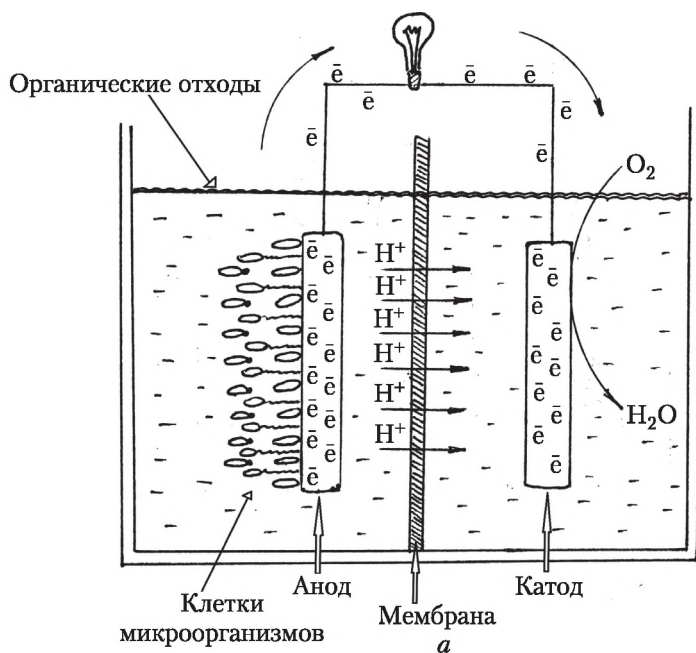


Рис. 17.4. Функционирование МТЭ:

а — схема; б — уравнение окисления на анодной поверхности антрахинон-2,6-дисульфоната, действующего как медиатор

Процесс получения энергии за счет анаэробного дыхания известен с 1911 г., когда М. Поттер (Великобритания) продемонстрировал получение электричества с помощью живых клеток бактерий *E. coli* и дрожжей *Saccharomyces* sp. на платиновом электроде. Позднее было установлено, что добавление различных химических переносчиков электронов (**медиаторов**) существенно ускоряет передачу электронов от клеток на электрод. Окисленные формы медиаторов входят в клетку, восстанавливаются в ней от компонентов ЭТЦ (НАДН, восстановленных флавинов, хинонов, цитохромов), а затем диффундируют из клетки к электроду и окисляются на нем, преодолевая непроводящие слои внешних оболочек микробных клеток (липидные мембраны, пептидогликан, липополисахариды), которые препятствуют прямому переносу электронов из клетки на анод. Окисленные медиаторы затем вступают в новый цикл переноса.

Используемые в МТЭ медиаторы должны свободно перемещаться через клеточные оболочки, вступать в окислительно-восстановительные реакции, легко окисляться на электроде, обладать высокой растворимостью и стабильностью, быть нетоксичными для микроорганизмов и относительно дешевыми. Таким требованиям соответствуют как синтетические, так и натуральные медиаторы. Группа синтетических медиаторов включает красители и органометаллические соединения, такие как нейтральный красный, метиленовая синь, тионин, фиолетовый Лаута, 2-гидрокси-1,4-нафтохинон и Fe^{3+} -ЭДТА. В одном из исследований с использованием медиаторов и клеток *E. coli* было показано, что с нейтральным красным был получен ток в 3,5 мА, а с тионином — только 0,4 мА. Широкое применение синтетических медиаторов значительно сдерживает их высокая токсичность и нестабильность. Некоторые микроорганизмы способны использовать в качестве редокс-переносчиков природные соединения, в том числе микробные метаболиты (эндогенные медиаторы). К таким соединениям относятся гуминовые кислоты, антрахинон, сульфиды, пиоцианин и т.п. (рис. 17.4, б). Если в МТЭ применяют бактерии, не способные передавать электроны непосредственно на анод (*Actinobacillus succinogenes*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*), то участие медиаторов в процессе становится совершенно необходимым.

Значительный шаг вперед в разработке МТЭ был сделан с открытием электроактивных микроорганизмов, которые образуют биопленки на поверхности анода и могут при анаэробном дыхании использовать эту поверхность как конечный акцептор электронов. Это необычное свойство было названо анодофилией, а соответствующие бактерии — анодофилами. В настоящее время наиболее изученными из них являются *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens* и *Rhodospirillum rubrum*. Изучение процесса переноса электронов на поверхность анода показало, что бактерии родов *Shewanella*, *Rhodospirillum* и *Geobacter*, принадлежащие к группе металл-восстанавливающих микроорганизмов, получают энергию в виде АТФ при анаэробном окислении органики, сопровождаемом диссимиляционным восстановлением оксидов металлов в осадках и металлических конкрециях. Электроны переносятся клеткой на нерас-

творимый твердый акцептор (например, Fe_2O_3) при прямом контакте клетки с поверхностью металла. В МТЭ терминальным акцептором служит анод, замещая природные оксиды металлов. Для представителей родов *Shewanella* и *Geobacter*, взаимодействующих с оксидами железа и марганца, процесс переноса электронов сопровождается восстановлением электрон-транспортных белков (в основном, цитохромов типа *c*) в периплазме клеток, затем происходит передача электронов другим цитохромам *c* или хинонам, которые расположены на внешней мембране, а они уже, в свою очередь, могут транспортировать электроны на Fe (III), Mn (IV) или на природные медиаторы.

Другим способом переноса электронов на нерастворимые металлы или твердые анодные поверхности служат электропроводные пили (**нанопровода**), которые обнаружены у некоторых видов микроорганизмов, способных к анаэробному дыханию. Было доказано, что экспрессия структурного белка пилей PilA в нескольких штаммах рода *Geobacter* значительно увеличивает проводимость биопленок. Выделенный и очищенный белок пилей обладал такой же электропроводностью, что и природная микробная биопленка.

Ключевой реакцией преобразования энергии в МТЭ является редокс-реакция медиатора или терминального микробного цитохрома и анода. В случае использования клетками медиаторов формируемый анодный потенциал зависит от разницы концентраций восстановленной и окисленной формы медиатора. В случае использования клеток *G. sulfurreducens* и *R. ferrireducens*, не нуждающихся в медиаторах, анодный потенциал зависит от соотношения восстановленной и окисленной форм терминальных цитохромов. Поэтому теоретически потенциал МТЭ можно подсчитать, используя уравнение Нернста, и его значение может изменяться от нескольких сотен до 1000 мВ.

Эффективность работы МТЭ может в значительной степени улучшить использование более эффективных материалов для формирования поверхности анода. Так, например, платиновые электроды более эффективны, чем графитовые, но их цена во много раз выше.

В качестве протонпереносящей мембраны чаще всего используют нафион (Дюпон, США), имеющий самую высокую селективность по протонам и практически непроницаемый для кислорода. Критическим фактором для эффективности системы в целом является соотношение поверхности мембраны к объему МТЭ.

В настоящее время МТЭ применяют в ряде областей. Так, долговременное использование МТЭ продемонстрировано в морях для питания плавающих метеорологических датчиков, которые измеряют pH, температуру, скорость ветра и другие параметры и передают их на базу. При этом один электрод МТЭ погружен в анаэробный морской ил, а другой находится в аэробной водной зоне близко к поверхности. Эта система генерирует разность потенциалов, достаточную для питания датчика в течение нескольких месяцев, а сам датчик длительное время не требует ремонта или профилактики.

Британскими учеными из университета Западной Англии разработан робот, который может автономно существовать за счет получения энер-

гии от МТЭ. Первая модификация робота, названная EcoBot I, использовала МТЭ, работающий на сахарозе. Энергия запасалась в конденсаторах, и робот функционировал в пульсирующем режиме. Вторая модификация робота EcoBot II была снабжена восьмью МТЭ, обеспечивающими связь, сенсорiku и работу компьютера. Для получения энергии в МТЭ был использован хитин обычных домашних мух, которые, привлекаемые феромонами, попадали в ловушки со специальными насосами. Для поддержания энергии робота на протяжении 5 дней было достаточно восьми мух среднего размера. Применение таких роботов перспективно в удаленных, сильно загрязненных или опасных местах, так как они могут автономно функционировать в течение длительного времени там, где не может присутствовать человек.

Еще в 1991 г. было предложено использовать МТЭ для обработки **сточных вод**, причем полученная при этом энергия составила бы половину той энергии, что потрачена на очистку загрязненных органическими отходами сточных вод. Один из пионеров изучения и конструирования МТЭ профессор Д. Лавли из Массачусетского технологического института подсчитал, что применение МТЭ для очистки муниципальных органических отходов Нью-Йорка принесло бы столько энергии, что ее хватило бы на полную независимость мегаполиса от электроэнергии, получаемой извне. Применение МТЭ позволяет также более полно проводить процесс анаэробной переработки органических отходов, превращая большую их часть в CO_2 и H_2O .

На кафедре микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова созданы и испытаны МТЭ, обрабатывающие сточные воды с органическими отходами с одновременной генерацией электрической энергии (рис. 17.5).

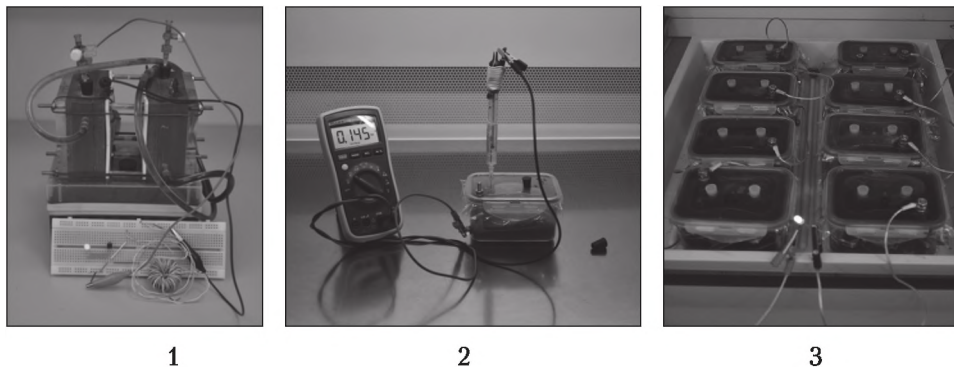


Рис. 17.5. Фото некоторых модификаций МТЭ, созданных в МГУ:

1 — двухкамерный МТЭ; 2 — однокамерный МТЭ с определением напряжения вольтметром; 3 — батарея из восьми однокамерных МТЭ с горящей светодиодной лампой на переднем плане

Принципиальное отличие **ферментных топливных элементов (ФТЭ)** от других способов аккумуляции энергии, например, получения горючих газов метана и водорода, заключается в том, что энергия химических связей преобразуется в электроэнергию, минуя стадии получения, очистки, хранения и транспортировки газов. Вместо длительной и не всегда безо-

пасной технологии получения водорода (этот газ чрезвычайно опасен) при обработке органических отходов получают электричество, которое безопасно и эффективно можно запасть (с помощью аккумуляторов), использовать (например, в электродвигателях) и передавать. Такая технология гораздо более выгодна и экологически более привлекательна по сравнению с другими способами получения и использования **возобновляемой энергии**. Принципиальная схема работы ФТЭ приведена на рис. 17.6. В анодной камере происходит сбраживание органических отходов с образованием молекулярного водорода, который улавливается иммобилизованной на углеродной ткани гидрогеназой, разлагающей его на протоны и электроны. Электроны по электрической цепи переносятся к катоду в аэробной камере, где они взаимодействуют с протонами и кислородом, образуя воду. Протоны передаются в катодную камеру через нафионовую мембрану.

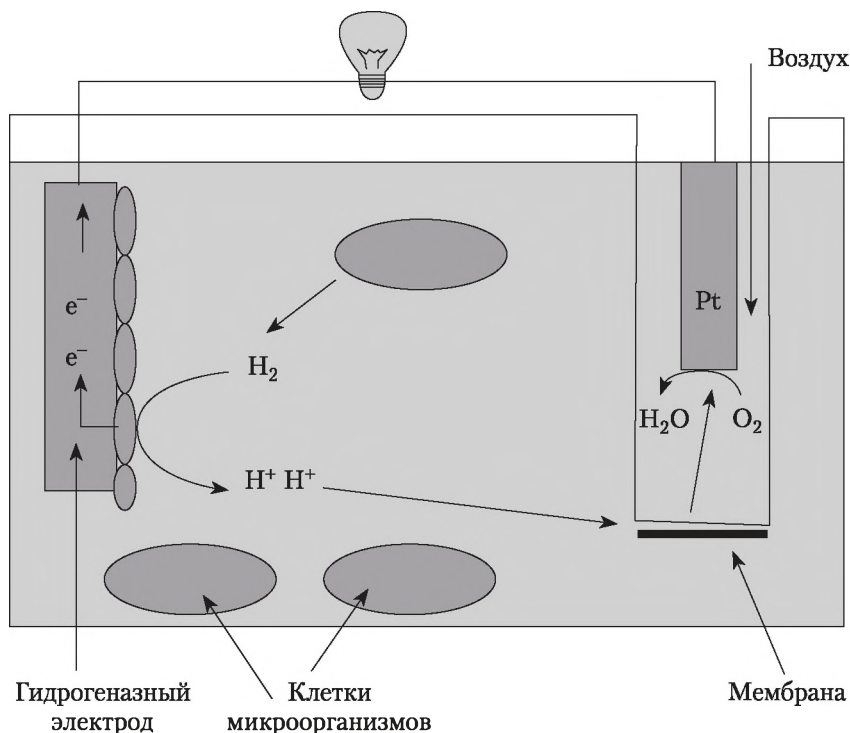


Рис. 17.6. Принципиальная схема работы ФТЭ

На кафедре микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова работа по созданию ФТЭ началась с выделения эффективного термофильного анаэробного микробного сообщества, сбраживающего целлюлозу при 60°C с образованием водорода, CO_2 и органических кислот. В культуральную жидкость сообщества был помещен ферментный электрод с иммобилизованной гидрогеназой (поглощающей), которая эффективно улавливала образованный водород и разлагала его на протоны и электроны (рис. 17.7). Гидрогеназа фототрофной пурпурной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* штамм BBS была иммобилизована сотрудниками кафедры электрохимии

МГУ. При иммобилизации она была специальным образом ориентирована на электропроводной углеродной ткани. Электроны с помощью гидрогеназы передавались на анодный электрод и поступали в электрическую цепь.

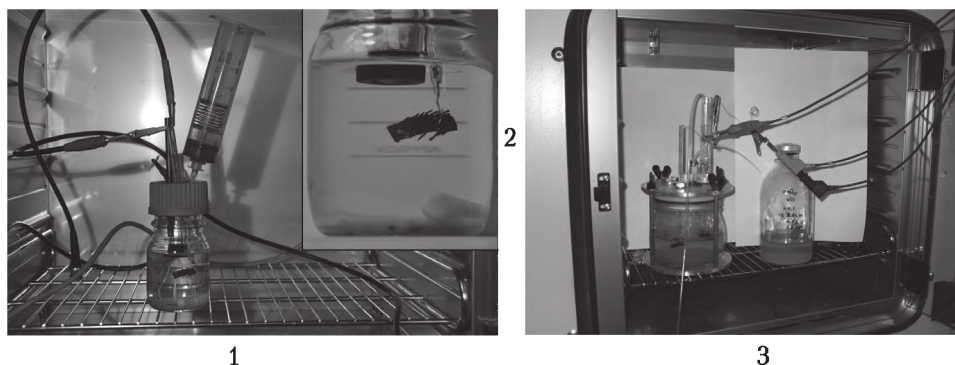


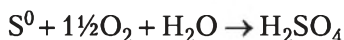
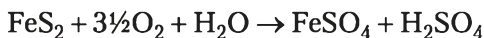
Рис. 17.7. Фотографии внешнего вида двух прототипов ФТЭ, созданных в МГУ имени М. В. Ломоносова:

1 — внешний вид первого прототипа анаэробного ферментера с введенным гидрогеназным электродом; 2 — увеличенный вид гидрогеназного электрода на основе углеродной ткани (катод ФТЭ); сверху снимка видна катодная камера ФТЭ, отделенная протонпереносящей мембраной; 3 — второй прототип ферментера с введенным электродом и устройством, позволяющим контролировать pH системы

Основным достоинством созданного ФТЭ является значительная жизнеспособность ферментного гидрогеназного электрода. При работе ферментера в течение 900 ч (37 сут.) в непрерывном режиме сбраживания целлюлозы с периодической подпиткой субстратом и отводом образованной культуральной жидкости при контроле pH эффективность работы гидрогеназы снижалась лишь на 70%. После завершения эксперимента и регенерации электрода активность фермента восстанавливалась почти до 90%, и электрод вновь готов к работе. Работа по совершенствованию ферментного электрода и ФТЭ в МГУ продолжается.

17.3.3. Микробное выщелачивание металлов из бедных руд

Для извлечения ценных металлов из бедных руд (**выщелачивания**) применяют способность некоторых микроорганизмов окислять восстановленные соединения серы и металлов. Химические реакции, происходящие с помощью микробной активности в условиях принудительной аэрации, приводят к переходу металла (Me) в растворенное состояние:



Полученный раствор концентрируют и осаждают из него металл. В технологических условиях процесс проходит под действием микробного сообщества, включающего грамотрицательные ацидитиобациллы и лептоспириллы, грамположительные сульфобациллы и археи родов *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Sulfolobus* и *Ferroplasma*. В зависимости от условий один или несколько штаммов в сообществе численно преобладают. Все участвующие в процессе микроорганизмы обладают устойчивостью к высоким концентрациям металлов.

В биогидрометаллургии извлечение (выщелачивание) металлов с помощью микроорганизмов осуществляют тремя основными способами. При кучном выщелачивании отвал бедной руды орошают аэрируемой суспензией микроорганизмов. Из стекающего с кучи раствора осаждением или электролизом извлекают металл, а раствор вновь направляют на орошение руды. При чановом выщелачивании сложные руды и концентраты перерабатывают в специальных установках, обеспечивающих непрерывный проточный режим. При подземном (*in situ*) выщелачивании обогащенную кислородом суспензию микроорганизмов закачивают в скважину. Микробиологические процессы используют при получении меди, урана, марганца, а также для освобождения олова, серебра и золота из кристаллов сульфидных минералов, содержащих мышьяк. Те же микробные процессы можно применять и при извлечении металлов из различных отходов.

17.3.4. Мочка волокнистых растений

Вымачивание волокнистых растений используется человеком с давних времен. Целлюлозные волокна льна, джута, конопли и др. отделяют друг от друга путем микробного разложения пектина. Стебли растений погружают в чаны с водой для набухания и экстракции водорастворимых веществ. На первой стадии происходит размножение аэробных микроорганизмов, которые используют кислород и соединения, растворенные в воде. На поверхности жидкости в чане могут развиваться дрожжи и плесневые грибы. После исчерпания кислорода в воде начинается размножение факультативно анаэробных энтеробактерий, осуществляющих смешанное брожение с образованием смеси органических кислот и газов. На основной стадии процесса развивающиеся анаэробные клостридии, образующие внеклеточные гидролазы, расщепляют пектин. При этом происходит постепенное замещение доминирующего вида *C. pectinovorum* на более кислотоустойчивый *C. felsineum*. Условия: 32–38°C в течение 3–5 сут. Иногда для ускорения процесса в чан вносят споры пектинолитического микроорганизма *C. felsineum*.

При аэробной мочке льна и других растений практикуют предварительный гидролиз пектиновых веществ до смеси летучих жирных кислот, сахаров, метанола и галактуроновых кислот аэробными микроорганизмами, а затем полное окисление этих соединений бактериями и грибами.

17.3.5. Микроорганизмы как инструменты и объекты научных исследований

Микроорганизмы могут использоваться в качестве биосенсоров и тест-систем. **Биосенсор** — это гибридный прибор, где живые организмы (орга-

неллы, ферменты) связаны с электродами, и биологическая реакция преобразуется в электрический ток. Биосенсоры применяют при определении различных индивидуальных веществ, загрязнителей, для контроля газов и жидкостей в медицине, сельском хозяйстве, в экологических исследованиях и на различных производствах. Примером может служить биосенсор на основе люциферазной системы светящихся бактерий, который позволяет оценить степень загрязненности (токсичности) пробы по угасанию свечения. В то же время при проверке пищевых продуктов, воды и почвы на пригодность к использованию выявление тех или иных групп микроорганизмов (санитарно-показательных микроорганизмов) само служит тестом на безопасность.

Микроорганизмы служат удобной моделью для изучения фундаментальных жизненных процессов, так как при малых размерах, быстром размножении и простой организации они являются полноценными организмами с широчайшим набором возможностей метаболизма и условий существования. Многие закономерности, установленные на микробных клетках, оказались справедливыми и для клеток высших организмов. Микроорганизмы достаточно легко подвергаются «конструированию», и поэтому их широко используют как объекты генно-инженерных разработок. При создании замкнутых систем жизнеобеспечения, когда продукты жизнедеятельности перерабатываются, являясь питательным субстратом для микроорганизмов, производящих пищевой и кормовой белок и кислород для дыхания, применяют различные физиологические группы микроорганизмов (фототрофы, гидролитики, бродильщики, метилотрофы, метаногены и т.д.).

17.4. Роль микроорганизмов в переработке отходов и очистке окружающей среды от загрязнений

17.4.1. Классификация загрязнений. Ксенобиотики и возможности их разрушения микроорганизмами

Традиционно загрязнения подразделяют на несколько групп: неорганические, газообразные, органические и биологические. К первой группе относятся металлы, радионуклиды, анионы и др. Минеральные соединения лимитирующие рост живых клеток биогенных элементов, внесенные в экосистемы в избыточном количестве, будут считаться неорганическими загрязнителями. Так, фосфор и азот — основные элементы, которые ограничивают рост растений в водоемах. При их повышенном внесении в водные системы начинается неконтролируемый рост водных растений, водорослей и цианобактерий. После отмирания этих организмов находящаяся в водной толще микробиота разлагает мертвую массу и быстро поглощает при дыхании доступный кислород. Это приводит к замору водных животных, особенно рыб, не способных переносить низкие концентрации растворенного кислорода. В водоемах, окруженных городскими и сельскими постройками, соединения азота и фосфора обычно привносятся с поверхностными водами, несущими удобрения с сельскохозяйственных угодий, с бытовыми и промышленными сбросами. В недавнем прошлом в моющих средствах

для связывания катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , придающих воде жесткость, широко применяли фосфаты. Сейчас в развитых странах это законодательно ограничено. В сточных водах после их обработки строго контролируют уровень фосфора и при необходимости осаждают фосфаты химическими соединениями. К газообразным загрязнениям относят углекислый газ, метан, оксиды азота и серы, а также летучие органические вещества (например, фреоны). Накопление метана и углекислого газа в атмосфере приводит к «парниковому эффекту». Летучие неорганические и органические вещества опасны как очень реакционноспособные соединения, повреждающие различные материалы и взаимодействующие с кислородом и озоном воздуха. При попадании через органы дыхания они могут вызвать отравления человека и животных. Для их удаления из выбросов промышленных предприятий используют микробные **биофильтры** на основе иммобилизованных клеток. Биологическое загрязнение различными патогенами (прионами, вирусами, бактериями, грибами, простейшими и др.) происходит при попадании в природные системы неочищенных сбросов медучреждений, ветеринарных лечебниц, предприятий, обрабатывающих животное сырье, при авариях на канализационных сооружениях и т.д. К органическим загрязнениям относят канализационные, бытовые, сельскохозяйственные отходы и промышленные сбросы.

По своим физико-химическим свойствам все загрязнения делятся на летучие и нелетучие, твердые, полужидкие и жидкие, растворимые и нерастворимые в воде. **Жидкие органические отходы** — это сточные воды бытовых, сельскохозяйственных и промышленных предприятий, к **полужидким** относятся полужидкий навоз и осадки сточных вод, а **твердые** формируются из бытового мусора и подстилочного навоза. Обработка сточных вод заключается в практически полном удалении из них органического вещества. В полужидких и твердых отходах удаляется прежде всего быстро разлагаемая часть органических соединений, а оставшаяся часть стабилизируется.

Человек для своих нужд синтезировал химическим путем огромное количество чуждых природе соединений (**ксенобиотиков**). Эти соединения специально создавались как устойчивые во внешней среде вещества. Однако из-за своей устойчивости они накапливаются в природных эконисах и распространяются по пищевым цепям. Ксенобиотики часто обладают высокой негативной биологической активностью: вызывают мутации, образование злокачественных опухолей, являются аллергенами. Важные биогенные элементы, входящие в трудноразлагаемые вещества, надолго выводятся из глобального круговорота. Загрязнителями могут быть и природные соединения, полученные в сверхколичествах и перемещенные в несвойственные им места (например, нефть). В ряде случаев нарушения в природных экосистемах связаны не с токсичностью загрязняющего вещества, а с его избытком как источника питания. Применение таких веществ-загрязнителей практически во всех областях человеческой деятельности не позволяет отказаться от их использования на современном этапе. Поэтому первоочередной задачей становится очистка окружающей среды от антропогенных загрязнителей. Самоочищение природных экосистем

происходит в основном за счет деятельности микроорганизмов. Они разрушают многие сложные природные вещества и ксенобиотики и тем самым возвращают основные питательные элементы в глобальный цикл. Так, почвенные актинобактерии способны разрушать широкий спектр соединений, включая лигноцеллюлозу, кератин, хитин, углеводороды и трудноразлагаемые ксенобиотики. Родоккокки могут использовать замещенные ароматические вещества и линейные углеводороды. В последние десятилетия накопление в биосфере устойчивых загрязнителей приобрело угрожающий характер и превысило природную самоочищающую способность. Поэтому микробиологи ищут микроорганизмы для целенаправленного применения в процессах очистки окружающей среды. Особые надежды связаны с тем, что микроорганизмы обладают разнообразными метаболическими возможностями и способны быстро подстраиваться под меняющиеся условия и неизвестные субстраты. Глубина **биоразрушения (биodeградации)** зависит от химической структуры, наличия тех или иных биологических активностей у микроорганизма, а также от условий окружающей среды. Химическая природа ксенобиотиков чрезвычайно разнообразна: это линейные и разветвленные углеводороды, ароматические соединения с различными заместителями, гетероциклы, конденсированные циклические структуры и полимеры. Микробное воздействие на вещество может приводить к его **трансформации** (незначительным изменениям молекулы), **фрагментации** (расчленению ее на части) или **полной минерализации** (превращению в самые простые вещества — воду, углекислый газ, аммиак, сероводород, метан, водород и т.д.). В разрушении сложных, устойчивых веществ важны процессы **синтрофии**, когда соединение разлагается совместными усилиями нескольких микроорганизмов. В ряде случаев сам ксенобиотик не может использоваться как источник питания. Тогда его преобразование происходит за счет кометаболизма, как бы заодно с использованием доступного для получения энергии и поддержания жизнедеятельности вещества.

17.4.2. Способы микробиологической переработки отходов.

Основные принципы и показатели

В настоящее время наиболее прогрессивной считается биологическая переработка органических отходов, в том числе ксенобиотиков, с участием микроорганизмов, так как их широкие метаболические возможности не только позволяют удалять вредные загрязнители безопасным для природы способом, но при этом еще получать полезные продукты (газы, металлы, растворители и т.д.). В современных процессах очистки, в основном, применяют естественно складывающиеся микробные сообщества. Видовой состав таких сообществ и взаимодействие микроорганизмов в них изучены недостаточно, что не позволяет в достаточной мере сделать процесс управляемым.

В настоящее время активно используют аэробные процессы, позволяющие с высокой скоростью удалять даже низкие концентрации органических веществ. Существенным недостатком аэробных технологий, особенно при обработке концентрированных сточных вод, являются высокие энергозатраты на аэрацию. Проблемы связаны также с образованием большого количества микробной биомассы, имеющей очень низкую водоотдающую

способность. При аэробном разложении органических отходов примерно половина углерода и энергии расходуется на прирост биомассы микроорганизмов-деструкторов, а другая половина рассеивается в виде тепла. Чтобы использовать эту биомассу в качестве удобрения, необходимо снизить в ней содержание воды. Для этого используют длительную естественную сушку на значительных по территории иловых площадках, что приводит к ухудшению экологической обстановки. Некоторые сложные ксенобиотики на воздухе полимеризуются в трудноразлагаемые вещества, причем продукты их аэробного разложения часто более токсичны, чем исходные загрязнители. Аэробные методы обработки сточных вод, загрязненных некоторыми полициклическими и ароматическими соединениями, крайне неэффективны. Ароматические соединения понижают поверхностное натяжение водных растворов и могут являться причиной неконтролируемого пенообразования в аэрируемых водоемах. Некоторые из них летучи и токсичны и при аэробном методе очистки способны загрязнять воздух.

При анаэробной обработке преимуществами являются незначительное образование биомассы, возможность удалять высококонцентрированные вещества и попутное образование возобновляемого источника энергии (метана). Анаэробное разложение с образованием метана приводит к переводу почти 85–90% углерода и энергии органических веществ в биогаз и только 8–10% расходуется на построение микробных клеток. Оказалось, что в анаэробных условиях микроорганизмы способны разрушать даже сложные органические соединения, содержащие ароматические и конденсированные циклические структуры. Полного разложения таких соединений, в том числе ксенобиотиков удается добиться при использовании агрегированных микробных сообществ, содержащих микроорганизмы различных физиологических групп. Поскольку при низких концентрациях органического загрязнителя анаэробный процесс не всегда эффективен, для глубокой очистки применяют комбинацию бескислородной и аэробной обработки.

Количественными характеристиками органических и неорганических загрязнений независимо от их источника являются химическое и биологическое потребление кислорода. **Химическое потребление кислорода (ХПК)** — это число кислородных эквивалентов (в мг/л), требуемое для полного окисления вещества до CO_2 . Измеряют ХПК по реакции химического окисления, чаще всего бихроматом калия в концентрированной серной кислоте при 160°C . В сточных водах ХПК для органического вещества приблизительно равно его концентрации. **Биологическое потребление кислорода (БПК)** — это количество кислородных эквивалентов (в мг/л), необходимое для окисления вещества до CO_2 микроорганизмами активного ила при 25°C за определенный промежуток времени. Расчет этих показателей позволяет сравнивать эффективность очистки для разных по структуре и молекулярной массе загрязнителей.

17.4.3. Микробиологическая очистка сточных вод

Существует несколько технологических схем очистки сточных вод. Самыми простыми способами является их отстаивание и фильтрация

(рис. 17.8, а). Эти процессы происходят в системе неглубоких водоемов (прудов и каналов), где микроорганизмы находятся в осадке и во взвешенном состоянии. Естественная фильтрация происходит через песок и глину. Иногда используют природные низины, затопляемые сточными водами (поля орошения и искусственные болота). В очистных водоемах часто выращивают водные растения, в ризосфере которых формируется микробное сообщество, участвующее в биоремедиации.

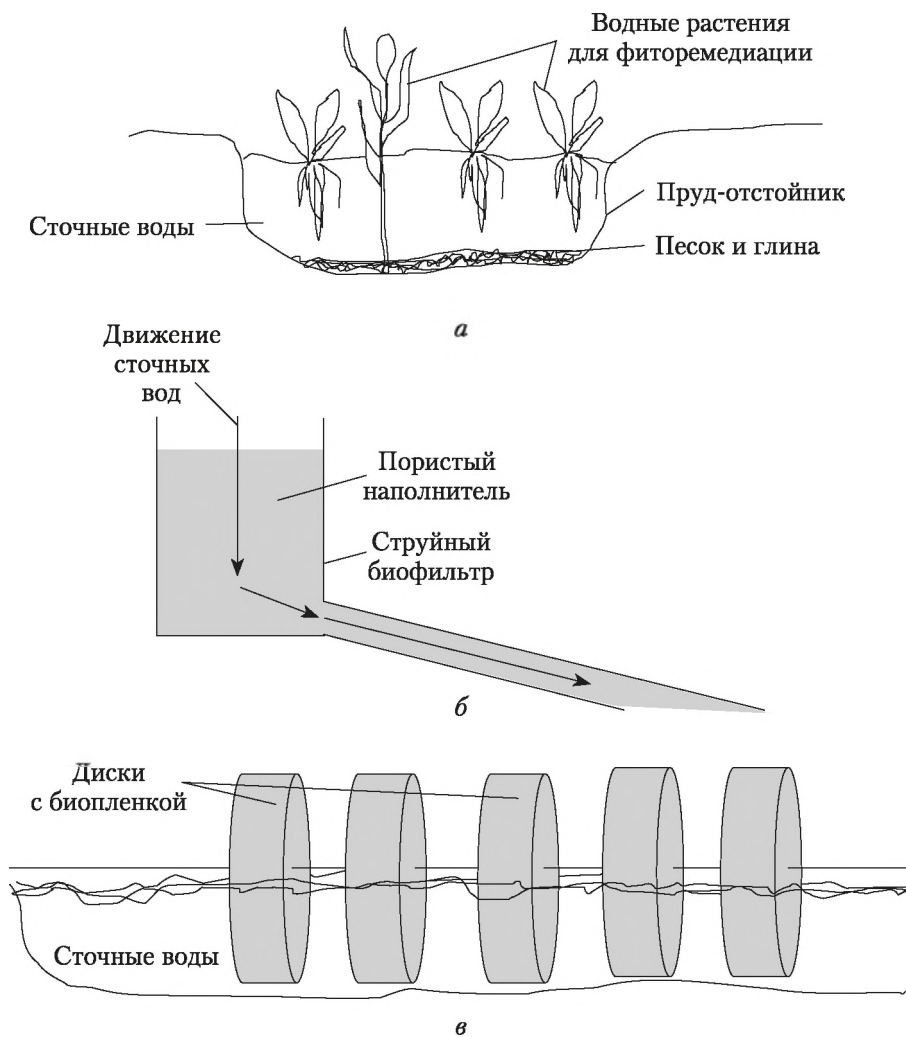


Рис. 17.8. Технологические схемы очистки сточных вод:

а — пруд-отстойник с водными растениями;
б — струйный биофильтр; в — дисковый биофильтр

К простым очистным сооружениям относятся струйные и дисковые биофильтры. **Струйные биофильтры** — это емкости или наклонные каналы, заполненные пористым материалом (рис. 17.8, б). На таком наполнителе формируется микробная биопленка. Ее основу составляют выделяющие

слизь бактерии рода *Zoogleae*. Микробное сообщество, погруженное в слизистый матрикс, состоит из бактерий, грибов, простейших. Сточные воды медленно просачиваются через наполнитель (керамзит, щебень) и собираются внизу. **Дисковые биофильтры** представляют собой медленно вращающиеся диски, наполовину погруженные в протекающую воду (рис. 17.8, в). Поверхность диска покрыта биопленкой, в верхнем слое которой обитают аэробные и факультативно анаэробные, а в нижнем — анаэробные микроорганизмы. При медленном вращении части диска последовательно соприкасаются с кислородом воздуха и погружаются в сточную воду, что приводит к чередованию аэробных и анаэробных процессов.

При централизованной очистке сточных вод применяют принудительную аэрацию и поддерживают высокую плотность микробной популяции. Городские **очистные сооружения** представляют собой крупные промышленные предприятия, перерабатывающие туалетные, кухонные, ливневые воды и нетоксичные стоки промышленных предприятий. Процесс аэробной очистки сточных вод на основе активного ила состоит из 3—4 стадий (рис. 17.9).

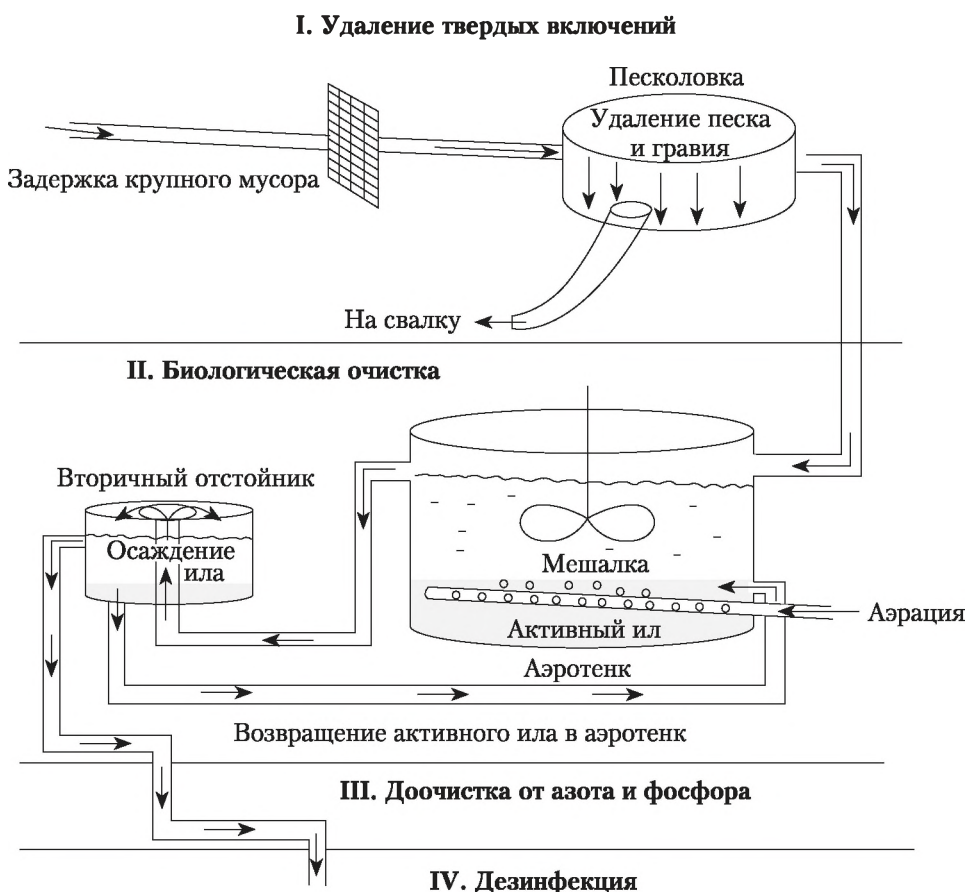


Рис. 17.9. Технологическая схема очистки воды на городских очистных сооружениях

На первой стадии при проходе воды через решетку, песколовку и первичный отстойник удаляются твердые включения. Вторая стадия заключается в биологической очистке воды с помощью активного ила. Растворенные и суспендированные загрязнения окисляются сложным микробным сообществом в открытом бассейне (**аэротенке**) с принудительной подачей воздуха и интенсивным перемешиванием. Микроорганизмы активно растут и используют до 99% загрязнений. Обработанная вода и микробная биомасса разделяются во вторичном отстойнике. Из него активный ил возвращается обратно в аэротенк, а вода направляется на третью стадию химической и биологической доочистки от азота и фосфора. Азот присутствует в виде аммония, нитрата и нитрита. При интенсивной аэрации и низкой концентрации органических веществ нитрифицирующие бактерии превращают аммоний в нитрат. В условиях периодического ограничения доступа кислорода денитрификаторы проводят восстановление нитрата в молекулярный азот. Фосфаты накапливаются некоторыми грамположительными бактериями и акинетобактерами и могут быть удалены с осадком ила. Другим широко распространенным методом удаления фосфора является его химическое осаждение в виде фосфатов железа и алюминия. Четвертой стадией очистки может быть дезинфекция соединениями хлора или озоном. Концентрированные осадки сточных вод из всех отстойников подвергаются анаэробной переработке в метантенке. Уплотненный осадок метантенка и твердые включения направляют на полигоны захоронения твердых бытовых отходов или используют в качестве удобрения.

В **микробное сообщество активного ила** входят разнообразные микроорганизмы, многие из которых имеют слизистые капсулы (родов *Zoogleae*, *Leucothrix*, *Thiothrix* и др.). Ил содержит много микроорганизмов, не поддающихся лабораторному культивированию и идентифицированных с помощью молекулярно-биологических методов. В сообщество ила входят представители родов *Paracoccus*, *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* и др. Численность патогенных бактерий в активном иле обычно мала. Простейшие представлены инфузориями и амебами. Микроорганизмы активного ила образуют хлопьевидные агрегаты, способные к осаждению. При нарушении технологии процесса очистки может происходить вспухание ила, когда образуются гигантские пенообразные хлопья, выносимые с очищенной водой. Такой ил содержит большое количество нитчатых бактерий (родов *Spherothilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*) и бацилл, а также мицелий актинобактерий и плесневых грибов.

Анаэробная обработка применяется в случае концентрированных сточных вод. Поскольку рост микробного сообщества в анаэробных условиях замедлен, то в реакторе необходимо удерживать максимальное количество биомассы. Для этого используют реакторы двух типов: **анаэробный биофильтр** с фиксированной загрузкой и с верхней или нижней подачей воды (рис. 17.10, а) и **реактор с восходящим потоком воды через взвешенный слой ила** (рис. 17.10, б), характеризующийся наиболее эффективным массо- и газообменом.

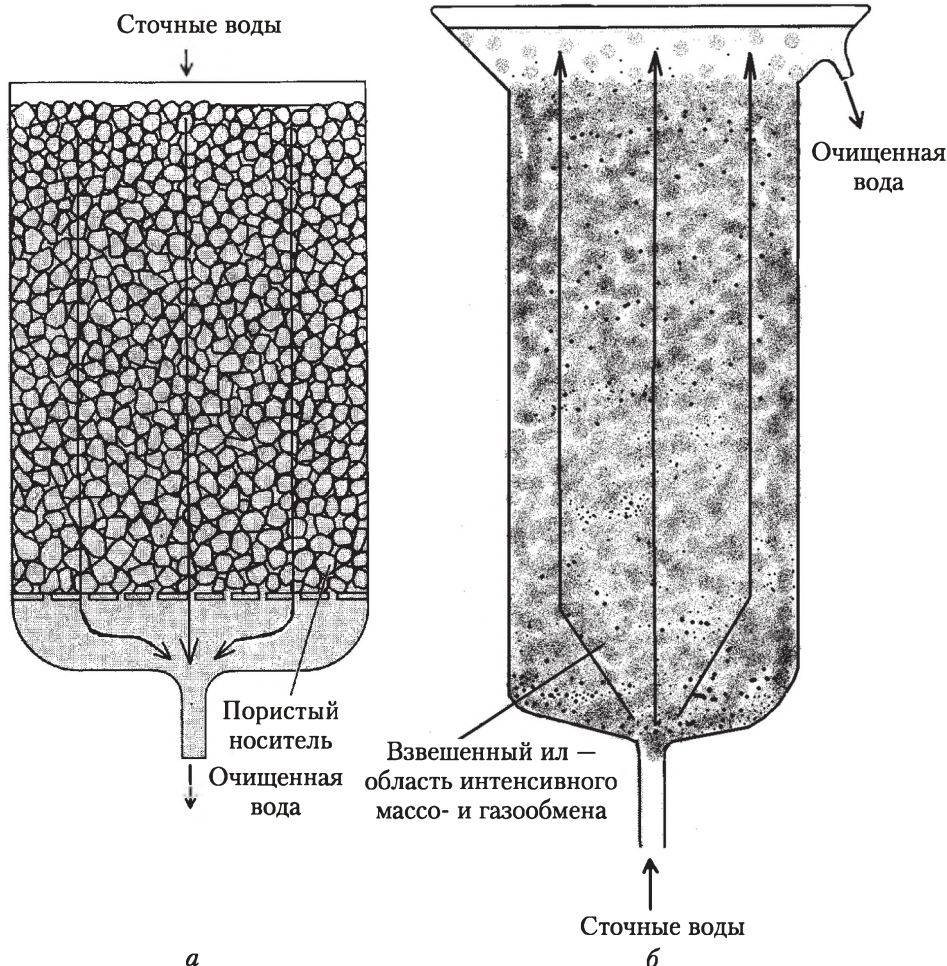
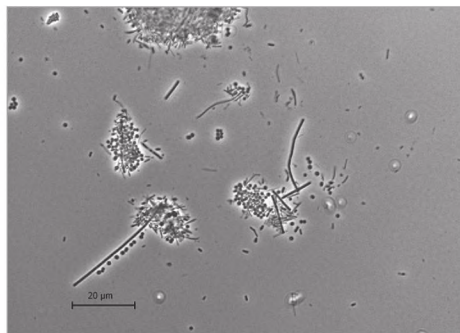
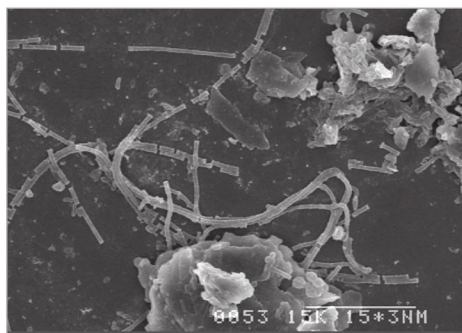


Рис. 17.10. Анаэробные реакторы:

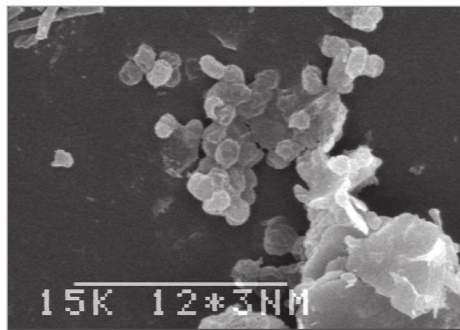
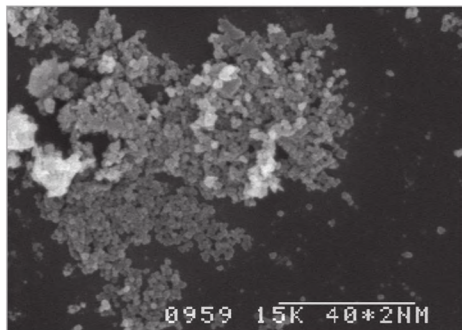
а — биофильтр; *б* — анаэробный реактор с восходящим потоком воды через взвешенный слой ила

В последнем случае анаэробное микробное сообщество представлено плотными гранулами, основой которых являются клетки метаногенных архей. Каркасом плотных гранул являются длинные палочковидные клетки (нити) (рис. 17.11, *а*) представителей родов *Methanosaeta* и *Methanospirillum*, между которыми расположены другие микроорганизмы. В сильно концентрированных стоках формируются мелкие рыхлые агрегаты, **эдификаторами** которых служат представители рода *Methanosarcina*, образующие псевдоткань (рис. 17.11, *б*), в межклеточное вещество которой погружены клетки других микроорганизмов-членов сообщества.

В обоих случаях образование метаногенных гранул путем самоиммобилизации микроорганизмов имеет целью обеспечение тесного физического контакта клеток для осуществления межвидового переноса интермедиатов в микробном сообществе.



a



б

Рис. 17.11. Микроорганизмы-эдификаторы анаэробных гранул:

a — *Methanosaeta* sp.; *б* — *Methanosarcina* sp.

Полужидкие отходы, а также растительные и пищевые остатки перерабатываются обычно в биогаз в **метантенках** — закрытых резервуарах разного объема (рис. 17.12). Длительность процесса составляет от 2 до 5 недель при температуре 30—35 или 50—55°C. В больших метантенках содержимое перемешивают с помощью мешалок или путем продувки нагретого пара.

Непереработанные концентрированные осадки метантенков используют как качественное обеззараженное удобрение или вместе с твердыми включениями очистных сооружений закапывают на полигонах твердых бытовых отходов.

17.4.4. Утилизация твердых бытовых отходов с помощью микроорганизмов

К твердым загрязнителям относятся бытовые отходы, твердые включения сточных вод и сельскохозяйственные остатки. **Твердые бытовые отходы (ТБО)** представлены пищевыми и туалетными остатками, бумагой и инертными материалами (стеклом, металлом, пластиком и т.д.). Рациональному использованию ТБО способствует их раздельный сбор.

Самым простым и дешевым методом утилизации твердых бытовых и промышленных отходов является их захоронение в естественных понижениях рельефа местности (оврагах, карьерах) и сваливание с последующей засыпкой слоем грунта. Захоронение может быть также произведено

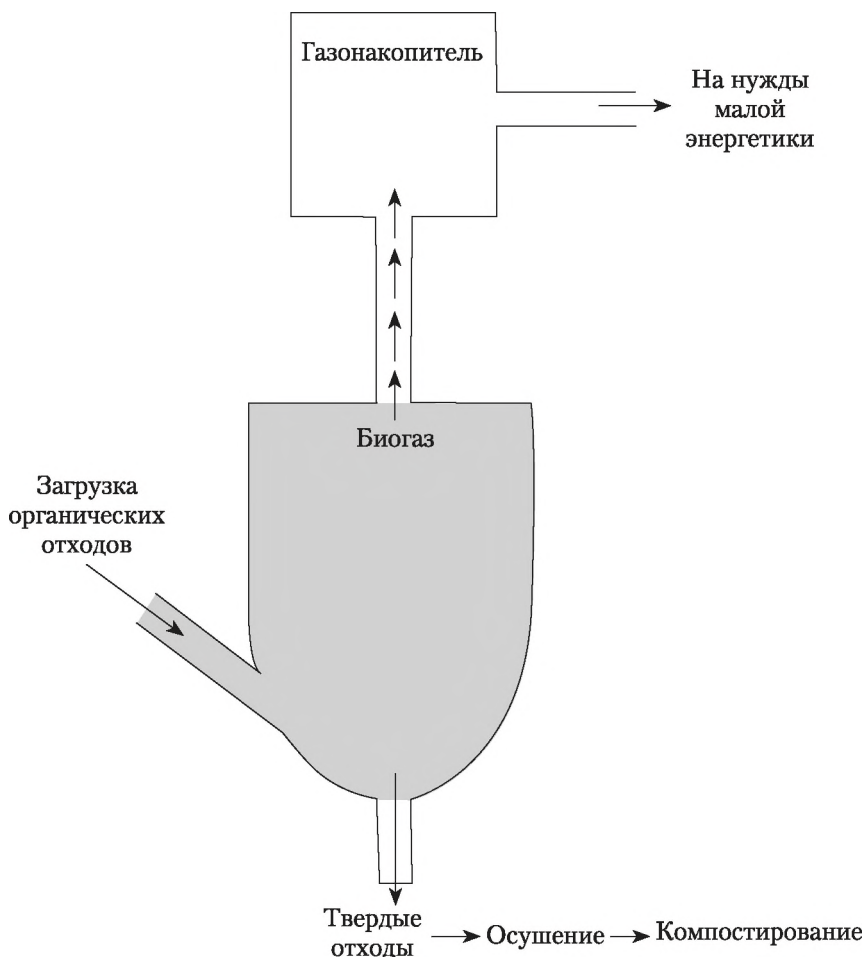


Рис. 17.12. Схема метантенка

на специальных полигонах ТБО с уплотненным глинистым дном. Слои мусора на полигонах периодически уплотняют и пересыпают слоем грунта. Высота мусорных куч может достигать 20–40 м. Микроорганизмы попадают в кучу вместе с отходами и из почвы и грунта. Разложение отходов происходит медленно (30–50 лет, при этом разрушается только 30% захороненной органики). В погребенных отходах анаэробное разложение сдерживается низкой влажностью и небольшой плотностью популяции микроорганизмов-деструкторов. В микробном сообществе свалки присутствуют группы микроорганизмов, осуществляющих разные стадии превращения сложных полимерных соединений в **биогаз**. В период активного метаногенеза происходит разогрев массы до 30–55°C. В верхней части кучи развиваются аэробные микроорганизмы, среди которых особое значение имеют метанотрофные бактерии, представляющие собой бактериальный газовый фильтр, «улавливающий» поднимающийся из нижних слоев метан. Благодаря их активности значительная часть метана не должна попадать в атмосферу. Однако из-за несбалансированности скоростей метаногенеза и мета-

нотрофии свалки и полигоны ТБО являются источниками повышенной эмиссии биогаза в атмосферу и вносят существенный вклад в парниковый эффект. На современных полигонах ТБО отходы герметически отделены от окружающей среды, а биогаз собирают и используют как топливо.

В сельской местности органические отходы традиционно компостируют для получения удобрений. В настоящее время в развитых странах все большую популярность приобретает **компостирование** ТБО как альтернатива промышленным и бытовым свалкам больших городов: перед закладкой разлагаемую часть отходов отделяют от инертных материалов (пластика, металла, стекла) и смешивают с целлюлозосодержащими трудноразлагаемыми остатками (щепой, шелухой, опилками). Компостирование приводит к уменьшению объема отходов и снижению их БПК. Изменение физических характеристик отходов позволяет складировать их более компактно, что ведет к сокращению площадей, отчуждаемых под полигоны для свалок. При компостировании уменьшается количество патогенных для растений, животных и человека микроорганизмов, а также семян сорняков.

В ряде стран практикуют **твердофазную анаэробную переработку**, когда ТБО загружают в специальные реакторы для получения метана. Процесс может быть периодическим или непрерывным. При непрерывной обработке отходы предварительно измельчают, подогревают паром до 50°C и загружают сверху в цилиндрический реактор. Процесс обработки длится три недели при 55°C, после чего переработанную смесь выгружают из нижней части реактора. После отжима воды продукт подвергают 10-дневному аэробному компостированию для получения удобрения.

17.4.5. Биоремедиация загрязненных объектов природной среды

Использование биологической активности для удаления загрязняющих веществ из окружающей среды называют **биоремедиацией**. Основными агентами биоремедиации являются микроорганизмы. В задачи микробиолога входят обнаружение и выделение микроорганизмов с необходимой активностью, а также определение оптимальных условий ее проявления. При загрязнении окружающей среды биоремедиацию можно осуществлять двумя путями. Можно стимулировать развитие активных микроорганизмов, уже имеющихся в месте загрязнения. Второй путь — это внесение в загрязненную область микроорганизмов с уже известными биоразрушающими способностями. К сожалению, для полученных в лаборатории микроорганизмов в природе не всегда удастся создать оптимальные условия проявления их активности и, как правило, они менее конкурентоспособны, чем естественная микробиота данного места. В искусственных очистных сооружениях значительно больше возможностей применять отобранные в лаборатории микроорганизмы и их сообщества, в том числе и генно-инженерные.

Доступность вещества-загрязнителя в различных природных местообитаниях для способных разрушить его микроорганизмов во многом будет зависеть от физико-химических свойств данного местообитания. Свойства водной экосистемы довольно легко поддаются лабораторному моделированию, в то время как почва может значительно изменять харак-

теристики процессов, разработанных в лаборатории. Почву и подстилающие ее грунты следует рассматривать как сочетания локальных областей с разными наборами физико-химических свойств. Поэтому при пространственной миграции загрязняющего вещества существенно меняются факторы, влияющие на процесс его биоразрушения. Загрязнитель может связываться с веществами гумуса и минеральных частиц за счет сорбции или химических реакций, тем самым становясь малодоступным для микроорганизмов и накапливаясь в различных участках. Почвенные частицы могут создавать физический барьер между клетками и чужеродными веществами путем избирательной фильтрации через микropоры. Эти явления приводят к накоплению чужеродного соединения в отдельных локусах почвы, а также делают его малодоступным для микроорганизмов.

Одним из широко распространенных и опасных загрязнителей природных экосистем является нефть, которую добывают в больших количествах и транспортируют на значительные расстояния. В состав нефти и нефтепродуктов входят линейные и разветвленные углеводороды с разным числом атомов углерода, соединения с бензольными кольцами и различными заместителями, полициклические ароматические углеводороды. Микроорганизмы, способные использовать разные фракции нефти, присутствуют в любом типе почвы. Это представители родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma* и дрожжи родов *Candida*, *Endomyces*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* и *Saccharomyces*.

Загрязненные почвы и грунты либо обрабатывают на месте, либо вывозят и подвергают обработке на специальных предприятиях. В первом случае наряду с физическим устранением загрязнения (промыыванием, счищением) применяют и биоразрушающую способность микроорганизмов. Один из методов — стимулировать развитие представителей естественной микробиоты данной почвы, способных разлагать загрязнитель. Для активизации этих микроорганизмов в почву вносят доступные источники углерода и энергии (например, этанол), окислители (кислород, нитраты), источники азота и фосфора и вспомогательные вещества (например, эмульгаторы для гидрофобных соединений). Аэрация почвы достигается вспашкой и подачей воздуха под давлением через перфорированные трубы. Уничтожение загрязнителя требует достаточно длительного времени, однако без таких добавок процесс очищения может проходить десятилетиями. Так, при разливе нефти на Аляске добавление азота и фосфора сократило процесс разложения углеводородов до 1,5 лет. Вторым приемом очистки является внесение микроорганизмов с уже известной биоразрушающей активностью к веществам-загрязнителям. Эффективность их воздействия во многом зависит от возможности создания условий, оптимальных для проявления активности. В природных экосистемах это не всегда достижимо, так как для них характерны существенные колебания физико-химических факторов. Тем не менее разработан целый ряд микробных препаратов на основе чистых и смешанных культур углеводородокисляющих микроорганизмов. Поскольку нет микроорганизма, способного разрушать абсолютно все

химические компоненты нефти, то такие препараты, как правило, содержат виды, имеющие взаимодополняющие активности. Наряду с микробными клетками в препарат включают соединения, поддерживающие жизнедеятельность микроорганизмов в месте загрязнения. Применение таких препаратов целесообразно в свежих загрязнениях, пока естественная углеводородоокисляющая микробиота не достигла значительной плотности.

Очистку с вывозом загрязненного грунта применяют в опасных случаях, чтобы не допустить проникновения загрязнителя в поверхностные и грунтовые воды. При этом удаляют почвенный слой и производят выемку грунта. Снятую почву укладывают в виде штабеля и аэрируют с помощью перфорированных труб для окисления кислородом воздуха. Растворимые загрязнения удаляются промывкой водой. При сильном загрязнении почву сжигают, превращая в минерализованный продукт. Полную выемку грунта производят на территориях, занятых свалками и полигонами ТБО, при намерении использовать их под строительство или для хозяйственных нужд. Грунт просеивают для отделения неразложившихся частиц, которые сжигают или перезахоранивают. Нетоксичный просеянный грунт можно применять для озеленения.

В водоемы нефть и нефтепродукты попадают при авариях на нефтяных скважинах, разливах во время перевозок, с судов и из нефтехранилищ. Опасность разлива нефти в этих случаях определяется быстротой ее распространения по большой площади и образованием поверхностной пленки. Пленка нарушает газообмен воды и атмосферы, что приводит к гибели фитопланктона, осуществляющего первичную продукцию органического вещества и кислорода в водоемах. Компоненты нефти оказывают токсическое действие на живые организмы. Тяжелые фракции могут откладываться в прибрежной зоне и в донных осадках. В воде морей и пресных водоемов присутствуют микроорганизмы-деструкторы нефти в концентрациях 10^6 – 10^7 клеток на 1 л. Это ряд групп неспоровых бактерий, актинобактерий, мицелиальных грибов и дрожжей. Очистные мероприятия заключаются прежде всего в ограничении распространения нефтяного пятна и механическом сборе нефтяной пленки с поверхности воды. Микробиологическую биоремедиацию осуществляют на месте загрязнения путем стимуляции естественной углеводородоокисляющей микробиоты или с помощью вносимых микробных препаратов.

Особенностью процессов биоремедиации природных местообитаний при загрязнении ксенобиотиками является незначительная способность естественной микробиоты к их использованию при первом контакте. Однако многими исследователями отмечено явление адаптации микроорганизмов в природных и искусственных экосистемах, когда при повторном попадании данного соединения микробное сообщество осуществляет его переработку с большей скоростью и в более высоких концентрациях.

Резюме

Общее свойство кисломолочных продуктов — образование при их производстве большого количества молочной кислоты из сахара, что приводит

к снижению pH и предотвращает развитие гнилостных микроорганизмов. Стартовые культуры молочнокислых бактерий (МКБ) в процессе брожения не только подкисляют молоко, но и образуют ароматические вещества. Кисломолочные продукты усваиваются в организме человека втрое быстрее обычного молока. В настоящее время производят большое количество разных видов кисломолочных продуктов. Приготовление масла является распространенным методом хранения молочного жира. При брожении лактококков белки молока теряют свою структуру, что облегчает их удаление из продукта, а диацетил, образуемый этими бактериями, придает маслу его характерный запах, цвет и вкус. В настоящее время известно около 2 тыс. разновидностей сыра, изготавливаемых во всем мире. Стартовые культуры МКБ при производстве сыров добавляют к свежему молоку для образования творожистого сгустка. Сырный сгусток отделяют от молочной сыворотки и перед созреванием прессуют и помещают в солевой раствор. На стадии его созревания в сыр могут быть введены и другие микробные культуры. МКБ используют в качестве заквасок для некоторых мясных и рыбных продуктов. Молочнокислое брожение применяют также при приготовлении квашеных овощей и капусты. Образованная молочная кислота и низкие значения pH выступают в этих случаях в качестве естественных консервантов. С помощью молочнокислого брожения растительный материал можно сохранить для скармливания скоту в виде силоса. Брожение происходит под действием природных популяций микроорганизмов, населяющих наземные части растений. Образующаяся при силосовании молочная кислота снижает pH корма и тем самым консервирует его.

Микроорганизмы, специально вносимые в тесто, используют при хлебопечении с двумя целями: для образования большого количества углекислого газа, который поднимает тесто и для синтеза дополнительных соединений, придающих специфический вкус и аромат определенным сортам хлеба. Ведущая роль в формировании свойств хлеба отводится пекарским дрожжам. Они в условиях недостатка кислорода проводят спиртовое брожение, превращая углеводы теста в этанол и углекислый газ, поднимающий опару. Основную роль в формировании вкусовых качеств специальных сортов хлеба играют бактерии. Закваски для хлебопечения должны не содержать посторонних микроорганизмов и быть устойчивыми при хранении. Дрожжи-сахаромицеты — это основной действующий элемент в процессах приготовления алкогольсодержащих напитков (вина и пива). Такие продукты могут быть получены из различного растительного сырья, которое содержит доступные углеводы. Наиболее традиционным способом приготовления вина является сбраживание виноградного сока естественной микробиотой винограда или специальными заквасками дрожжей. Приготовление пива отличается использованием зернового сырья, не содержащего сбраживаемых сахаров. Сами дрожжи не обладают амилазами, поэтому крахмал зерна должен быть сначала гидролизован до олиго- и моносахаридов. При использовании ячменя осахаривание крахмала зерна происходит под действием самих ячменных амилаз.

Получение уксуса основано на способности уксуснокислых бактерий осуществлять неполное окисление этанола в ацетат.

Микроорганизмы сами могут быть источником пищи для человека и животных, а также добавками к основной диете, так как содержат в клетках все необходимые питательные элементы. Они быстро растут на простом дешевом сырье и эффективно накапливают белок.

С помощью микроорганизмов получают как простые органические и неорганические вещества, так и соединения со сложной структурой. Из-за необходимости перехода на возобновляемые источники энергии разрабатывают микробиологические процессы их получения. Микробиологическая переработка растительного и животного сырья является наиболее эффективным способом уничтожения сельскохозяйственных отходов, сопровождающегося получением полезных продуктов.

Значительное место микробиологические процессы занимают в фармацевтической промышленности, в первую очередь при производстве витаминов, антибиотиков, ферментов и стероидных гормонов. Некоторые микроорганизмы способны специфически отщеплять или присоединять атомы и группы в нужном положении, тем самым, превращая низкоактивные стероиды растительного происхождения в гормональные препараты. Микробные ферменты применяют не только в медицине, но и в хозяйственной деятельности. Многие микробные полисахариды находят применение в промышленности, медицине и научных исследованиях.

Велика роль микроорганизмов в сельском хозяйстве. В свежем навозе содержится значительное число микроорганизмов, связанных с желудочно-кишечным трактом животных. При хранении навоза активность и длительность микробных процессов в нем зависит от условий и способа хранения. В традиционном земледелии большинство органических остатков превращается в органические удобрения в результате компостирования. Для защиты сельскохозяйственных растений от поражения фитопатогенными грибами микроорганизмы-антагонисты либо вносят в почву, либо обрабатывают ими семена и корни высаживаемых растений. С помощью бактерий и грибов получают энтомопатогенные препараты, обладающие избирательной токсичностью для личинок и взрослых особей многих насекомых, но не опасные для других членов экосистемы и человека. Биопрепараты комплексного действия на основе микроорганизмов рассматривают как заменитель химических препаратов для земледелия. Во многих странах используют препараты азотфиксаторов, обрабатывая ими семена и корни растений или непосредственно запахивая в почву. Ряд биопрепаратов применяют для активизации микробиологических процессов в почвах.

Способность микроорганизмов окислять восстановленные соединения серы и металлов применяют в биогидрометаллургии бедных руд. Суспензия таких микробов, обогащенная кислородом, осуществляет реакции, переводящие металл в растворенное состояние.

Вымачивание волокнистых растений для отделения целлюлозных волокон друг от друга приводит к микробному разложению пектина.

Микроорганизмы можно использовать в качестве биосенсоров и тест-систем в научных исследованиях, поскольку они достаточно легко подвергаются «конструированию», и поэтому их широко применяют как объекты генно-инженерных разработок.

Традиционно загрязнения подразделяют на неорганические, газообразные, органические и биологические. По своим физико-химическим свойствам все загрязнения делят на летучие и нелетучие, твердые, полужидкие и жидкие, растворимые и нерастворимые в воде. В зависимости от характера производства состав загрязнений в промышленных стоках может сильно различаться. Обработка сточных вод заключается в практически полном удалении из них органического вещества. В полужидких и твердых отходах удаляется прежде всего быстро разлагаемая часть органических соединений, а оставшаяся часть стабилизируется. В современных процессах очистки, в основном, применяют естественно складывающиеся микробные сообщества.

В настоящее время активно разрабатывают и используют аэробные процессы, позволяющие с высокой скоростью удалять даже низкие концентрации органических веществ. При анаэробной обработке преимуществами являются незначительное образование биомассы, возможность удалять высококонцентрированные вещества и попутное образование метана. Для глубокой очистки применяют комбинацию бескислородной и аэробной обработки.

Самыми простыми способами очистки сточных вод является их отстаивание и фильтрация. К простым очистным сооружениям относятся струйные и дисковые биофильтры. При централизованной очистке сточных вод применяют принудительную аэрацию и поддерживают высокую плотность микробной популяции. Процесс аэробной очистки сточных вод на основе активированного ила состоит из 3—4 стадий. В микробное сообщество активного ила входят разнообразные микроорганизмы, многие из которых имеют слизистые капсулы. Ил содержит много микроорганизмов, не поддающихся лабораторному культивированию и определенных с помощью молекулярно-биологических методов. Анаэробную обработку применяют в случае концентрированных сточных вод. Поскольку рост микробного сообщества в анаэробных условиях замедлен, то в реакторе необходимо удерживать максимальное количество биомассы. Образование метаногенных гранул — это пример самоиммобилизации микроорганизмов, для которых тесное соседство необходимо для межвидового переноса промежуточных веществ.

Полужидкие отходы, а также растительные и пищевые остатки перерабатывают обычно в метантенках. Самым простым методом утилизации твердых бытовых и промышленных отходов (ТБО) является их захоронение в естественных понижениях рельефа местности с последующей засыпкой слоем грунта. В погребенных отходах анаэробное разложение сдерживается низкой влажностью и небольшой плотностью популяции микроорганизмов-деструкторов. Свалки и полигоны ТБО вносят существенный вклад в парниковый эффект. Все большую популярность приобретает компостирование ТБО. При твердофазной анаэробной переработке ТБО загружают в специальные реакторы для получения метана. Процесс может быть периодическим или непрерывным.

При загрязнении окружающей среды биоремедиация может осуществляться путем стимуляции развития активных микроорганизмов, уже

имеющихся в месте загрязнения, или внесения в загрязненную область микробов с уже известными биоразрушающими способностями. В разрушении сложных, устойчивых веществ важны процессы синтрофии и кометаболизма. Доступность вещества-загрязнителя в различных природных местообитаниях для способных разрушить его микроорганизмов во многом будет зависеть от физико-химических свойств данного местообитания. Свойства водной экосистемы довольно легко поддаются лабораторному моделированию, в то время как почва может значительно изменять характеристики процессов, разработанных в лаборатории.

В настоящее время загрязненные почвы и грунты либо обрабатывают на месте, либо вывозят и подвергают обработке на специальных предприятиях. Наряду с физическим устранением загрязнения применяют и биоразлагающую способность микроорганизмов. Разработан целый ряд микробных препаратов на основе чистых и смешанных культур углеводородоокисляющих микроорганизмов.

Опасность разлива нефти в водоемах определяется быстротой ее распространения по большой площади и образованием поверхностной пленки. Очистные мероприятия заключаются прежде всего в ограничении распространения нефтяного пятна и механическом сборе нефтяной пленки с поверхности воды. Микробиологическая биоремедиация осуществляется на месте загрязнения путем стимуляции естественной углеводородоокисляющей микробиоты или с помощью вносимых микробных препаратов.

Отмечено явление адаптации микроорганизмов в природных и искусственных экосистемах, когда при повторном попадании данного соединения микробное сообщество осуществляет его переработку с большей скоростью и при более высоких концентрациях.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Назовите пищевые продукты, получаемые микробиологическим путем. Какие группы микроорганизмов применяют при их изготовлении?
2. Какие микробные метаболиты влияют на вкус и внешний вид готовых кисломолочных продуктов, масла, сыров?
3. Почему в сквашиваемых овощах происходит смена доминирующей популяции?
4. Какими свойствами должны обладать дрожжи для хлебопечения?
5. Какие еще микроорганизмы кроме дрожжей могут участвовать в приготовлении вина и пива?
6. Предложите способы осахаривания при приготовлении пшеничного пива.
7. Почему для производства уксуса используют преимущественно глюконобактер?
8. Микроорганизмы каких групп можно использовать в пищу? Почему микробная биомасса может служить источником пищи для человека и животных?
9. Чем отличается стратегия защиты от патогенных микроорганизмов животных и сельскохозяйственных растений?
10. Назовите группы микроорганизмов, участвующие в приготовлении компоста.
11. Какие индивидуальные химические вещества могут быть получены путем микробиологического синтеза?

12. Как микроорганизмы могут помочь решить энергетические проблемы?
13. Какие препараты для медицины могут быть получены путем совмещения химических и микробиологических стадий производства?
14. Перечислите группы микроорганизмов, участвующих в созревании навоза и компостировании.
15. Какие вы знаете микробные препараты для сельского хозяйства?
16. Почему при выщелачивании металлов из бедных руд применяют микробное сообщество, а не чистую культуру?
17. Какие микроорганизмы участвуют в моче льна?
18. Почему клетки микроорганизмов могут быть модельной системой? Почему это удобно?
19. Приведите примеры загрязнений разных видов.
20. Опишите процессы, происходящие в метантенке.
21. Перечислите способы переработки бытовых, сельскохозяйственных и промышленных отходов. В чем особенность утилизации веществ-ксенобиотиков?
22. Приведите достоинства и недостатки аэробных и анаэробных технологий обработки сточных вод. Почему на современных очистных сооружениях применяют сочетание различных способов переработки стоков?
23. Сравните способы переработки ТБО по глубине и безопасности для окружающей среды.
24. Какими способами можно стимулировать естественную микробиоту экосистемы для борьбы с загрязнениями на месте?
25. В чем опасность попадания нефти в водоем?
26. Почему в биоремедиации более перспективным считается применение микробных сообществ, а не чистых культур микроорганизмов?

Семинар 1

Микроорганизмы для приготовления национальных пищевых продуктов

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Выделение микроорганизмов из продуктов, полученных микробиологическим путем (кефира, простокваши, сыра и других кисломолочных продуктов, квашеной капусты, кваса и т.д.)

Цель работы: при выполнении данной работы студенты осваивают принципы выделения микроорганизмов, являющихся основными агентами формирования органолептических свойств продуктов, приготовленных микробиологическим путем. Таким же способом можно вырастить микроорганизмы, обитающие в других пищевых продуктах.

В качестве объектов исследования рекомендуется взять продукты нескольких видов (например, кисломолочный продукт, квас, жидкость квашеной капусты) или разные образцы одного вида продукта (например, кефир кустарного производства из разных регионов страны). Для того чтобы эксперимент был успешным, следует выбирать натуральные продукты, не подвергшиеся любым видам стерилизации и пастеризации и не

содержащие консервантов. При выделении микроорганизмов из разных продуктов следует применять жидкие и агаризованные среды общего назначения (БСА), а также селективные среды, поддерживающие рост преимущественно тех групп микроорганизмов, которые предполагается получить.

Необходимые материалы (количество на 1 студента зависит от числа исследуемых продуктов и предполагаемых групп микроорганизмов): микроскоп, предметные и покровные стекла, красители для микроскопии, иммерсионное масло, пинцет, скальпель или нож, ступка с пестиком, микробиологическая петля, стеклянные шпатели Дригальского, микробиологические пипетки на разные объемы или одноразовые шприцы, газовая горелка или спиртовка, стерильная водопроводная вода для разведений в стеклянных пробирках или пластиковых пробирках Эппендорф с крышечками, стерильные среды БСА, агаризованные селективные среды для молочнокислых, уксуснокислых бактерий, дрожжей и плесневых грибов в колбах, жидкие стерильные селективные среды для молочнокислых, уксуснокислых бактерий, дрожжей и плесневых грибов в пробирках или пенициллиновых пузырьках, пустые чашки Петри, стаканчики цилиндры для приготовления сред, маркер.

Для выполнения работы готовят к стерилизации и стерилизуют в сухожаровом шкафу пипетки, пустые чашки Петри и ступку с пестиком, а среды и водопроводную воду — в автоклаве. БСА и селективные агаризованные среды готовят в колбах на 300–750 мл, жидкие среды разливают в пробирки или пенициллиновые пузырьки. Для анаэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов сосуды закрывают резиновыми пробками, для аэробов — ватными. Для накопления молочнокислых бактерий готовят среду MRS следующего состава (г/л): гидролизат казеина — 10,0; мясной экстракт — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; глюкоза — 20,0; ацетат натрия — 5,0; цитрат аммония двузамещенный — 2,0; твин 80 — 1,0; K_2HPO_4 — 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,05; вода дистиллированная, pH 6,2–6,5. Для приготовления агаризованного варианта среды вносят 1,5–2,0% агара. Для выделения уксуснокислых бактерий используют 6–8°Б сусло с 7% этанолом (для отверждения добавляют 1,5–2,0% агара). Для накопления дрожжей применяют 6–8°Б сусло и сусло-агар (СА) и среду Сабуро (глюкозо-пептонную среду) следующего состава (г/л): глюкоза — 40,0; пептон — 10,0; дрожжевой или мясной экстракт — 2,0...5,0; вода водопроводная (для отверждения добавляют 1,8–2,0% агара). Для выделения мицелиальных грибов готовят 3–4°Б сусло и сусло-агар с добавлением 0,4% (по объему) концентрированной молочной кислоты и среду Чапека — Докса (г/л): сахароза — 30,0; нитрат натрия — 3,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; KCl — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; агар — 15,0; вода дистиллированная. Можно также использовать готовые среды в виде порошка или другие среды для данных групп микроорганизмов. Все среды стерилизуют в автоклаве при 0,5 ати 30 мин. Для предотвращения роста грибов в среды для бактерий можно внести стерильный раствор циклогексимида до конечной концентрации 200 ppm. Для ингибирования роста бактерий в среды для грибов можно добавить стерильный раствор хлортетрациклина до конечной концентрации 100 ppm.

После стерилизации расплавленные и остуженные до 45°C агаризованные среды разливают стерильно у пламени горелки (спиртовки) в стерильные чашки Петри по 20—25 мл. Когда агар в чашках застынет, их маркируют, указав на дне закрытых чашек свои инициалы, дату и источник микробиологического материала.

Исследуемую пробу продукта, если необходимо, стерильно гомогенизируют, растирая около пламени горелки в стерильной ступке с помощью пестика (например, кусочек сыра), и готовят десятичные разведения в стерильной водопроводной воде, которые засевают в жидкие и на твердые среды. Посев на твердые среды осуществляют с помощью петли «истощающим штрихом» и (или) поверхностно с помощью стеклянного шпателя Дригальского. Засеянные пробирки (пузырьки) и чашки (вверх дном) инкубируют в течение 2—7 сут. при 20—25°C — со средами для грибов, при 30—37°C — со средами для бактерий.

По окончании инкубации описывают колонии, выросшие на твердых средах, и изменения культуральных признаков (появление газа, мутности, запаха, цвета, сдвиг pH и т.д.) в жидких средах. С помощью микроскопии окрашенных препаратов и препаратов «раздавленная капля» анализируют морфологию клеток в колониях и морфологические типы клеток в жидких средах. Сравнивают состав микробиоты различных продуктов или различных образцов одного продукта из разных регионов, сопоставляя эти данные с возможными различиями органолептических свойств образцов. Подсчитывают количество колоний разных групп в единице массы (объема) продукта.

Семинар 2

Микробная переработка отходов и очистка окружающей среды в городах и сельской местности

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Глава 18

НЕГАТИВНЫЕ МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- примеры порчи микроорганизмами продуктов питания;

уметь

- защищать продукты от порчи;

владеть

- приемами выделения вредных микроорганизмов из испорченных пищевых продуктов.
-

18.1. Порча микроорганизмами продуктов питания

18.1.1. Факторы, влияющие на процесс порчи пищевых продуктов

Пищевые продукты — это хорошая питательная среда для различных микроорганизмов, при этом микробный рост отражается как на качестве самого продукта, так и на здоровье потребляющего его человека. Неконтролируемый рост микроорганизмов в пищевых продуктах может вызвать их порчу, а загрязнение продукта болезнетворными микробами способно привести к заражению человека.

Человечество на протяжении всей своей истории постоянно борется с порчей пищевых продуктов. Издавна для предохранения пищи от порчи использовали засолку и копчение мяса и рыбы, приготовление сыров и кисломолочных продуктов, добавление специй и перца. В 1857 г. Л. Пастер доказал, что именно микроорганизмы вызывают порчу продуктов. Его работы поставили изучение повреждения и сохранения пищевых продуктов на научную основу. Л. Пастер предложил использовать нагревание ниже 100°C (**пастеризацию**) как фактор, предупреждающий развитие микроорганизмов в продукте.

Скорость микробной порчи конкретного продукта определяется разнообразием внешних и внутренних условий. Внутренние, присущие тому или иному виду продукта факторы включают pH, влажность, окислительно-восстановительный потенциал, структуру, доступность воды и питательных веществ и возможное присутствие природных антимикробных агентов. Из внешних факторов наиболее важными являются температура хранения, относительная влажность воздуха, присутствие газов (CO₂, O₂), тип и количество микроорганизмов в окружающей продукт среде.

В зависимости от состава питательных веществ продукт может быть заселен той или иной группой микроорганизмов. Эти микроорганизмы

будут вызывать различные процессы, приводящие к изменению свойств продукта (табл. 18.1).

Таблица 18.1

Типичные изменения, наблюдаемые при микробной порче преобладающих в продукте соединений

Соединение	Химические процессы	Образующиеся вещества и типичные явления
Пектин	Гидролиз пектина	Метанол, уоновые кислоты → потеря структуры овощей и фруктов, «мягкие гнили»
Белки	Протеолиз, дезаминирование	Аминокислоты, пептиды, амины, сероводород, аммиак, индол → появление горечи, прокисание, появление неприятных запахов, ослизнение
Углеводы	Гидролиз, сбраживание	Органические кислоты, CO ₂ , смеси спиртов → прокисание, брожение
Жиры	Гидролиз, деградация жирных кислот	Глицерол, смеси жирных кислот → прогоркание, появление горечи

Такие продукты, как хлеб, варенье, фрукты и овощи, в первую очередь поражаются плесневыми грибами. Наоборот, продукты, содержащие большое количество белка и (или) жиров (например, мясо или масло), подвергаются прежде всего действию бактерий. Такая порча приводит обычно к возникновению неприятных запахов, за которые ответственны органические амины. Низкое значение pH продукта вызывает развитие дрожжей и плесеней, нейтральное и щелочное — бактерий. Наличие и доступность воды также влияют на способность микроорганизмов колонизировать продукт, поэтому снижение активности воды (сушка, копчение, вяление, внесение больших количеств соли и сахара) — это простейший способ предохранения продукта от заражения. При приготовлении мясных продуктов, в частности бульонов, часто снижается окислительно-восстановительный потенциал. Такие продукты, содержащие доступные аминокислоты, пептиды и факторы роста, являются идеальной средой для роста анаэробов, в частности клостридий. Физическая структура пищи оказывает большое влияние на процесс порчи продукта. Измельчение, нарезание и смешивание пищи, например в соусах, салатах, котлетах, не только увеличивает поверхность пищи и меняет клеточную структуру, но также способствует внесению извне дополнительных микроорганизмов и распределению их в толще продукта. Это приводит к ускорению порчи и снижению срока хранения продукта.

Наличие в продукте натуральных антимикробных агентов способно замедлить процесс его порчи. К ним относятся кумарин в овощах и фруктах, лизоцим в яйцах, фитонциды в луках, жгучие вещества в острых приправах, полифенолы в черном и зеленом чае.

Высокая относительная влажность окружающего воздуха способствует быстрому микробному росту даже при пониженных температурах, тогда как значительное содержание CO₂ в атмосфере хранилища ингибирует

развитие микроорганизмов. Например, если мясо хранить при высоком содержании углекислоты, то рост грамотрицательных бактерий замедляется. Порча некоторых основных групп пищевых продуктов будет описана подробнее в последующих разделах.

18.1.2. Микробная порча молока и молочных продуктов

Молоко является одним из основных сельскохозяйственных продуктов и представляет собой сбалансированный источник белка, углеводов, минералов и витаминов. Эти же качества делают молоко прекрасной средой для роста и развития микроорганизмов. Микроорганизмы могут, с одной стороны, так изменять молоко, что оно становится непригодным для потребления человеком, а с другой — являются важными компонентами производств изделий из молока.

Вытекающее из коровьего вымени молоко стерильно, а микробные клетки попадают в него при дойке, перевозке и хранении. Число их различается в зависимости от состояния здоровья коровы и от условий получения молока, однако оно не должно превышать рекомендованных стандартов (табл. 18.2).

Таблица 18.2

Микробиологические стандарты некоторых видов молочных продуктов

Продукт	Максимально разрешенное число микроорганизмов, мл	
	Общее число микроорганизмов	Колиформы
Молоко сырое I сорта (до смешения партий)	10 ⁵	—
Молоко сырое I сорта (после смешения)	3 · 10 ⁵	—
Пастеризованное молоко I сорта	2 · 10 ⁴	—
Молоко сырое II сорта	6 · 10 ⁵	—
Пастеризованное молоко II сорта	4 · 10 ⁴	—
Сгущенное молоко	3 · 10 ⁴	10
Обезжиренное сухое молоко	3 · 10 ⁴ *	—
Мороженое	5 · 10 ⁴	—

Примечание. * — на грамм продукта; прочерк означает «не разрешено».

Сырое молоко от здоровой коровы обычно содержит бактерии родов *Lactococcus*, *Lactobacillus*, представителей семейства *Enterobacteriaceae* и психрофильные штаммы родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и *Flavobacterium*. Они попадают в молоко с поверхности вымени, с пылью, из подстилки и навоза. Оборудование для дойки также быстро покрывается большим количеством микроорганизмов, поэтому его необходимо часто стерилизовать.

Молоко скисает и портится прежде всего из-за развития молочнокислых бактерий (МКБ). Сбраживание сырого молока гомоферментативными *Lactococcus lactis* приводит к образованию преимущественно молочной кислоты, придает молоку кислый вкус и понижает pH, белки молока свертываются, формируя творожистый сгусток. Затем начинают расти более ацидотолерантные представители рода *Lactobacillus*, потом доминирующими группами становятся дрожжи и плесневые грибы, которые расщепляют накопившийся лактат, и таким образом возвращают кислотность среды к нейтральному значению. Это позволяет активизироваться гидролизующим белок бактериям, что приводит к появлению гнилостного запаха и горького вкуса. При этом молоко из белого может становиться почти прозрачным с осадком на дне (происходит пептонизация белка). Однако если условия хранения не способствуют развитию МКБ, то бактерии других групп также могут вызывать сбраживание молока с образованием кислот. Например, колиформные микроорганизмы образуют в значительных количествах уксусную кислоту, фумарат и бутандиол и лишь небольшое количество лактата.

Болезнетворные микроорганизмы могут попадать в молоко от зараженной коровы или от работников молочных ферм, являющимися носителями возбудителей сальмонеллеза, дифтерии, тифов и других кишечных инфекций. От инфицированного животного попасть в молоко и передаться человеку могут возбудители туберкулеза крупного рогатого скота, бруцеллеза и Ку-лихорадки. В обработанное молоко микроорганизмы могут попасть при несоблюдении режима обработки или при использовании загрязненного оборудования. Если источник заражения (особенно на крупном предприятии) вовремя не выявлен, то могут возникнуть эпидемии, связанные с молочными продуктами.

Все неспорные микроорганизмы сырого молока (в том числе патогенные) уничтожаются в процессе пастеризации. Пастеризация увеличивает время хранения молока, существенно снижая число микроорганизмов, вызывающих его порчу. В настоящее время используют два вида пастеризации: низкотемпературное выдерживание, когда молоко нагревают до 62,8°C 30 мин, и флеш-пастеризацию, когда молоко инкубируют при температуре 71,7°C в течение 15 с. Эти методики были опробованы на клетках *Mycobacterium tuberculosis* (возбудителях туберкулеза) и *Coxiella burnetii* (возбудителях Ку-лихорадки) как наиболее устойчивых к нагреву патогенов, обнаруженных в молоке. Оказалось, что пастеризация убивает этих и других болезнетворных микроорганизмов, ассоциированных с молоком (например, *Brucella abortus*, возбудителя бруцеллеза). Для проверки эффективности пастеризации используют фосфатазный тест. Фосфатаза, присутствующая в сыром молоке, разрушается при пастеризации. Ее отсутствие в пастеризованном молоке говорит о том, что процесс проведен правильно. Фосфатазный тест основан на способности фермента расщеплять фенилфосфат натрия на фенол и фосфат натрия. Скорость образования фенола, концентрацию которого легко измерить, определяет степень активности фермента. Ультравысокотемпературная обработка (нагревание в течение нескольких секунд при 137,8°C) позволяет приготовить стерилизован-

ное молоко, которое затем разливают в стерильные пакеты, защищенные от проникновения воздуха фольгой. Его можно хранить несколько месяцев в закрытом состоянии, а после открывания пакета оно не портится в бытовом холодильнике от 10 до 21 сут.

18.1.3. Микробная порча мяса, продуктов из него и морепродуктов

Мясо — идеальная питательная среда для микроорганизмов, так как оно богато белками и минералами, содержит достаточное количество воды и имеет благоприятный pH. Мясо и мясопродукты могут быстро портиться, если их не подвергать обработке. Внутренняя мясная мякоть здоровых животных обычно стерильна и заражается микроорганизмами в результате соприкосновения с поверхностями, инструментами или воздухом боен при разделке туш. Провернутое мясо (фарш) и изделия из него (колбасы и сосиски) особенно подвержены действию микроорганизмов, поскольку при их изготовлении резко увеличивается поверхность для колонизации и роста микробных клеток. Постоянная очистка ножей, мясорубок и пил с помощью горячей воды позволяет снизить микробную обсемененность. Порча мяса может происходить как в присутствии, так и в отсутствии кислорода. В аэробных условиях при порче можно наблюдать образование поверхностной слизи или плесени, изменение цвета мяса и его жиров, что приводит к появлению нежелательного вкуса и запаха. Поверхностная слизь формируется из-за развития бактерий родов *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* и *Streptococcus*. Аэробные грибы на поверхности мяса образуют черные (*Cladosporium herbarum*), белые (*Sporotrichum carnis*) или зеленые (*Penicillium* sp.) пятна плесени. Даже при удалении отдельных пятен с поверхности мяса, процесс порчи быстро распространяется по поверхности и вглубь, вызывая разрушение мяса. Изменение красного цвета мяса, за который ответственен пигмент миоглобин, свидетельствует о начавшемся процессе порчи продукта. Так, развитие бактерий родов *Lactobacillus* и *Leuconostoc* приводит к образованию сероводорода и пероксидов, которые восстанавливают миоглобин, вследствие чего его цвет меняется на коричневый. При этом мясо из красного становится коричневым, серым или зеленоватым. Многие бактерии и дрожжи, вызывающие порчу мяса, синтезируют липазы, гидролизующие жиры мяса с образованием ненасыщенных жирных кислот. Их быстрое окисление ведет к прогорканию мяса, сопровождаемому формированием нежелательного вкуса и запаха продукта. Наиболее часто прогоркание жиров вызывают представители родов *Achromobacter* и *Pseudomonas*. Прокисание мяса происходит под действием бактерий, катаболизирующих белки и углеводы мяса. В этом случае образуется набор летучих жирных кислот (ацетата, формиата, бутирата и пропионата) и появляются специфические «кислые» запах и вкус. В анаэробных условиях чаще всего наблюдают гниение мяса, т.е. анаэробное разложение его белков с образованием сероводорода, индола, меркаптанов, аммиака, аминов и других дурно пахнущих веществ. Гниение обычно вызывают представители рода *Clostridium*, а также некоторые факультативные анаэробы. Гнилостные процессы с участием клостридий сопровождаются образованием большого количества H_2 и CO_2 .

Порча мяса может быть значительно замедлена быстрым его охлаждением или замораживанием. Время хранения свежего мяса при 5°C не превышает 3—10 дней, а при 0°C в зависимости от начальной обсемененности мясо может храниться до 30 сут. Замораживание мяса не убивает психрофильные микроорганизмы из родов *Pseudomonas*, *Achromobacter* и *Flavobacterium*, однако существенно снижает их активность. При снижении температуры до -20°C период хранения мяса удлинится до нескольких месяцев. Такое замораживание убивает множество бактерий, но некоторые из них переживают заморозку и при медленном размораживании могут начать расти снова. Однако при заморозке мясо теряет свои органолептические свойства из-за высыхания (так называемого «морозильного ожога») и окисления. Тщательная упаковка мяса до замораживания позволяет свести такие негативные явления к минимуму. В мясе, состарившемся при температуре морозильника и относительной влажности камеры 80—90% в течение нескольких недель, микробный рост замедлен.

Высушивание мяса для его сохранения известно людям уже несколько веков. Некоторые типы колбас сохраняют, подвяливая их. В настоящее время популярным методом сохранения мяса без изменения запаха и вкуса является лиофильная сушка. Высушивание резко снижает активность воды в мясе, что и препятствует росту микроорганизмов. Такое мясо может храниться неограниченно долго без охлаждения. Другой способ хранения без замораживания — это давно применяемая засолка. В настоящее время наряду с поваренной солью для обезвоживания мяса используют и другие химические вещества (сахар, нитрат и нитрит натрия, иногда уксус). Сахарозу и поваренную соль применяют для придания вкуса и снижения активности воды, например, при изготовлении ветчины. Нитрат подавляет развитие некоторых анаэробов, в том числе клостридий, а сахароза является источником энергии для нитратредукторов, образующих нитрит. Его наличие усиливает «мясной» цвет мясопродуктов. Нитраты и нитриты являются эффективными консервантами, однако в последнее время их использование в обработке мяса ограничено, так как они могут реагировать со вторичными и третичными аминами, приводя к появлению чрезвычайно канцерогенных нитрозаминов. Многие мясопродукты коптят для большей сохранности и придания характерного вкуса. Температура процесса и химические вещества дыма вместе с уменьшением влажности продуктов снижают вероятность микробного роста на изделиях. Один из идентифицированных ингредиентов дыма, формальдегид, несмотря на низкие концентрации, является основным консервантом и бактерицидом древесного дыма. Для защиты мясопродуктов до сих пор используют бензоат натрия, пропионат кальция, борную и сорбиновую кислоты. Они подавляют метаболизм микроорганизмов или нарушают проницаемость ЦПМ. За исключением бората, все эти соединения имеют органическое происхождение. В настоящее время в ряде стран широкое применение химических консервантов запрещено или существенно ограничено. Попытки применить ионизирующую радиацию для стерилизации мясопродуктов не увенчались успехом из-за высокой стоимости и нежелательных изменений цвета и вкуса продуктов.

Мясо домашней птицы и морепродукты также играют значительную роль в диете человека. При разделке птицы мясо легко загрязняется микроорганизмами перьев, кожи, ног и кишечника. Микроорганизмы, наиболее часто обнаруживаемые в мясе птицы, относятся к родам *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* и *Micrococcus*. Порча мяса домашней птицы обычно вызывается представителями родов *Pseudomonas*, хотя бактерии рода *Achromobacter* и дрожжи также могут участвовать в процессе (табл. 18.3). Быстрое охлаждение птицы после обработки может приостановить порчу. Если мясо птицы и яйца инфицированы патогенными представителями кишечной группы, в частности сальмонеллой, то их употребление в пищу может привести к вспышке заболеваний среди людей. Для сохранения мяса птицы в ряде стран используют антибиотики, такие как хлор- и окситетрациклины, но в концентрациях, не превышающих 7 ppm. Их вносят на поверхность мяса или добавляют в корм птицы перед ее забоем. Ежегодно в США крупному рогатому скоту, птице и другим животным скармливают до 2,5 млн кг антибиотических веществ. Установлено, что от 75 до 80% скота и домашней птицы когда-либо получали антибиотики в течение откормочного периода. Несмотря на то, что антибиотики улучшают здоровье животных и снижают количество патогенных микроорганизмов в их кишечнике, озабоченность вызывает появление устойчивых форм возбудителей. В связи с этим в мире наблюдается тенденция к ограничению применения антибиотиков как консервантов в продуктах питания.

Таблица 18.3

Микроорганизмы, вызывающие порчу мяса птицы и рыбы

Тип мяса	Тип порчи	Микроорганизмы, ответственные за процесс
Домашняя птица	Ослизнение, неприятный запах	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , дрожжи, <i>Salmonella</i>
Рыба	Изменение цвета	<i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i>
	Гниение	<i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i>

Состав микробиоты морепродуктов зависит от присутствующих в воде микроорганизмов. Число клеток микроорганизмов на 1 см² свежевывловленной рыбы может колебаться от нескольких сотен до нескольких миллионов. На поверхности рыбы обычно присутствуют бактерии родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Vibrio*, *Sarcina*. Большинство этих микроорганизмов удаляют при промывке, однако оставшиеся быстро размножаются после разделки рыбы, так как она является хорошим субстратом для микробного роста. Для предотвращения развития микроорганизмов свежепойманную рыбу быстро охлаждают на льду. Для сохранения морепродуктов их засаливают, высушивают, замораживают или применяют высокотемпературную обработку. К порче морепродуктов приводит автолиз, окисление или активность

микроорганизмов (см. табл. 18.3). При окислении ненасыщенных липидов рыбьего жира и образовании триметиламина гниющая рыба приобретает специфический неприятный запах. При порче ферменты самой рыбы вызывают автолиз мышечной ткани, при этом выделяются нитросоединения (например, аминокислоты и амины), а также углеводы, используемые бактериями. Часто это те же самые микроорганизмы, которые присутствуют в поверхностной слизи. Бактерии потребляют продукты автолиза и образуют пахучие соединения (амины, аммиак, альдегиды, сульфиды и индол). Устрицы обычно остаются свежими, пока находятся в раковинах и сохраняются на холоде. После вскрытия раковины процесс порчи существенно ускоряется.

18.1.4. Микробная порча консервов

В 1810 г. Николя Аппер разработал способ длительного сохранения продуктов, названный позже **аппертизацией**. Он предложил консервировать пищу в герметически запечатанных жестяных банках путем их продолжительного нагрева в кипящей воде (при температуре 100—110°C). При этом большинство микроорганизмов погибало, а оставшиеся развивались значительно медленнее. Такой метод позволял сохранить вкус мясных и овощных продуктов и надолго предохранить их от порчи, однако при этом происходили изменения в структуре пищи и разрушались некоторые ее полезные составляющие (например, витамины). Тем не менее консервирование приобрело большую популярность и широко используется в наши дни. Современные методы консервирования включают прогрев герметически закрытых продуктов при высоких температурах, достаточных, чтобы уничтожить все споры. Способы нагрева и используемые температуры варьируют от 100°C (для кислых консервов с рН ниже 4,0) до 121°C (для консервов с рН выше 4,5). В консервной промышленности для проверки качества нагрева в каждой партии консервов принято ставить тест-банки с внесенным определенным числом спор *Bacillus stearothermophilus*, обладающих высокой термоустойчивостью. Если после температурной обработки тест-банка оказывается нестерильной (т.е. споры не были убиты), то бракуют всю партию.

Современные промышленные методы консервирования при соблюдении технологии характеризуются высокой надежностью, поэтому большинство случаев отравлений или заражений связаны с домашними заготовками, когда происходит недостаточная очистка сырья и слабый прогрев низкокислотных продуктов (мяса, рыбы, овощей, грибов). Рост большинства микроорганизмов в консервах сдерживает не только термообработка, но также удаление воздуха из банок и снижение рН консервов. Если порча продукта в банке все же наступает, то ее видимыми признаками являются кислый запах и бомбаж (раздувание жестяных банок или вспучивание крышек на стеклянных банках), вызванный выделением газов. В частности, образование молекулярного водорода происходит при действии кислот — продуктов метаболизма микроорганизмов на металл банки. Микробная порча заводских консервов может наступать вследствие несоблюдения режима термообработки при автоклавировании или нарушения целостно-

сти упаковки. При этом меняется цвет, текстура, запах и вкус продукта, образуются органические кислоты (в частности, лактат), ответственные за кислый запах, сульфиды и газы (в основном, H_2 , CO_2 и H_2S), раздувающие банки. Спорообразующие бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium* обычно развиваются в недостаточно прогретых консервах, в то время как неспорообразующие формы проникают в консервы через поврежденную упаковку. Иногда развитие анаэробных микроорганизмов рода *Clostridium* может приводить к образованию сильнейшего нейротоксина (**ботулина**), вызывающего в очень малых дозах сначала слепоту, а затем и смерть человека. Через испорченные продукты в организм могут попадать и сами болезнетворные микроорганизмы (например, бактерии кишечной группы).

18.1.5. Микробная порча фруктов, овощей, зерна

Здоровые, неповрежденные семена, овощи и плоды несут на своей поверхности естественную микробиоту, препятствующую колонизации нежелательными микроорганизмами. Микробное загрязнение этих продуктов происходит во время сбора и подготовки к хранению, а их порча зависит от температуры и влажности, поддерживаемых в хранилищах. На степень колонизации микроорганизмами оказывают влияние и морфологические особенности объектов. Так, шероховатые, имеющие неровную поверхность и механические повреждения плоды несут существенно больше микроорганизмов, чем целые, с гладкой оболочкой. Микроорганизмы, преобладающие на поверхности семян, плодов и овощей, относятся к родам *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*. Представители родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* встречаются в незначительных количествах, а грибы, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Phytophthora* и др., присутствуют в основном в форме спор.

Для большинства фруктов и овощей начальный этап порчи связан с плесневыми грибами, имеющими ферменты для разрушения оболочек (кожицы) плодов и для проникновения под кожу. Нарушение целостности поверхностных оболочек фруктов и овощей приводит к ускорению колонизации другими микроорганизмами. Углеводы легко расщепляются бактериями, например, вызывающей «мягкие гнили» *Erwinia carotovora*. Высокий окислительно-восстановительный потенциал способствует развитию аэробов и факультативных анаэробов.

В спелом здоровом зерне вода находится в состоянии, недоступном для микроорганизмов. Размножение разных групп микроорганизмов начинается при нарушении режима хранения. Для зерна каждого типа отмечены пороговые температура и влажность, по достижении которых становится возможен микробный рост. На влажном зерне и продуктах из него в большинстве случаев вырастают плесневые грибы, в основном, родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Бактериальные виды представлены микрококками, грамотрицательными неспоровыми палочками, а при повышенной температуре — бациллами. Результатом микробной жизнедеятельности является существенное разогревание зерновой массы. Заражение зерна аскомицетом *Claviceps purpurea* приводит к отравлению галлюциногенными

алкалоидами этого гриба, которые вызывают изменения поведения человека и животных, аборт и смерть. Канцерогенными свойствами обладают продукты других грибов — афлатоксины *Aspergillus flavus* и фумонизины *Fusarium moniliforme*. Такие грибы могут развиваться также на арахисе, в молоке, пиве, какао, на изюме и сое. Отравления животных заплесневелыми кормами могут вызывать и другие виды грибов. Их споры также опасны для животных и человека, так как приводят к развитию инфекционных и аллергических заболеваний. Для предохранения семян и плодов от порчи применяют протравливание различными биоцидами, гидрофобизацию (покрытие нерастворимой пленкой) и стимуляцию естественной микробиоты питательными растворами.

18.1.6. Микробная порча некоторых напитков

Натуральные замороженные цитрусовые продукты обычно поражаются бактериями родов *Lactobacillus* и *Leuconostoc*, которые образуют горький диацетил. В разведенных соках развиваются дрожжи родов *Saccharomyces* и *Candida*, вызывающие спиртовое брожение. Вино поражается многими микроорганизмами, изменяющими его вкусовые качества. Так, образование осадка и пленок на поверхности происходит из-за развития в вине различных дрожжей (родов *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*), которые сбраживают остаточные сахара, снижают содержание спирта и образуют уксусную кислоту, ацетальдегид и ацетоин. Молочнокислосое скисание вина происходит под действием лактобацилл и лактококков. Вино становится мутным, а остаточные сахара и смесь органических кислот в нем превращаются в лактат, уксус и углекислый газ. Представители рода *Leuconostoc* образуют из сахара полисахарид декстран, что приводит к ослизнению вина. В присутствии воздуха под действием уксуснокислых бактерий может произойти образование уксуса из спирта.

К ухудшению качества пива приводит инфицирование его посторонними дрожжами («дикими» представителями родов *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*). Помутнение, скисание и ослизнение пива происходит под действием бактерий родов *Lactococcus*, *Lactobacillus* и *Pediococcus*. Педиококки также образуют горький диацетил, а также мукополисахариды, выпадающие в осадок.

Для предохранения напитков от порчи иногда применяют пастеризацию, но потребительские свойства напитков при этом могут ухудшаться. Широкое распространение получили такие способы защиты, как стерилизующая фильтрация, ультрафиолетовое и γ -облучение, внесение химических консервантов (сорбиновой кислоты и бензоата натрия), а также насыщение сернистым ангидридом. В предотвращении микробной порчи важную роль играет соблюдение режима хранения напитков.

18.1.7. Методы защиты продуктов от порчи

Выбор метода защиты определяется свойствами самого продукта, поражающих его микроорганизмов и стоимости процедуры.

Из воды, вин, пива, соков, напитков и других жидкостей микроорганизмы могут быть удалены фильтрацией, не изменяющей физические

и вкусовые качества продукта. Задержка микробного роста может быть осуществлена снижением температуры или **замораживанием**. Правда, при этом преимущества в росте могут получить психрофильные микроорганизмы, которые также способны портить продукты. Еще Л. Пастер предложил использовать повышение температуры как фактор, предупреждающий развитие микроорганизмов в продукте. Этот способ (**пастеризация**), заключающийся в нагревании продукта до температуры $< 100^{\circ}\text{C}$, избавляет от вегетативных клеток микроорганизмов. Нагревание термоустойчивых продуктов при повышенном давлении до температуры $> 100^{\circ}\text{C}$ (**стерилизация**), убивающее все формы живых организмов, также широко используется для предупреждения микробной порчи. Высушивание продуктов из замороженного состояния (**лиофилизация**) позволяет существенно увеличить сроки их хранения. **Химические консерванты**, предотвращающие порчу продуктов, включают простые органические кислоты, сульфит, оксид этилена, нитрит, бензоат и этилформиат. Эффективность этих веществ часто зависит от pH продукта. Например, лактат и пропионат действуют лучше при пониженном pH, когда они находятся преимущественно в недиссоциированной форме. В настоящее время большой популярностью стал пользоваться антибиотик **низин**, образуемый лактококками. Это полипептидный нетоксичный антибиотик, не используемый в медицинских целях и влияющий, в основном, на проницаемость ЦПМ грамположительных бактерий. Для контроля популяции микроорганизмов в продуктах питания могут применяться **электромагнитные излучения**: ультрафиолет, убивающий микроорганизмы на поверхности, и γ -излучение, проникающее внутрь продукта.

18.2. Микробное повреждение промышленных и бытовых объектов и материалов

Биоповреждения (**биокоррозия**) различных объектов и материалов имеют в своей основе как непосредственную микробную активность, так и агрессивные продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Микроорганизмы как группа обладают настолько широкими возможностями метаболизма, что практически любой материал может прямо или косвенно поддерживать их развитие. Это означает, что такой материал будет изменять свои свойства (часто в сторону ухудшения) под влиянием микроорганизмов, однако скорость процесса биокоррозии для разных объектов будет существенно различаться. Приведем лишь наиболее значимые примеры микробной биокоррозии.

Большой проблемой в нефтедобыче и производстве нефтепродуктов является биокоррозия трубопроводов и порча самого топлива. При транспортировании нефти по трубам на их внутренней поверхности образуется прочная пленка микроорганизмов. Она механически препятствует потоку и под ней формируются очаги коррозии. Повреждение материала трубы происходит по нескольким причинам. Микроорганизмы сообщества **био-пленки** относятся к разнообразным физиологическим группам, однако

основными «агрессорами» считаются микробы, использующие в своем метаболизме соединения серы (тионовые бактерии и сульфатредукторы). Тионовые бактерии окисляют серу, содержащуюся в сырой нефти, и образуют серную кислоту. Сульфатредукторы, осуществляя анаэробное дыхание, выделяют сероводород, вступающий в реакцию с железом. Клетки сульфатредукторов находятся в биопленке в слое, тесно прилегающем к внутренней поверхности трубы, и их периплазматический ферментный комплекс способен окислять Fe^0 до реакционноспособного Fe^{2+} . Двухвалентное железо связывается внеклеточно с сероводородом, полученным в результате сульфатного дыхания. Постепенное нарушение структуры металла приводит к разрыхлению стенки трубы и образованию отверстий в ней.

Нефть и нефтепродукты могут использовать многие микроорганизмы. Это представители дрожжей, псевдомонад, микобактерий, родококков и многие другие. Каждый микроорганизм потребляет определенный, свойственный только ему набор химических компонентов нефти, поэтому при развитии различных микробных сообществ изменения состава нефти будут разные. В хранилищах нефтепродуктов часто наблюдается рост на поверхности раздела фаз «вода — углеводород». Так растет, например, «керосиновый» гриб *Cladosporium resinae*.

Для борьбы с биокоррозией в нефтедобыче используют прежде всего сильнодействующие химические вещества-биоциды, замену металлических труб на более инертные пластиковые, облучение и механическую очистку труб и хранилищ. Все биоциды представляют собой очень ядовитые, экологически опасные вещества, а их действие имеет временный характер.

Порча произведений искусства и архитектурных памятников также в значительной степени происходит из-за биокоррозии. Микроорганизмы способны использовать натуральные компоненты красок в качестве питательных веществ для роста. Изменения картин, скульптур и каменных сооружений может происходить за счет выделения агрессивных продуктов (кислот, щелочей) и образования микротрещин при механическом внедрении гиф грибов и актиномицетов. Для борьбы с микроорганизмами в этих случаях применяют обработку различными ингибиторами, нанесение полимерных покрытий и соблюдение режима хранения (поддержание постоянной температуры, минимальной влажности, иногда бескислородных условий и т.д.).

Одна из современных проблем — это микробное загрязнение в электронной индустрии. Клетки микроорганизмов могут попадать на компьютерные чипы, уменьшая адгезию покрытий, что снижает время жизни транзисторов. В таких производствах применяют бидистиллированную, свободную от растворенных органических веществ и микроорганизмов воду, однако даже такая вода способна поддерживать микробный рост. Олиготрофные микроорганизмы могут расти при очень низких уровнях питательных веществ, вымытых из пластика трубок или адсорбированных из воздуха. Даже использование мембранных фильтров не гарантирует отсутствия микробного загрязнения, так как клетки нанобактерий способны проходить через фильтр с порами 0,22 мкм.

18.3. Болезнетворные микроорганизмы. Принципы выявления, профилактики и лечения инфекционных заболеваний

18.3.1. Бактериальные болезни

Болезнетворные представители имеются среди бактерий, грибов, простейших и вирусов, поэтому инфекционные заболевания человека и животных могут быть подразделены на группы по вызывающим их возбудителям. Характер взаимодействия паразита с макроорганизмом зависит от соотношения факторов патогенности возбудителя и факторов внутренней среды хозяина. Одним из основных факторов патогенности бактерий является образование ими ядовитых для макроорганизма веществ — **токсинов**. Такие возбудители, как клостридии, вызывающие раневые инфекции, коринебактерии дифтерии, иерсинии чумы, вибрионы холеры, бациллы сибирской язвы, стафилококки, стрептококки и др., продуцируют ядовитые вещества белковой природы, выделяемые из клетки в окружающую среду (экзотоксины). Эти токсины обладают свойствами ферментов, они чрезвычайно активны и действуют на макроорганизм в малых дозах. Как правило, их действие избирательно, т.е. они поражают клетки определенных органов и тканей хозяина. Экзотоксины инактивируются при нагревании и при обработке рядом химических соединений, например, формалином. Некоторые экзотоксины (столбнячный, дифтерийный и т.д.) расщепляются пищеварительными ферментами, другие (ботулинический, стафилококковый) устойчивы в желудочно-кишечном тракте. Гены, кодирующие образование экзотоксинов, часто расположены в плазмидах или в латентных фагах. Возбудители некоторых инфекций (брюшного тифа, гонореи, риккетсиозов и др.) производят токсины, прочно связанные с бактериальной клеткой и не выделяющиеся наружу (эндотоксины). Эндотоксины менее активны, вызывают поражения в больших дозах и обладают более общим действием. Это сложные сахаро-липидно-белковые комплексы, достаточно устойчивые к нагреванию и действию формалина. Липополисахаридная часть эндотоксина обладает токсичностью и вызывает повышение температуры тела, а белковая часть отвечает на антигенные свойства. Эндотоксины являются воспалительными агентами, увеличивающими проницаемость капилляров и вызывающими разрушение клеток хозяина. Некоторые бактериальные продукты обмена веществ также могут обладать токсическими свойствами и при накоплении в пищевых продуктах вызывать отравления. Так, при разложении белка происходит образование ядовитых аминов.

Организм способен обезвреживать не только сами бактериальные клетки, но и их токсины. Если хозяин полностью освобождается от возбудителя, то говорят о **стерильном иммунитете**. Такое состояние невосприимчивости формируется, например, после кори, натуральной оспы, коклюша и др. В ряде случаев при длительно протекающих заболеваниях невосприимчивость сопровождается присутствием в организме клеток возбудителя. Такой **нестерильный иммунитет** формируется при туберкулезе, проказе, сифилисе и т.д.

Защитная система хозяина узнает многие структуры и соединения бактериальной клетки, поэтому у бактерий в процессе эволюции выработались

механизмы «ухода» от факторов иммунитета. Особенно узнаваемой структурой бактерий является их клеточная стенка. Капсулообразование — это один из путей экранирования клеточной стенки, когда полисахаридные и белковые капсулы бактерий закрывают пептидогликан и липополисахариды, препятствуя активации комплемента сыворотки крови хозяина. Уклонение от фагоцитоза может происходить также путем образования покрытия из некоторых сывороточных белков хозяина на поверхности бактериальных клеток. Особый механизм **антигенного варьирования** позволяет бактериям быстро заменять компоненты в некоторых поверхностных структурах (жгутиках, липополисахаридах, пилиях, капсулах, белках клеточной стенки и т.д.) и тем самым снижать иммунный ответ. Бактерии образуют несколько экзопродуктов, инактивирующих защитные соединения хозяина. Это, например, ферменты, разрушающие комплемент, лизоцим, некоторые иммуноглобулины. Как правило, такие вещества обладают полифункциональным действием. Бактерии могут «обманывать» иммунитет хозяина с помощью **антигенной мимикрии**, когда паразит образует молекулы, сходные с молекулами организма хозяина. Утрата или дефектность клеточных стенок некоторых возбудителей делает их менее узнаваемыми для защитной системы макроорганизма.

У бактерий гены, кодирующие факторы патогенности и системы их выделения, располагаются тесными группами **«островами патогенности»** на кольцевой хромосоме. Изучение их структуры говорит о привнесенном, «чужеродном» характере «островов патогенности» для большинства возбудителей. Высказывается предположение, что «острова патогенности» являются результатом латерального переноса генов, однако механизм обмена этими участками хромосомы между бактериями остается неясным.

Традиционная классификация инфекционных заболеваний основана на свойствах вызывающих их возбудителей. В настоящее время описано множество бактериальных заболеваний, в разной степени опасных для человека. Ниже будут упомянуты некоторые наиболее значимые болезни.

Первая группа болезней вызывается **патогенными кокками**, развитие которых в организме человека приводит к воспалительным процессам с образованием гноя. Из грамположительных кокков наиболее известны как инфекционные агенты представители родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Стафилококки передаются чаще всего воздушно-капельным путем и проникают в организм через кожу и слизистые оболочки. Патогенность стафилококков обусловлена способностью синтезировать большое количество токсинов и ферментов. Стафилококковые воспалительные процессы могут поражать практически все органы и ткани человека. Тяжесть заболеваний при этом колеблется от легкого гнойничкового поражения кожи до пневмонии и заражения крови. Стафилококки, как правило, участвуют в смешанных инфекциях, отягощая течение дифтерии, туберкулеза, гриппа и многих других заболеваний. При попадании в пищевые продукты стафилококки быстро образуют токсины, которые ответственны за возникновение пищевых токсикоинфекций. При **стафилококковых инфекциях** формируется непродолжительный и слабый иммунитет, связанный со способностью этих возбудителей к антигенной мимикрии. Стрептококки являются возбудите-

лями острых инфекций верхних дыхательных путей, пневмонии, воспалений кожных покровов, ангины, скарлатины, заражения крови. Патогенные стрептококки вырабатывают различные экзотоксины. Заражение может происходить воздушно-капельным и контактным способом, а также через инфицированные продукты и при попадании в открытые раны. Условно патогенные стрептококки, являющиеся обычным компонентом нормальной микробиоты человека, при ослаблении макроорганизма могут вызывать эндогенные инфекции (лимфадениты, циститы, фарингиты, катары и др.). Перенесение **стрептококковых инфекций** приводит к формированию слабого и непродолжительного иммунитета из-за высокой антигенной изменчивости и мимикрии возбудителей. К грамположительным коккам чувствительны некоторые домашние и дикие животные.

Наиболее известные грамтрицательные кокки — это возбудители гонореи (гонококки *Neisseria gonorrhoeae*) и менингита (менингококки *N. meningitidis*). **Гонорея** передается от больного человека половым путем и иногда через предметы обихода. Возбудитель проникает через слизистые оболочки нижнего отдела мочеполовой системы и вызывает их острое гнойное воспаление, иногда затрагивающее и другие органы (матку, яичники, предстательную железу, семенники и даже прямую кишку). Гонококки образуют эндотоксин, освобождающийся при лизисе клеток возбудителя. Для гонореи характерно явление **незавершенного фагоцитоза**, при котором гонококки присутствуют в цитоплазме лейкоцитов. Врожденный иммунитет к этой болезни отсутствует, а перенесение заболевания не обеспечивает приобретения невосприимчивости, поэтому возможно многократное заражение. Менингококки вызывают гнойное воспаление оболочек головного и спинного мозга. Возбудитель попадает воздушно-капельным путем от больного человека или носителя на слизистую носоглотки, а затем проникает в лимфу, кровь и мозговую жидкость. Менингококки вырабатывают экзо- и эндотоксины, освобождающиеся при автолизе клеток. Устойчивый иммунитет приобретается не только в процессе перенесения заболевания, но и при здоровом носительстве менингококков, которые обитают на слизистой оболочке носоглотки. Животные в естественных условиях невосприимчивы к нейссериям гонореи и менингита.

Вторая группа заболеваний объединяет **кишечные инфекции**, возбудители которых представлены среди энтеробактерий и родственных микроорганизмов и составляют обширный список. Все они — грамтрицательные палочки, не образующие эндоспоры и способные к росту на простых средах. Среди них имеются как высокопатогенные виды, так и обычные условно патогенные члены нормальной микробиоты человека. Заражение осуществляется через рот, поражается прежде всего желудочно-кишечный тракт, а возбудитель выделяется в окружающую среду с испражнениями. Тяжелыми заболеваниями из этой группы являются брюшной тиф, дизентерия и сальмонеллез, вызываемые бактериями родов *Shigella* и *Salmonella*. Патогенность этих бактерий в значительной степени определяется выработкой сильных эндо- и экзотоксинов. При брюшном тифе и дизентерии источником инфекции является больной человек или носитель, сальмонеллезом можно заразиться также от больных животных и птиц. При **брюш-**

ном тифе возбудитель внедряется в кишечник, где развиваются воспалительные явления, затем попадает в лимфу и кровь и может заноситься в селезенку, печень, костный мозг и другие органы. На второй неделе заболевания начинается отравление организма из-за всасывания в кровь эндотоксина, выражающееся в нарушениях работы сердечно-сосудистой и нервной систем и в скачках температуры тела. На пятой неделе болезни бактерии из желчных протоков в большом количестве поступают снова в кишечник. При этом часть клеток удаляется с фекалиями, а другая часть внедряется в слизистую кишечника с образованием язв. До середины XX в. заболевание характеризовалось высокой смертностью, периодически возникали его эпидемии. В настоящее время при надлежащем лечении брюшной тиф протекает легче и не дает осложнений. После выздоровления возбудитель еще несколько недель может присутствовать в организме, а у некоторых людей носительство длится пожизненно. У переболевших формируется достаточно прочный иммунитет, повторные заболевания редки. При **дизентерии** возбудитель размножается в клетках слизистого и подслизистого слоев кишечника, выделяя сильные экзотоксины. Они всасываются через слизистую толстого кишечника, вызывая его отек и кровоточивость и приводя к общему отравлению организма. После перенесенной болезни формируется слабый кратковременный иммунитет, приводящий к многократным повторным заболеваниям или к хроническому течению. При **сальмонеллезе** возбудитель проникает в организм человека с пищей. Источником заражения могут быть больные животные, птицы и человек. В желудочно-кишечном тракте часть сальмонелл разрушается, освобождая эндотоксин. Сальмонеллы быстро распространяются в организме, попадая в кровь и уже там выделяя эндотоксин при разрушении клеток. Отравление выражается в нарушении пищеварения, подъеме температуры тела и тифозных явлениях. Иммунитет к сальмонеллам формируется слабый и кратковременный.

К энтеробактериям примыкают по своим культуральным и физиолого-биохимическим свойствам холерные вибрионы (*Vibrio cholerae*). **Холера** в недавнем прошлом вызывала периодические эпидемии и даже пандемии. Это особо опасное заболевание человека, характеризующееся быстротечностью и высокой смертностью. Холера является типичной кишечной инфекцией, возбудители которой передаются от больных и носителей через пищу, воду, на грязных руках и лапках мух и попадают через рот в кишечник. Размножение там холерных вибрионов приводит к образованию мощного экзотоксина, запускающего процесс обезвоживания организма. Холерные вибрионы синтезируют также целый набор гидролаз и сильный эндотоксин. При холере наблюдаются рвота, понос, нарушение пищеварения и общее отравление организма. При тяжелом течении температура тела снижается до 34°C, появляются судороги, ослабляется сердечная деятельность. В ряде случаев развивается холерная кома, приводящая к смерти. Животные в естественных условиях холерой не болеют. У больных, перенесших холеру, образуется прочный иммунитет.

Следующая группа болезней объединяет **зоонозные** бактериальные **инфекции**, возбудители которых поражают животных и передаются

от них человеку. Распространение заболевания, как правило, происходит несколькими путями. Клиническая форма болезни часто зависит от способа проникновения возбудителя в организм. К зоонозным инфекциям относятся бруцеллез, туляремия, чума, сибирская язва и некоторые другие. **Чума** является особо опасной быстротекущей и высоклетальной инфекцией, вызывавшей в прошлом периодические пандемии. В природе чумой болеют мелкие грызуны (мыши, крысы, суслики), а человеку она может передаваться при непосредственном контакте, через воздух или при укусе живущих на грызунах блох. В зависимости от места проникновения возбудителя возникает бубонная, легочная или септическая форма этой болезни. Симптомы появляются внезапно в виде сильного озноба, головной боли и головокружения. Кожа приобретает синюшный оттенок, а лицо принимает выражение «маски ужаса». При бубонной форме чумы у людей под мышками образуются опухоли (бубоны), быстро достигающие размера с кулак взрослого человека. За короткое время бубоны покрывают все тело. На коже появляются черные и багровые пятна. До применения антибиотиков болезнь в большинстве случаев заканчивалась смертью. Возбудитель чумы *Yersinia pestis*, родственная энтеробактериям, выделяет сильные экзотоксины и несколько гидролитических ферментов. У переболевших людей вырабатывается стойкий и длительный иммунитет. **Сибирской язвой** болеет мелкий и крупный рогатый скот, лошади, свиньи, олени и верблюды. Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* может передаваться человеку от больных животных через инфицированные предметы, поврежденные кожные покровы, мясо и испражнения, а также через воздух и даже укусы кровососущих насекомых. Болезнь протекает в трех основных формах: кожной, легочной и кишечной. На коже появляются карбункулы, на слизистой кишечника возникают кровоизлияния и очаги некроза, в дыхательной системе протекает тяжелая бронхопневмония. В отдельных случаях развивается заражение крови. Бациллы выделяются в окружающую среду с кожными отшелушиваниями, испражнениями и мокротой. Возбудитель обладает высокой устойчивостью и способен длительно сохраняться в виде эндоспор. Патогенность бацилл сибирской язвы связана с образованием комплекса экзотоксинов и набора гидролитических ферментов. После болезни человек становится длительно невосприимчив к повторному заражению.

Анаэробные инфекции вызывают представители рода *Clostridium*, крупные анаэробные палочки, образующие эндоспоры. К этой группе заболеваний относятся газовая гангрена, столбняк и ботулизм. Все возбудители являются типичными обитателями почв или представителями нормальной микрофлоры человека и животных. Клостридии **столбняка** и газовой гангрены попадают в организм при загрязнении открытых ран, в том числе царапин, землей. В природе многие животные являются носителями возбудителей столбняка, а болеют этой болезнью лошади и мелкий рогатый скот. Испражнения больных людей и животных также являются источником заражения. Попадая в рану, споры *C. tetani* превращаются в вегетативные клетки, которые размножаются и образуют сильный нейротоксин. Токсин кровью разносится по всему организму, раздражая нервные

окончания и вызывая судорожные сокращения мышц. Сокращение мышц спины придает телу лежащего человека характерную форму дуги, когда больной опирается на затылок и тазовую область, выгибаясь вверх. Спазм дыхательной мускулатуры приводит к удушью и смерти. Иммуни­тет у перенесших столбняк людей формируется слабый и непродолжительный, так что возможны повторные заболевания. **Газовая гангрена** вызывается, как правило, несколькими видами клостридий (наиболее часто встречается *C. istolyticum*). Представители каждого патогенного вида синтезируют экзотоксины и гидролазы, поражающие мышечную и нервную ткани, осуществляющие лизис компонентов крови и клеток тканей, вызывающие отеки и некрозы. Смерть наступает от удушья из-за разрушения эритроцитов и поражения нервных центров. Некоторые возбудители газовой гангрены вызывают заболевание у домашних животных (лошадей, свиней, овец, крупного рогатого скота). Причиной **ботулизма** является употребление в пищу мясных, рыбных и овощных продуктов, инфицированных возбудителями этого заболевания. Часто заражение происходит при приготовлении домашних консервов. Споры *C. botulinum* распространены повсеместно в почвах и попадают в пищевые продукты из-за несоблюдения технологии их обработки и приготовления. Прорастание спор и развитие вегетативных клеток в продуктах и в организме человека приводит к образованию сильнейшего ботулинического экзотоксина, который всасывается через кишечник в кровь. Ботулинический токсин не разрушается желудочным соком и поражает нервную, сердечно-сосудистую и мышечную ткани. Уже через сутки человек становится вялым, чувствует сухость во рту, головокружение и головные боли. Затем нарушается зрение и возникает слепота. В 60% случаев болезнь заканчивается смертью. Перенесенное заболевание не формирует стойкого иммунитета к ботулиническому токсину.

К группе заболеваний преимущественно детского возраста относят дифтерию и коклюш. **Дифтерия** передается от больного или носителя воздушно-капельным путем, через некоторые пищевые продукты или зараженные предметы. На месте внедрения возбудителя образуются пленки, содержащие массу клеток коринебактерий дифтерии и сопутствующих микробов. *Corynebacterium diphtheriae* — это грамположительные актинобактерии, плейоморфные клетки которых имеют характерные булавовидные утолщения на концах. Они продуцируют сильные экзотоксины, обладающие избирательным действием на сердечную мышцу, надпочечники и периферическую нервную систему. Способность образовывать токсины у коринебактерий зависит от наличия в клетках латентного фага. Экзотоксины сначала вызывают некроз и воспаление слизистых оболочек, а затем, всасываясь в кровь, отравляют весь организм. Значительное образование дифтерийных пленок может препятствовать дыханию и приводить к удушью у детей. Перенесение дифтерии формирует нестойкий иммунитет, поэтому иногда возможны повторные заболевания. **Коклюш** является тяжелым инфекционным заболеванием детей и вызывается грамотрицательными палочковидными бордетеллами. Передача возбудителя происходит от больного человека воздушно-капельным путем. Бордетеллы размножаются в слизистой оболочке верхних дыхательных путей и синтезируют

экзотоксины, вызывающие воспаление трахеи и бронхов. Раздражая нервные окончания, экзотоксины провоцируют затяжной приступообразный кашель. После болезни формируется прочный и длительный иммунитет.

Из группы болезней, вызываемых патогенными микобактериями, в настоящее время наибольшее распространение получил туберкулез. Это заболевание поражает как человека, так и многих животных. **Туберкулез** имеет затяжное хроническое течение, затрагивающее любые органы и ткани. Наиболее часто у человека повреждаются легкие и лимфатическая система. Заражение происходит через воздух, при употреблении инфицированных пищевых продуктов, через кожу и слизистые оболочки, а также внутриутробно. При проникновении в легкие микобактерии (*Mycobacterium tuberculosis*) формируют очаги в легочной ткани. В благоприятных условиях такие очаги постепенно рассасываются и рубцуются с образованием плотной соединительнотканной капсулы. Организм при этом не освобождается от возбудителя, он сохраняется иногда в течение всей жизни. В тяжелых случаях болезнь приводит к слабости, одышке, кровохарканью и разрушению ткани легких. При других способах заражения очаги образуются в лимфатических узлах. Микобактерии туберкулеза синтезируют набор протеолитических и липолитических ферментов и эндотоксины, освобождающиеся при разрушении клеток. Эндотоксины микобактерий разрушают митохондрии клеток хозяина, а продукты клеточного лизиса блокируют действие ферментов макроорганизма. Туберкулез сопровождается развитием аллергии. Заболевание может захватывать мочеполовую систему, мозговые оболочки, кожу, кости, суставы и т.д. и иметь многообразные клинические проявления. В распространении и течении этой болезни большую роль играют социальные факторы (низкий уровень жизни, плохое питание, скученность, тяжелые условия труда и др.). Приобретенный иммунитет является нестерильным.

Актиномикозы — это заболевания, вызываемые ветвящимися актинобактериями родов *Streptomyces*, *Actinomyces* и *Nocardia*. Возбудители могут внедряться в организм самыми разными путями. Источником заражения являются почва, воздух, растения, домашние животные, некоторые виды зерновой пищи. Проникновению микроорганизмов способствует наличие мелких травм кожи и слизистой и повреждения зубов. Внедрившийся возбудитель, развиваясь в виде мицелия, распространяется между слоями мышц и соединительной ткани, а также циркулирует в крови и лимфе. Болезнь может иметь местное или генерализованное проявление в форме поражения кожных покровов, внутренних органов и систем хозяина. Патогенность ветвящихся актинобактерий связана с наличием комплекса мощных гидролаз и образованием эндотоксина. Хроническое воспаление сопровождается нагноительными процессами и некрозом тканей. В гное обнаруживаются плотные скопления из нитей возбудителя. Невосприимчивость после болезни не формируется.

Патогенные спирохеты вызывают ряд серьезных заболеваний человека, наиболее известные из которых сифилис и возвратный тиф. Возбудитель **сифилиса** *Treponema pallidum* (бледная спирохета) имеет тонкие клетки с 10—15 крутыми завитками и обладает активной подвижностью.

Она может длительно находиться в организме в покоем состоянии, образуя цисты. Проникновение возбудителя в организм происходит контактным путем через слизистые половых органов, рот и плаценту. Источником заражения чаще всего служит больной человек и иногда предметы, к которым он прикасался. Скрытый период болезни может длиться до 3 мес. На месте внедрения трепонемы размножаются и вызывают появление хрящеподобных язвочек, что сопровождается увеличением и уплотнением лимфатических узлов. Эта стадия болезни продолжается около 6 недель. Вторая стадия длительностью от двух до нескольких лет характеризуется высыпаниями на коже и слизистых оболочках и поражением внутренних органов, костной и нервной ткани. Третичный период протекает несколько лет и приводит к распаду кожных покровов, подкожного слоя и тканей внутренних органов. В последней стадии трепонемы поселяются в мозговой ткани, поражая центральную нервную систему и спинной мозг и вызывая прогрессирующий паралич. После перенесенного сифилиса формируется слабый непродолжительный нестерильный иммунитет и развивается аллергия. Возвратный тиф бывает двух видов: эпидемический и клещевой. Возбудителями **возвратного тифа** являются спирохеты рода *Borrelia*, обладающие более крупными клетками с несколькими нерегулярными завитками. При эпидемической форме возбудители передаются от больного человека при укусах платяных вшей. Боррелии размножаются в тканях лимфоидно-макрофагальной системы, а затем проникают в кровь. Разрушение части клеток освобождает эндотоксин, поражающий центральную нервную систему. У больного развиваются токсикоз, лихорадка, слабость и функциональные нарушения. Происходит отравление кровеносной системы, некроз селезенки и печени. Температура тела повышается до 39–40°C, увеличивается селезенка, возникают тошнота и рвота. Боррелии, находящиеся в глубоких органах и тканях, способны видоизменяться и «уходить» от действия иммунной системы человека. Их последующее размножение провоцирует очередные 3–5 приступов болезни, пока все вновь возникшие разновидности возбудителя не будут обезврежены. Длительность каждого следующего приступа уменьшается, а периоды между ними увеличиваются. Эпидемический возвратный тиф дает слабый и кратковременный иммунитет. Источником клещевого возвратного тифа являются дикие грызуны и насекомоядные животные, от которых возбудитель переносится человеку при укусе клещей. Картина течения болезни схожа с возвратным тифом первой формы, но число приступов может достигать девяти. Перенесенное заболевание формирует стойкий иммунитет.

Особенностями **микоплазм** являются отсутствие клеточной стенки и малые размеры клетки. Инфекционный процесс при микоплазмозах протекает в соответствии со второй стратегией паразитизма. Уклонение от иммунной системы хозяина происходит путем варьирования ответственных за прикрепление соединений, а также с помощью антигенной мимикрии. «Похожесть» микоплазменных антигенов на структурные белки хозяина переключает иммунную систему макроорганизма на разрушение собственных тканей. Набор патогенных факторов микоплазм включает формирование слизистых слоев на поверхности клетки, выделение

литических ферментов в непосредственной близости от клеток хозяина и образование активных форм кислорода, вызывающих при контакте окислительный стресс в клетках хозяина. Микоплазмы вырабатывают также эндотоксин. У некоторых домашних животных и грызунов микоплазмы вызывают плевропневмонию, а у людей поражают дыхательную, мочеполовую, сердечно-сосудистую и нервную системы. Заболевания характеризуются затяжным течением, сопровождаются лихорадкой, воспалительными процессами и общей интоксикацией организма.

Риккетсии и хламидии — это особая группа возбудителей, которой свойственен облигатный внутриклеточный паразитизм. **Риккетсии** обитают в цитоплазме и ядре клеток животных, человека и членистоногих-переносчиков (вшей, блох, клещей). У кровососущих переносчиков они не вызывают симптомов заболевания и выделяются с испражнениями и слюной. Млекопитающие при их укусах заражаются различными видами сыпных тифов и лихорадок (пятнистая, марсельская, Q, цуцугамуши и др.). Среди **риккетсиозов** наибольшее распространение имеют эпидемический сыпной тиф и лихорадка Q. При эпидемическом **сыпном тифе** источником является больной человек, а переносчиками — головная и платяная вошь. Риккетсии из крови больного, попавшие при укусе в кишечник вши, размножаются там и выделяются с испражнениями. Заражение происходит путем проникновения в ранки и ссадины возбудителя с кожи и предметов, загрязненных фекалиями вшей, или при раздавливании переносчика. Патогенность риккетсий связана с выработкой термолабильного токсина. Болезнь характеризуется лихорадочным состоянием и появлением сыпи. Возбудитель циркулирует в крови и лимфатической системе и поражает сосуды кожи, внутренних органов и мозга. Это приводит к их закупорке, нарушению снабжения тканей питательными веществами и кислородом и в конечном итоге к гибели клеток. Заболевание часто заканчивается смертью, а при выздоровлении формируется прочный иммунитет. Повторные случаи связаны с активизацией возбудителя у носителей при ослаблении организма. К эпидемическому сыпному тифу восприимчивы также некоторые млекопитающие, в том числе обезьяны. Возбудитель **лихорадки Q** паразитирует на многих домашних и диких животных и переносится клещами. Заражение происходит при укусе клеща, а также через воздух, воду, пищу и предметы, загрязненные фекалиями клещей. Больные животные выделяют возбудителей с молоком, мочой, испражнениями и околоплодной жидкостью. Риккетсии легко проникают через поврежденную кожу, дыхательные пути и слизистые оболочки и внедряются в ткани и органы лимфатической и кровеносной системы, вызывая явление **незавершенного фагоцитоза**. Болезнь может протекать в форме пневмонии, лихорадки или менингита, сопровождаясь подъемом температуры до 39—40°C, ознобом, сильной головной болью, слабостью и бессонницей. Заканчивается заболевание, как правило, выздоровлением с образованием прочного и длительного иммунитета. **Хламидии** паразитируют в клетках птиц и млекопитающих и способны вызывать ряд заболеваний человека (пситтакоз, трахому, конъюнктивит, венерическую лимфогранулому). При попадании в цитоплазму клеток позвоночных хламидии проходят плейоморфный цикл

развития, причем возбудители каждой стадии обладают разными инфекционными свойствами. **Трахома и конъюнктивит** — это воспалительные заболевания глаз, передающиеся контактным путем через грязные руки и предметы обихода. Половым путем передается венерическая лимфогранулема, при которой поражаются кожа, мочеполовые органы, суставы и увеличиваются лимфатические узлы. **Пситтакоз** (орнитоз) протекает как воспаление легких с повышением температуры и развитием аллергического состояния. Возбудитель обнаруживается в крови, а в тканях и органах хламидии проходят сложный жизненный цикл, нарушая метаболизм клеток хозяина и вызывая общее отравление организма. Источником инфекции являются дикие и домашние птицы, выделяющие возбудителей с фекалиями. Заражение людей происходит при уходе за птицей и при ее разделке через воздух и продукты птицеводства, загрязненные экскрементами птиц. Болезнь часто протекает в хронической форме. Перенесение хламидиоза формирует слабый и краткосрочный иммунитет с возможностью повторного заболевания.

18.3.2. Заболевания, вызываемые грибами

Заболевания, вызванные патогенными грибами, называются **микозами**. Большинство грибов является типичными обитателями почвы, и человек для них — случайный хозяин. У здоровых людей грибы обнаруживаются на поверхности кожи и слизистых оболочек и входят в состав нормальной микрофлоры. В неблагоприятных условиях и при ослаблении организма они могут становиться возбудителями заболеваний. Патогенные грибы могут передаваться при непосредственном контакте через кожу и слизистые, попадать в ранки с почвой или вдыхаться вместе с пылью и частичками эпидермиса. Их споры или обрывки мицелия внедряются в ткани и там размножаются. При этом могут поражаться только поверхностные структуры (кожа, ногти, волосы, слизистые), более глубоко лежащие ткани или весь организм. Некоторые патогенные грибы способны продуцировать экзотоксины, другие образуют эндотоксины. При микозах, как правило, формируются местные повреждения в виде очагов, в которых развиваются гифы гриба. Глубокие поражения обычно осуществляются дрожжеподобными формами, для которых характерно явление незавершенного фагоцитоза. Большинство микозов сопровождается развитием гиперчувствительности замедленного типа. Основную защитную функцию у человека выполняют неспецифические факторы. Попавшие в организм токсичные продукты грибов могут привести к галлюцинациям, нарушениям пищеварения, поражению печени и закончиться смертью. Микотоксины вырабатываются грибами при росте на ряде продуктов растительного происхождения (зерне, арахисе, чайном листе и др.). Так, паразитический гриб спорынья, обитающий в соцветиях ржи, образует сильный микотоксин. При переработке зараженного спорынью зерна токсин попадает в хлеб и может вызвать у человека конвульсии и смерть.

18.3.3. Протозойные инфекции

Патогенные представители есть во всех группах простейших. Они способны вызывать заболевания не только у человека, но и у многих, в том

числе домашних, животных. Возбудители могут передаваться самыми разнообразными путями, а болезни часто характеризуются длительным и тяжелым течением. Распространению некоторых простейших помогает образование цист. Как правило, возбудители **протозойных инфекций** имеют многостадийный жизненный цикл. В процессе болезни развивается состояние аллергии. Заражение свободноживущими почвенными амебами, для которых человек является случайным хозяином, может происходить при попадании на слизистую оболочку носа при купании в пресноводных водоемах. Амебы проникают в мозг и вызывают его обширные поражения. Достаточно обычный путь проникновения простейших в организм хозяина — это попадание в желудочно-кишечный тракт пищи и воды, загрязненных фекалиями с цистами возбудителя. Так передаются лямблии, энтамебы и инфузории, вызывающие разные виды **дизентерии**, и изоспоры, приводящие к **кишечным инфекциям**. Данные микроорганизмы обладают достаточно простым жизненным циклом с вегетативной стадией, представленной несколькими формами клеток, и стадией цисты. Цисты токсоплазмы могут попадать в организм не только путем заглатывания, но и при вдыхании. Токсоплазмоз поражает многих животных, среди которых особое значение для передачи человеку имеют собаки и кошки. Заболевание охватывает весь организм и протекает с разной степенью тяжести. Разные виды патогенных трипаносом переносятся от больных животных при укусах мухи цеце (сонная болезнь) и клещей (болезнь Чагаса). **Сонная болезнь** протекает хронически, сопровождаясь лихорадочными приступами с отеком мозга и поражениями почек. Возбудители обитают в мышечной ткани и спинномозговой жидкости. Больной испытывает прогрессирующую сонливость и может впасть в состояние комы, часто заканчивающееся смертью. При **болезни Чагаса** повышается температура, отекает лицо, увеличиваются лимфатические узлы, щитовидная железа, селезенка и печень. Патогенные лейшмании в зависимости от вида вызывают поражение кожных покровов, носоглотки, лимфатических узлов, селезенки, печени и костного мозга. Они переносятся москитами от больных людей или животных. При кожной форме образуются множественные язвочки, глубокое поражение органов сопровождается лихорадкой. Патогенные трихомонады вызывают **инфекции мочеполовых путей** и передаются при половом контакте и через предметы обихода. Возбудитель не образует цисты и поэтому не может долго сохраняться в окружающей среде. Болезнь чаще всего протекает в хронической форме. Наиболее сложным жизненным циклом обладает малярийный плазмодий, передающийся при укусах комаров и вызывающий разные типы **малярии**. Половая стадия проходит в организме комара, а бесполоя — в клетках тканей и эритроцитах человека. При этом образуются различные морфологические и функциональные формы паразита. От самки комара со слюной при укусе нитевидные клетки возбудителя попадают в кровь человека и разносятся в органы и ткани. Внедряясь в клетки, паразит становится округлым, увеличивается в размере и затем делится на множество мелких клеточек. На этом этапе у зараженных людей не наблюдается клинических проявлений болезни. Далее часть мелких клеток проникает в эритроциты и превращается в аме-

боидные тельца, периодически делящиеся и вновь заселяющие эритроциты. Разрушение эритроцитов приводит к анемии, а выделение особых веществ при распаде красных кровяных клеток и самих паразитов вызывает поражение костного мозга, селезенки, почек, сопровождающееся лихорадочным состоянием. При тяжелом течении и повторных приступах могут наступить кома и отек мозга со смертельным исходом. Следующей стадией является превращение малярийного плазмодия в два вида половых форм. При укусе больного человека такие формы возбудителя попадают в желудок комара, где происходит их слияние с образованием подвижных зигот. Они внедряются в стенку желудка комара, где теряют подвижность, увеличиваются в размерах и делятся на множество мелких нитевидных клеток. Нитевидные клетки накапливаются в слюнных железах комара и при укусе могут попасть в организм здорового человека. Иммуитет при протозойных инфекциях, как правило, кратковременный и нестойкий. Только перенесение лейшманиоза формирует сильный и длительный иммунитет.

18.3.4. Особенности вирусных инфекций

Вирусы — это облигатные внутриклеточные паразиты, вызывающие многочисленные заболевания человека и животных. Взаимодействие с клеткой начинается с прикрепления вирусной частицы на ее поверхность (рис. 18.1). Затем содержимое вирусной частицы (нуклеиновая кислота и комплекс ферментов) проникает в клетку, а белковая оболочка вируса, как правило, остается снаружи. Нуклеиновая кислота вируса начинает транскрибироваться и реплицироваться с использованием как вирусных, так и клеточных ферментов.

У ДНК-содержащих вирусов нуклеиновая кислота сразу может считываться автономно или встраиваться в клеточные хромосомы, а РНК-вирусы сначала с помощью обратной транскриптазы синтезируют ДНК, используя свою РНК как матрицу. Внедрение вирусной ДНК меняет направление клеточного метаболизма в сторону синтеза компонентов вирусных частиц. Клетка хозяина начинает в больших количествах производить вирусные нуклеиновые кислоты и белки, которые при достижении определенной концентрации самособираются в вирусные частицы. Образование наружной оболочки у некоторых форм вирусов осуществляется из компонентов ЦПМ клеток хозяина. Выход зрелых вирусных частиц может происходить путем полного разрушения клетки хозяина или с помощью местного повреждения ЦПМ. Образовавшиеся зрелые вирусы могут заражать новые клетки хозяина, проходя в них такой же цикл развития.

Перенос вирусов может осуществляться воздушно-капельным путем, через пищевые продукты и воду, загрязненные фекалиями, при укусах животных и при непосредственном контакте с больным или предметами его обихода. В месте первичного проникновения вирусы могут размножиться и далее распространяться в организме с кровью и лимфой. В клетках, зараженных вирусами, нарушается нормальный метаболизм, и создаются условия для размножения вирусов. Одним из действующих факторов при этом служит синтез вирусных токсинов. Токсические вещества вирусов ингибируют реакции цикла трикарбоновых кислот и изменяют содержание ряда

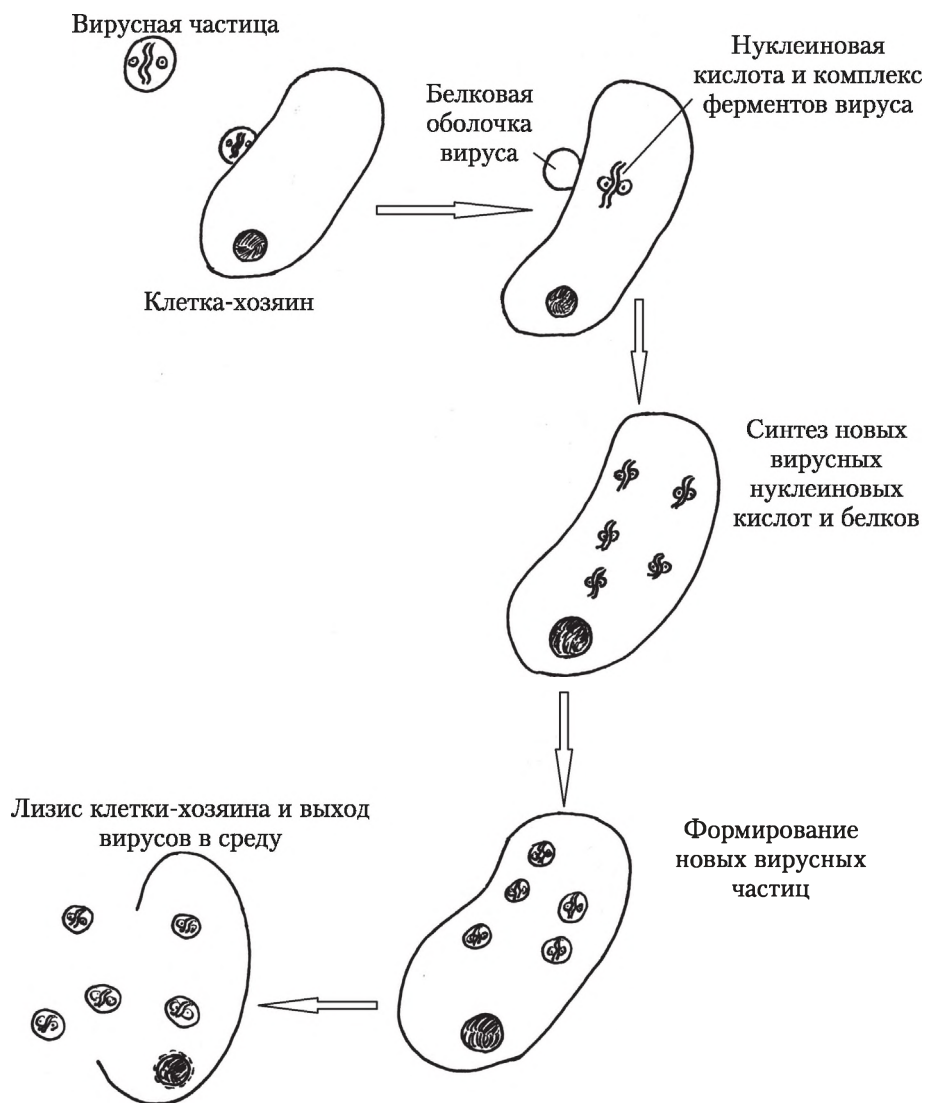


Рис. 18.1. Взаимодействие вируса с клеткой

метаболизм в клетках хозяина. Это приводит к различным нарушениям на уровне макроорганизма: изменяется состав структурных белков и ферментов, меняют морфологию форменные элементы крови, возникают воспалительные процессы в лимфатических узлах, повышается температура тела, повреждаются органы и ткани. Внедрение вирусной нуклеиновой кислоты приводит к повреждению наследственного аппарата клеток хозяина. На уровне организма это может спровоцировать неконтролируемое клеточное размножение (возникновение раковых опухолей) и повысить частоту хромосомных заболеваний (например, болезни Дауна).

Вирусы характеризуются высокой специфичностью к хозяину и способностью поражать определенные органы и ткани. Это связано с наличием особых структур (**рецепторов**) на поверхности клеток хозяина, которые

«узнаются» рецепторами определенного вируса и обеспечивают его прочное прикрепление. Вирусы, как и любые другие возбудители, должны пройти все стадии инфекционного процесса и преодолеть защитные барьеры макроорганизма. Однако при вирусной инфекции организм мобилизует и некоторые особые механизмы. Первым неспецифическим фактором защиты от вирусов является программируемая гибель зараженных клеток (**апоптоз**). «Самобийство» инфицированной клетки не дает вирусу размножиться и заразить соседние клетки. Вирусы способны размножаться внутри макрофагов.

Особой противовирусной защитной реакцией организма является выработка **интерферона** — специального белка, препятствующего размножению всех типов вирусов. Интерферон запускает образование ингибитора белковой природы, блокирующего трансляцию вирусных белков. Этот ингибитор способен диффундировать в соседние клетки и предотвращать их поражение вирусами. Каждый вид животных образует свой интерферон. Некоторые вирусы (например, вирус натуральной оспы) синтезируют специальные белковые продукты, ингибирующие апоптоз и образование интерферона. Неспецифическую защиту обеспечивают также белковые ингибиторы вирусной активности, имеющиеся в выделениях слизистых оболочек хозяина. Специфическая защита обуславливается выработкой антител, которые нейтрализуют внеклеточные вирусные частицы. Т-лимфоциты разрушают зараженные вирусами клетки, освобождая вирусные частицы, которые немедленно подвергаются действию антител и неспецифических факторов защиты. Многие вирусы способны вызывать реакции гиперчувствительности замедленного типа. Внедрение в организм вирусных частиц, при размножении приобретающих наружную оболочку из компонентов клеток хозяина, может провоцировать аутоиммунные нарушения. При этом специфические защитные реакции будут направлены не только на вирусы, но и на собственные клетки макроорганизма.

Течение вирусного инфекционного процесса может происходить в острой, хронической или латентной форме. При **латентных инфекциях** вирусы длительное время находятся в организме хозяина без проявления симптомов заболевания. При этом наблюдается две возможности. В первом случае заражение и выделение вирусов осуществляется лишь небольшой частью клеток хозяина, иммунная система которого удерживает число вирусных частиц на постоянно низком уровне. Во втором случае вирус не выделяется в окружающую среду и часто остается включенным в геном клеток хозяина. Его репликация не повреждает клетки, которые при размножении передают вирус «по наследству» дочерним клеткам. Особую группу составляют **медленные инфекции**, инкубационный период которых может продолжаться несколько лет. Обычно они связаны с поражением нервной системы, имеют прогрессирующий характер и заканчиваются смертью. Считается, что эти инфекции обусловлены замедлением всех защитных реакций организма.

Вирусы вызывают множество различных заболеваний человека. Ниже приведены лишь некоторые наиболее известные и распространенные вирусные инфекции. **Натуральную оспу** вызывает крупный ДНК-содержащий вирус, передаваемый при непосредственном контакте с заразным материалом

или через воздух. Вплоть до прошлого века эта болезнь вызывала эпидемии с 40—100%-й смертностью. У больного резко поднимается температура, кружится голова и возникает общая слабость. Через 3—4 дня на теле появляются многочисленные пузыревидные высыпания, которые в случае выздоровления превращаются в рубцы. Вирусы во время болезни обнаруживаются в крови. После перенесенной оспы формируется прочный и длительный иммунитет.

Бешенство — это смертельная болезнь человека и животных, поражающая центральную нервную систему. РНК-содержащий вирус бешенства выделяется со слюной и передается при укусе больного животного. Источником инфекции могут быть домашние и дикие животные (собаки, кошки, лисы, волки и т.д.). Зараженное животное отличается беспокойным, пугливым поведением, отсутствием аппетита, обильным слюнотечением. При контакте с человеком животное стремится укусить его. Симптомы болезни после укуса могут появиться через 15—30 дней, а иногда и через год. Из места укуса вирус бешенства распространяется по нервным путям в центральную нервную систему, кровь и лимфу. У человека развивается повышенная возбудимость, усиленное пото- и слюноотделение, судороги глотательных и дыхательных мышц, параличи. Через 5—7 сут. наступает смерть от остановки дыхания.

Возбудитель **гриппа** передается от человека к человеку воздушно-капельным путем и периодически вызывает эпидемии и даже пандемии. Вирусы гриппа содержат одноцепочечную РНК и обладают чрезвычайной изменчивостью и антигенной мимикрией. Проникая через носоглотку, они внедряются в клетки слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Вирусные токсины всасываются в кровь и вызывают общее отравление организма. Симптомами болезни являются кашель, насморк, повышение температуры, ломота в суставах, покраснение глаз. Грипп опасен также значительным снижением иммунитета к другим инфекциям и часто вызывает различные осложнения. Течение болезни утяжеляет возникновение состояния аллергии. После перенесенной болезни возникает иммунитет к определенному типу вируса гриппа разной длительности (от 1 до 5 лет), не препятствующий заражению другим типом.

К болезням детского возраста относятся корь и свинка. РНК-содержащий вирус **кори** поражает только человека и передается через воздух или при непосредственном контакте. Проникая через верхние дыхательные пути и поражая их ткань, вирус попадает в кровь. Для кори характерно состояние лихорадки и появление сыпи сначала на лице, а затем по всему телу. У переболевших детей формируется прочный и длительный **нестерильный иммунитет**, при котором вирус кори находится в латентном состоянии. Возбудитель **свинки (паротита)** — это РНК-содержащий вирус, передающийся воздушно-капельным путем. Болезнь характеризуется лихорадкой и воспалением околоушных, подчелюстных и подязычных лимфатических и слюнных желез. В тяжелых случаях вирус попадает в кровь, проникает в другие органы и центральную нервную систему, поражая мозговые оболочки. После болезни формируется стойкий пожизненный иммунитет.

Несущие ДНК герпес-вирусы являются возбудителями таких известных заболеваний, как ветряная оспа и простой герпес. Вирус **простого герпеса**

может передаваться воздушно-капельным и контактным путями, в том числе внутриутробно и при родах от матери к ребенку. Вирус размножается на поверхности и в глубине кожных покровов и слизистых оболочек с образованием зудящих высыпаний на губах, носу, внутренних поверхностях ротовой и носовой полостей, на половых органах. После выздоровления вирус сохраняется в организме, периодически вызывая клинические проявления. Активизации вируса способствуют различные неблагоприятные условия (охлаждение, нарушения питания, нервные расстройства и т.д.). Иммуитет на этот вирус не вырабатывается. **Ветряная оспа** чаще всего поражает детей до 10 лет и передается контактным путем и через воздух. Первичное размножение возбудителя происходит в клетках верхних дыхательных путей, а затем с кровью разносится по всему организму. Поражение кожных покровов приводит к отмиранию эпителиальных клеток и образованию пузырьков. У больных повышается температура, возникает озноб, наблюдаются вялость, потеря аппетита, рвота и понос. Во рту и зеве формируются характерные язвочки. Высыпания сопровождаются зудом. При тяжелом течении могут повреждаться некоторые органы и головной мозг. После болезни остается стойкий пожизненный иммунитет.

РНК-содержащий полиовирус является возбудителем **полиомиелита**. Он попадает в организм через рот с пищей и водой, загрязненными испражнениями больного человека, через грязные руки и предметы обихода, а также переносится на эти предметы с помощью мух. Вирус размножается сначала в слизистых оболочках носоглотки и кишечника, затем попадает в кровь и с ней переносится в спинной мозг. Воспаление нервной ткани при тяжелом течении приводит к параличу мышц. Полиовирус выделяется в окружающую среду с фекалиями больных людей и носителей. У переболевших людей наблюдается стойкий пожизненный иммунитет. К РНК-содержащим вирусам относится возбудитель **клещевого энцефалита**. Источник инфекции — различные мелкие животные (грызуны, птицы), а переносчик — иксодовый клещ. Вспышки заболевания наблюдаются в весенне-летний период. При укусе клеща вирус попадает в подкожную клетчатку и размножается там. С током крови возбудитель проникает в центральную нервную систему. При этом возникают лихорадка, сонливость, бессонница, нарушаются двигательная активность и чувствительность, может появиться паралич мышц шеи и плечевого пояса. Болезнь сопровождается аллергическими реакциями. Иммунитет после перенесения болезни формируется стойкий и пожизненный.

Источником вирусов **гепатитов** различных форм являются больные люди и носители, выделяющие возбудители с фекалиями, мочой и кровью. Заражение возможно через загрязненную пищу и воду, при различных инъекциях, воздушно-капельным путем и при непосредственном контакте. Попадая в организм, вирусы гепатита размножаются в лимфатических узлах, проникают в кровь и лимфу и поражают печень, почки и селезенку. Печень перестает выполнять свою барьерную функцию, что приводит к отравлению всего организма и отмиранию тканей. У человека кожа и белки глаз приобретают желтый оттенок (желтуха), регистрируются боли в печени и постоянное небольшое повышение температуры тела. Перене-

сение вирусного гепатита А дает прочный и длительный иммунитет, после гепатита В формируется иммунитет слабой напряженности. Устойчивость к одному из типов гепатита не предохраняет от заражения другим его видом.

В середине XX в. широкое распространение получил **вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)**. Особенности строения (рис. 18.2, а) и жизненного цикла (рис. 18.2, б) позволяют ему использовать вторую стратегию паразитизма. ВИЧ наиболее часто передается половым путем. Этот путь наиболее надежен и обеспечивает непрерывность распространения вируса в человеческой популяции, поскольку он способствует сохранению и размножению самого вида-хозяина. Вирусная частица несет внутри себя две нити РНК и набор ферментов и специальных белков, окруженный белковым каркасом. Эту сердцевину покрывает еще один слой белка, поверх которого находится наружная оболочка, «позаимствованная» у клетки хозяина при выходе зрелой вирусной частицы. Это двуслойная липидная мембрана, несущая вирусные гликопротеины, расположенные на внешней поверхности и трансмембранно.

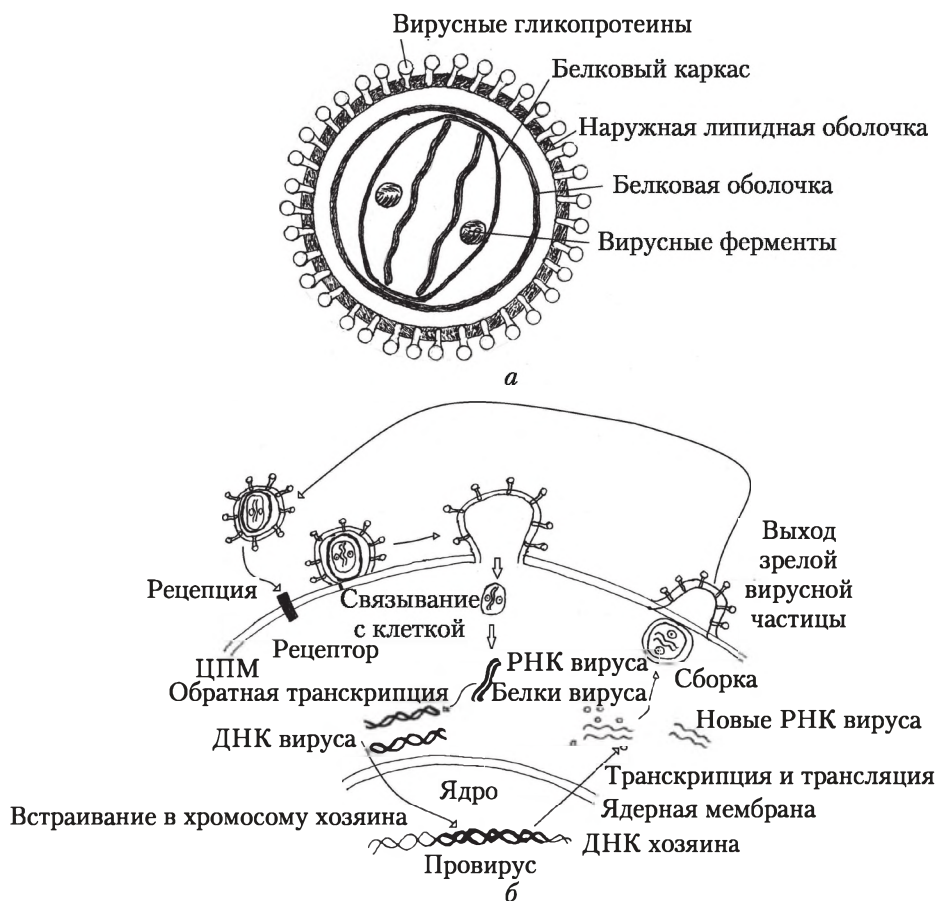


Рис. 18.2. Вирус иммунодефицита человека:

а — строение; б — жизненный цикл

При попадании вируса в организм внешние гликопротеины участвуют в «узнавании» рецепторов клетки хозяина и прикреплении к ней. После этого сердцевина проникает внутрь клетки и освобождает вирусную РНК, разрушая с помощью протеолитических ферментов белковый каркас. Специальный вирусный фермент **обратная транскриптаза** осуществляет синтез ДНК на РНК-матрице. Образовавшаяся вирусная ДНК встраивается в геном клетки хозяина и в таком состоянии **провируса** может длительно присутствовать в организме без клинических проявлений, передаваясь от клетки к клетке при делении. Провирус не имеет антигенных свойств и поэтому не выявляется иммунной системой хозяина. При активировании провируса в зараженной клетке образуется множество вирусных продуктов, которые собираются в зрелые вирусные частицы. При выходе из клетки происходит их отпочковывание с захватом участка ЦПМ и разрушением клетки хозяина. Наличие такой наружной оболочки обеспечивает экранирование антигенов ВИЧ от иммунной системы макроорганизма. Вирусные гликопротеины наружной оболочки, имеющие антигенные свойства, подвержены сильной изменчивости. ВИЧ поражает Т-лимфоциты и фагоциты, внутри которых он может размножаться.

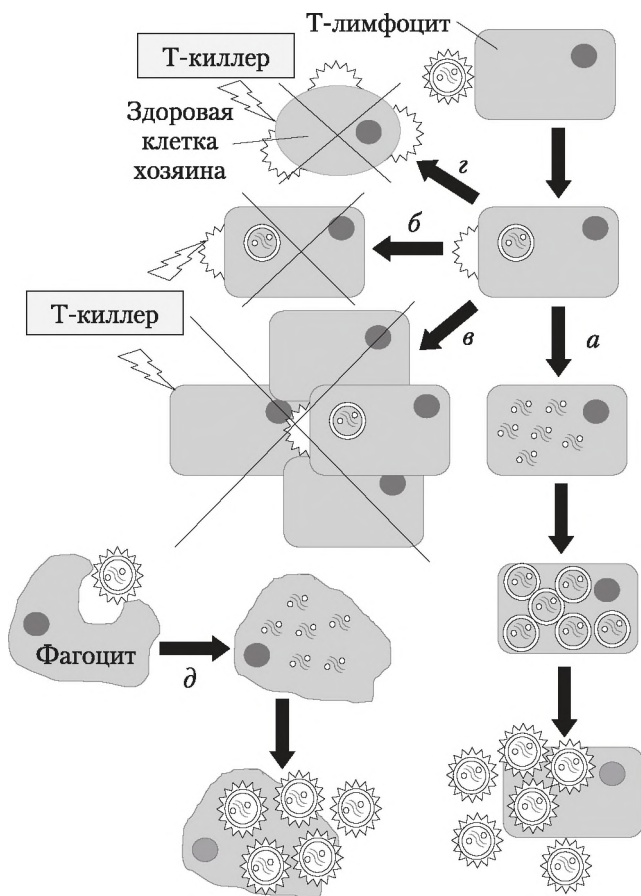


Рис. 18.3. Развитие состояния иммунодефицита (пояснения см. в тексте)

Т-клетки разрушаются при выходе из них зрелых вирусных частиц (рис. 18.3, а). Т-киллеры убивают инфицированные, но не разрушенные вирусами Т-клетки, несущие на поверхности вирусный гликопротеин (рис. 18.3, б). Уменьшению числа Т-лимфоцитов способствует процесс их слипания между собой, вызванный присутствием вирусных гликопротеинов на поверхности зараженных Т-клеток. Эти гликопротеины соединяются с рецепторами здоровых Т-лимфоцитов, привязывая их к зараженной клетке. Таким образом, образуются многоклеточные неактивные агрегаты, уничтожаемые Т-киллерами (рис. 18.3, в). Внешний гликопротеин ВИЧ может попадать в кровь в свободном виде и связываться с рецепторами нормальных клеток, которые иммунной системой распознаются как зараженные и уничтожаются (рис. 18.3, г). Этот гликопротеин может также провоцировать аутоиммунные процессы, так как он похож на многие тканевые рецепторы человека и антитела к нему способны атаковать собственные ткани. При этом захват фагоцитами образовавшихся комплексов «антитело — ВИЧ» только способствует развитию инфекционного процесса (рис. 18.3, д).

Все эти процессы вызывают прогрессивное снижение активности иммунной системы человека и приводят к существенному нарушению метаболизма и полному истощению организма больного. ВИЧ вызывает непрерывное образование в инфицированных макрофагах и клетках центральной нервной системы клеточных токсинов, приводящее к отравлению организма человека. Вирус способствует также уничтожению клеток иммунной памяти. Все эти повреждения приводят к тому, что защитные силы организма уже не могут эффективно противостоять обычным, в том числе условно патогенным, возбудителям инфекционных заболеваний, и такое состояние носит название **синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД)**. По мере снижения числа лимфоцитов в крови проявляются сначала поражения кожи и слизистых оболочек, вызванные вирусом герпеса, дрожжевыми формами, туберкулезными микобактериями и др. У больных наблюдаются уменьшение массы тела, лихорадочные состояния, понос. Многие инфекции приобретают генерализованный характер и тяжелое течение. На поздней стадии активируются атипичные микобактерии и цитомегаловирусы, приводящие в конечном итоге к смерти больного.

18.3.5. Выявление болезнетворных агентов

Развитие многих возбудителей в организме хозяина может вызывать сходные клинические проявления. Так, подъем температуры, увеличение лимфатических узлов, кашель, слабость характерны для целого ряда заболеваний. Для эффективного противодействия инфекции необходимо прежде всего выявить возбудитель. Эта задача решается комплексно с помощью микроскопирования, культивирования и выделения инфекционного агента, а также с использованием биохимических, иммунологических и молекулярно-биологических тестов. Обнаружение возбудителя начинается со взятия проб биологического материала, в котором на данной стадии заболевания его пребывание наиболее вероятно. Например, при респираторных заболеваниях берут материал из горла или полости носа. При этом руководствуются общими правилами забора и доставки проб для

микробиологического анализа. Одновременно исследуют на наличие возбудителя жидкости тела (кровь, спинномозговую жидкость и т.д.), которые у здорового человека не содержат микроорганизмы и вирусы. Лабораторная диагностика с использованием методов классической микробиологии проводится, как правило, по стандартной схеме с использованием дифференциально-диагностических сред и биохимических тестов. На первой стадии готовят препараты живых клеток или фиксированные окрашенные препараты для микроскопии, а также проводят посев материала на селективные питательные среды для накопления и выделения возбудителя. Затем изучают физиологические и биохимические свойства полученной культуры и определяют ее систематическое положение. Иногда для воспроизведения картины заболевания используют лабораторных животных.

Следование требованиям триады Коха не всегда возможно, так как некоторые возбудители не удается выделить в чистой культуре и ко многим болезням человека подопытные животные не восприимчивы. Несмотря на упрощение классической микробиологической диагностики с проявлением готовых индикаторных сред и тест-наборов для экспресс-методов, это исследование длится от трех дней до нескольких недель. Определить инфекционный агент непосредственно в материале больного, без выделения чистой культуры, можно молекулярно-биологическими методами. Эти методы позволяют быстро обнаружить в пробе нуклеотидные последовательности ДНК возбудителя.

Сократить время лабораторного определения причины заболевания позволяет также применение методов иммунодиагностики. С помощью этих методов можно выявить антиген (сам возбудитель или его компоненты) или продукты его взаимодействия с макроорганизмом (антитела). В первом случае применяют антитела, полученные на этот антиген путем введения небольших его доз в кровь животного (лошади, кролика и др.). У животного вырабатываются соответствующие антитела, которые затем выделяют и используют для постановки реакций. Первая фаза **серологических реакций** заключается в образовании комплекса «антиген-антитело». Во второй фазе возникают видимые изменения реакционной смеси (образование хлопьев, осадка или растворение клеток). Результат реакции зависит от физико-химических условий ее проведения, состояния антигена (взвесь или раствор) и наличия дополнительных участников (чаще всего, комплемента). Для ускоренного обнаружения комплекса «антиген — антитело» используют антитела, к которым химическим путем присоединены радиоактивные, окрашенные или светящиеся компоненты. Чтобы определить продукты взаимодействия возбудителя с организмом человека (антитела), необходимо располагать набором известных антигенов. Такие препараты антигенов (**диагностикумы**) представляют собой либо взвесь микробов или вирусов, либо их компоненты, адсорбированные на различных носителях (частицах латекса, эритроцитах и т.д.). Эта группа методов служит не только для уточнения диагноза заболевания, но и для оценки иммунного статуса организма, т.е. его способности активно отвечать на агрессию возбудителя. При этом определяют количественный и качественный состав всех антител в крови и нарастание количества антител к данному возбудителю по мере развития болезни.

Ряд заболеваний (туберкулез, сифилис, сибирская язва, свинка, простой герпес и др.) характеризуется состоянием повышенной чувствительности к повторному введению возбудителя. Это свойство используется при постановке аллергической пробы с внутрикожным введением возбудителя или его продуктов. Положительным результатом реакции считают припухлость и покраснение места укола, говорящее о наличии неинфекционной аллергии. Так, известная реакция Манту позволяет определить наличие в прошлом контакта человека с микобактериями туберкулеза. Поскольку результат реакции будет положительным у инфицированных, переболевших и привитых лиц, а также у здоровых носителей, то его следует считать ориентировочным и подкреплять более детальным исследованием.

18.3.6. Способы профилактики и лечения инфекционных заболеваний

Для предохранения человека от инфекционных заболеваний (**профилактики**) применяют как меры общего характера, так и специфические приемы защиты. К общим мероприятиям относятся соблюдение чистоты и снижение количества патогенных микроорганизмов и вирусов в среде, окружающей человека. Большое значение здесь имеет **гигиена** — система мер по обеспечению оптимальных условий существования, сохранения здоровья и продления жизни. Простые приемы личной и общественной гигиены (частое мытье рук с мылом, влажная уборка помещений, проветривание, обработка питьевой воды и пищи перед употреблением, рациональный режим питания и т.д.) позволяют не только существенно снизить содержание микробов и вирусов в воздухе, воде, продуктах и на предметах обихода, но и замедлить распространение инфекции.

Специальными способами, направленными на прерывание путей передачи заболеваний, являются дезинфекция, дезинсекция и дератизация. **Дезинфекцией** называют уничтожение инфекционных агентов с помощью химических веществ с сильным антимикробным действием. Например, в медицинских учреждениях систематически проводят уборку помещений и протирание всех поверхностей с применением растворов хлорной извести, хлорамина, карболовой кислоты и др. Хорошо известны дезинфицирующие свойства растворов йода и бриллиантовой зелени («зеленки»). Под **дезинсекцией** понимают уничтожение членистоногих-переносчиков ряда заболеваний (вшей, клещей, комаров), позволяющее прервать цепочку их передачи. Ту же цель преследует **дератизация**, т.е. истребление грызунов, являющихся переносчиками или резервуарами инфекционного агента. Важная роль в общей профилактике отведена мерам по оздоровлению условий труда и быта, закаливанию организма, повышению иммунного статуса и предупреждению травматизма. Для пресечения распространения заболевания существенное значение имеют раннее выявление больных, их изоляция от здоровых людей и проверка работников учреждений медицины, питания и водоснабжения на носительство инфекционных агентов.

Специфическая профилактика заключается в формировании искусственного иммунитета. Для создания активного искусственного иммунитета используют антигенные препараты двух видов. **Вакцины** — это препараты, содержащие живые или убитые инфекционные агенты или их компоненты, которые вызывают развитие иммунного ответа. Такие пре-

параты должны быть безвредными для макроорганизма, не давать побочных и аллергических реакций. Живые вакцины состоят из ослабленных или авирулентных культур микроорганизмов и вирусов, а убитые содержат мертвых, но не разрушенных возбудителей. Вакцины могут включать только отдельные структуры или соединения разрушенных инфекционных агентов, а также вещества, усиливающие иммунный ответ. На современном этапе получили распространение генно-инженерные вакцины, в которых непатогенные бактерии и вирусы несут в себе участки ДНК возбудителей, ответственные за синтез антигенов. Наибольшей длительностью и активностью характеризуется иммунитет, полученный при использовании живых вакцин. Они по сути дела вызывают протекание заболевания в очень легкой форме. Живые вакцины широко применяют для предотвращения туберкулеза (вакцина БЦЖ), чумы, сибирской язвы, бешенства, натуральной оспы, полиомиелита, кори, свинки и др. Убитые вакцины получают путем прогрева и обработки ультрафиолетом или химическими веществами. Иммунитет при их использовании образуется непродолжительный и менее активный. Примерами убитых вакцин служат дизентерийная, гонококковая, коклюшная, холерная вакцины. Генно-инженерными являются вакцины против гепатита В. Отдельные компоненты возбудителей содержат, например, менингококковая, гриппозная и пневмококковая вакцины.

Второй вид антигенных препаратов — это анатоксины. **Анатоксином** называют экзотоксин, потерявший отравляющие свойства, но сохранивший способность вызывать иммунный ответ. В нашей стране широкое применение имеют дифтерийный и столбнячный анатоксины. Введение вакцины в организм человека или животного называется **прививкой** (иммунизацией). Иммунизацию проводят по плану и при возникновении опасности заражения среди отдельных групп населения в определенных районах или при профессиональном контакте с возбудителем. Например, при выезде в некоторые страны необходимо делать прививки от заболеваний, не характерных для территории России. Плановые прививки в нашей стране осуществляются в детском возрасте в соответствии с прививочным календарем. Для них применяют туберкулезную вакцину БЦЖ, адсорбированную коклюшно-дифтерийно-столбнячную вакцину АКДС, живую полиомиелитную вакцину, вакцины против кори, свинки и гепатита В. Поддержанию выраженного иммунного ответа способствует повторная вакцинация через определенное время. Так, взрослому населению рекомендуется раз в десять лет прививаться от дифтерии и столбняка.

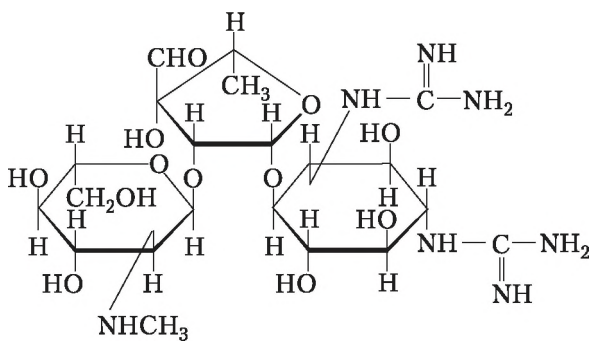
Пассивный искусственный иммунитет формируют с помощью антимикробных и антитоксических **сывороток**, содержащих готовые антитела. Иммунные сыворотки используются для экстренной профилактики некоторых заболеваний у лиц, находившихся в контакте с больными. Они обеспечивают защитное действие не дольше трех недель. Препараты антител получают от переболевших или специально иммунизированных людей и животных. В медицинской практике применяют концентрированные, очищенные от посторонних белков иммуноглобулины против чумы, сибирской язвы, столбняка, бешенства, гриппа, дифтерии и т.д. Препараты готовых антител к возбудителям и их токсинам используют для лечения острых заболеваний тяжелого течения. При столбняке, ботулизме, гангрене и дифтерии обязательно применяют соответствующие антитоксические препара-

раты антител. Для борьбы с хроническими и вялотекущими инфекциями иногда используют антигенные препараты для стимуляции собственных защитных сил организма. Введение убитых лечебных вакцин имеет целью усилить иммунный ответ и перевести заболевание в острую форму.

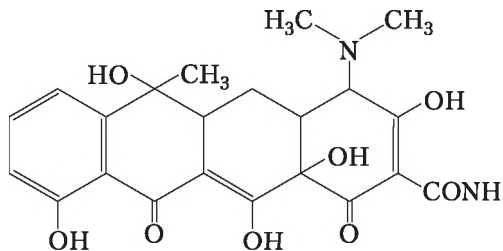
Для лечения инфекционных заболеваний применяют целый ряд химических препаратов, направленных против возбудителей и относительно безвредных для макроорганизма. Такие соединения должны быть достаточно устойчивы во внутренней среде организма и не накапливаться в нем. Однако, к сожалению, многие препараты вызывают побочные действия и обладают определенной токсичностью. Препарат тем лучше, чем меньше его **химиотерапевтический индекс** — отношение минимальной терапевтической дозы к максимально переносимой. Существует несколько классификаций лечебных препаратов. Наиболее часто их делят по направленности действия (противогрибковые, противовирусные, противопротозойные и антибактериальные) и по химическому строению. Так, сульфаниламидные препараты (стрептоцид, норсульфазол, сульфадиметоксин и др.) применяют при гнойно-родных заболеваниях, ангине, пневмонии, цистите, гангрене и т.д. Нитрофураны (фуразолидон, фурадонин и др.) используют для лечения кишечных и почечных инфекций. Производные ртути, мышьяка, сурьмы и висмута (ртутная серная мазь, новарсенол, стибозан, битиурол и др.) назначают при венерических заболеваниях и протозойных инфекциях. Особенности вирусов как облигатных внутриклеточных паразитов диктуют подход к лечению вирусных заболеваний, отличный от способов борьбы с бактериальными болезнями. Противовирусных лечебных средств существенно меньше (интерферон, ацикловир, нуклеазы, аналоги тимидина, уридина, глутамина).

Особую группу лечебных препаратов составляют **антибиотики** — низкомолекулярные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, обладающие в малых дозах (10^{-4} г/мл) высокой физиологической активностью. Они избирательно задерживают рост или полностью подавляют развитие определенной группы микроорганизмов или злокачественных опухолей. Каждый антибиотик характеризуется набором объектов (спектром действия), которые к нему чувствительны. Различают антибиотики широкого (цефалоспорины, тетрациклины, макролиды и др.) и узкого (пенициллин, линкомицин и др.) спектра действия.

Антибиотики классифицируют по разным признакам. По биологическому происхождению различают бактериальные (стрептомицин, грамицидин и др.), грибные (пенициллин и др.), растительные (фитонциды) и животные (лизозим) антибиотики. Химическое строение антибиотиков столь разнообразно (рис. 18.4), что выделяют 10 и более их групп. Так, по одной из классификаций все антибиотики делятся на ациклические (например, нистатин), алициклические (актидион), ароматические (хлорамфеникол), тетрациклины (тетрациклин, клиндамицин), хиноны (фумигатин), кислородсодержащие гетероциклические соединения (пенициллины, цефалоспорины), сопряженные диены (олигомицины), макролиды с лактонным кольцом (эритромицин), аминокликозиды (стрептомицин), азотсодержащие гетероциклы (продигиозин), полипептиды (грамицидин, полимиксин), азолы (клотримазол, дифлюкан).



Стрептомицин (аминогликозид)

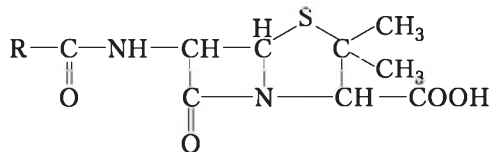
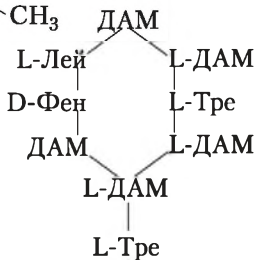


Тетрациклин

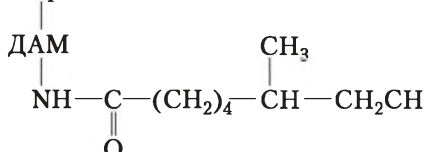


Эритромицин (макролид)

Хлорамфеникол



Пенициллины (β -лактамы)



Полимиксин В (полипептид)

Рис. 18.4. Химическая структура некоторых известных антибиотиков

Антимикробное действие антибиотиков заключается в нарушении обмена веществ у возбудителя заболевания. Для разных антибиотиков мишенью служат разные стадии метаболизма. По механизму антимикробного действия антибиотики составляют несколько групп. Пенициллины и цефалоспорины относятся к ингибиторам синтеза пептидогликана. Так как этот гетерополисахарид есть только у прокариот, то антибиотики этой группы обладают низкой токсичностью по отношению к клеткам животных и человека. Аминогликозиды, полиеновые и полипептидные антибиотики повреждают ЦПМ и нарушают ее функционирование. Хлорамфеникол, стрептомицин, эритромицин, тетрациклин входят в группу соединений, подавляющих синтез белка на разных его этапах. Актиномицин и рифампицин относятся к веществам, нарушающим образование в клетке нуклеиновых кислот. Особую группу антибиотических веществ составляют **бактериоцины** молочнокислых бактерий — вещества полипептидной природы, используемые в пищевой промышленности. Бактериоцины убивают микробные клетки, образуя множественные отверстия в их ЦПМ. Так, известный бактериоцин **низин** оказывает бактерицидное действие на стафилококки, стрептококки, пневмококки, микобактерии, бациллы и клостридии.

В настоящее время получено и изучено значительное число антибиотиков. Однако многие из них обладают высокой токсичностью и теряют активность в организме человека, поэтому лишь небольшая часть может использоваться в качестве лекарственных средств. Для производства антибиотиков используют штаммы-продуценты спорообразующих бактерий, стрептомицетов и плесневых грибов и специальные питательные среды.

В профилактических целях, в период реабилитации, при поддерживающей и заместительной терапии в современной медицине используют как живые клетки мутуалистической микробиоты (**пробиотики**), так и препараты для стимуляции симбионтной микробиоты и пробиотических культур. Эти вещества-**пребиотики**, не перевариваемые в верхних отделах ЖКТ человека, способствуют поддержанию и развитию мутуалистических микроорганизмов нормальной микробиоты, в частности, бифидобактерий, лактобацилл и лактококков. Они представляют собой низкомолекулярные углеводы с β -гликозидными связями, наиболее известным из которых является лактулоза. Комплексные препараты, содержащие живые клетки пробиотических культур вместе с веществами-пребиотиками, которые будут стимулировать их развитие в кишечнике, носят название **синбиотиков**.

18.3.7. Проблемы борьбы с инфекционными заболеваниями

Человечество научилось успешно бороться со многими инфекционными заболеваниями, однако при этом возник ряд новых проблем. Активное применение лечебных препаратов привело к возникновению **множественной лекарственной устойчивости** — устойчивости возбудителя сразу к нескольким ранее эффективным препаратам. Так, после открытия антибиотиков смертность от ряда болезней значительно снизилась, однако по прошествии времени для достижения такого же лечебного эффекта приходилось все время повышать дозу приема препарата. В настоящее время традиционные антибиотические препараты вообще не действуют

на возбудителей туберкулеза, стафилококковых инфекций, дизентерии. Многие «побежденные» были инфекционные агенты, видоизменившись под действием факторов окружающей среды и под прессингом лечебных препаратов, стали вызывать более опасные формы заболеваний, не поддающиеся классическим схемам лечения (*Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, вирус черной оспы и т.д.). Микроорганизмы, обладающие такой устойчивостью, либо способны к ферментативному разрушению лекарства, либо могут поддерживать крайне низкие концентрации препарата внутри клетки путем его выброса.

Возникновению множественной лекарственной устойчивости способствовало несколько факторов. Во-первых, в природе всегда существуют микроорганизмы, обладающие естественной устойчивостью к подобным веществам. Во-вторых, при массовом использовании препарата он становится фактором отбора уже возникших мутаций устойчивости. В-третьих, гены, определяющие факторы устойчивости, расположены на **плазмидах**, которые легко передаются от клетки к клетке в популяции путем горизонтального переноса. Одна плазида может нести на себе сразу несколько таких генов. Распространению устойчивости среди бактерий способствует применение антибиотиков и других лекарств не только по прямому назначению как антимикробных агентов, но и для профилактики, как стимуляторов роста в ветеринарии и растениеводстве, консервантов в пищевой промышленности, а также свободная их продажа через аптечную сеть и неграмотное использование при самолечении. В лечебных учреждениях для исключительных случаев существует несколько антибиотиков «стратегического запаса». Эти антибиотики не продаются в аптечной сети, а при лечении не должны попадать в окружающую среду с выделениями больного, чтобы в ответ не появились устойчивые формы микробов. Для преодоления множественной лекарственной устойчивости возбудителей проводится постоянный поиск новых антибиотиков, а также химическая модификация известных молекул, которая без потери физиологической активности может сделать вещество «неузнаваемым» для систем резистентности возбудителя. Важной научной задачей является изучение микробных транспортных систем, отвечающих за выброс лекарственных веществ, и выяснение путей их подавления. Введение таких веществ-ингибиторов в лекарственные препараты позволит добиться повышения его внутриклеточной концентрации у возбудителя и понизить принимаемую больным дозу.

Одной из проблем современности является возникновение «новых» инфекционных болезней. Это неизвестные ранее болезни или заболевания, существовавшие ранее в другом географическом районе или проявлявшиеся с небольшой частотой. К факторам, способствующим распространению таких болезней, относятся изменения климата, внедрение человека в неосвоенные регионы, перемещение населения, вызванное войнами, катастрофами, путешествиями, биологический терроризм и развитие индустрии обслуживания человека. Например, глобальное потепление привело к распространению moskitov, переносящих желтую лихорадку, в несвойственные им регионы. Активная миграция населения и скученность людей в городах ведет к распространению возбудителей из изолированных районов в густонасе-

ленные регионы и дальше по всему миру по транспортным путям. Контакты людей с экзотическими животными и аборигенами на ранее не освоенных территориях способствуют обмену патогенами и занесению необычных возбудителей в человеческую популяцию. Заражение диких животных от людей формирует вторичные природные очаги побежденных и контролируемых инфекций. Так, от людей к обезьянам могут передаваться возбудители малярии, полиомиелита, проказы, туберкулеза.

Нарушение современных технологий, применяемых в обслуживающих человека областях, приводит к значительным последствиям. Например, заражение большого числа пациентов медицинского учреждения может произойти при различных инъекциях, исследованиях внутренних органов, трансплантациях и хирургическом вмешательстве. Ситуация усугубляется несовершенством диагностики ряда возбудителей (ВИЧ, вирусов герпеса, гепатита, микоплазм) в препаратах крови и в стационарах. Опасны также лабораторные генно-инженерные эксперименты, приводящие к сочетанию агрессивных свойств возбудителей. Утечка инфекционного материала в этом случае может привести к возникновению вспышки «новой» болезни. Индустриальная переработка сырья и приготовление пищи во много раз увеличивают тяжесть последствий нарушений технологии. Потребление свежих растительных продуктов может приводить к заражению человека из почвенного резервуара. Концентрация сельскохозяйственных животных в крупных хозяйствах способствует постоянному поддержанию возбудителя в популяции.

Ослабление внимания к уже известным и хорошо изученным возбудителям приводит к тому, что вызываемые ими болезни снова получают значительное распространение. Так, массовый отказ от профилактических прививок в 90-е гг. прошлого века спровоцировал вспышку дифтерии в России. Последние данные говорят о том, что многие болезни, ранее не считавшиеся инфекционными, вызываются микроорганизмами (например, возбудителем язвы желудка и двенадцатиперстной кишки является *Helicobacter pylori*). В ситуации, когда распространение инфекционных агентов с первой стратегией паразитизма ограничено мерами профилактики, терапии и карантина, в человеческом обществе появляются возбудители, осуществляющие вторую стратегию паразитизма и способные передаваться при невысокой плотности населения.

18.3.8. Оценка безопасности воды, воздуха, почвы и пищевых продуктов

Область медицинской микробиологии, изучающую влияние микробиоты окружающей среды на здоровье человека, называют **санитарной микробиологией**. Санитарно-микробиологические исследования включают как определение общего количества микроорганизмов и вирусов в воде, воздухе, почве, на предметах обихода и в пищевых продуктах, так и обнаружение возбудителей конкретных заболеваний. Для этого используют две группы методов: прямые и косвенные. Методы косвенной оценки позволяют судить о потенциальной опасности данного объекта для здоровья людей. Так, при определении **общего микробного числа (микробной обсемененности)** полагают, что чем большее количество микроорганизмов присутствует в пробе, тем более вероятно наличие среди них патоген-

ных форм. Этот метод широко применяется в санитарной микробиологии и учитывает содержание мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАМ) в 1 мл или 1 г исследуемого материала. Подготовленную пробу высевают на чашки Петри с МПА и после определенного срока выдерживания при благоприятной температуре подсчитывают число выросших колоний. Для учета микроорганизмов, не способных расти на МПА в таких условиях (грибов, анаэробных, нитрифицирующих, азотфиксирующих и других бактерий), проводят дополнительные посевы на соответствующие среды. Общую обсемененность можно определить также методами прямого подсчета клеток под микроскопом.

Специфическим методом косвенной оценки является определение санитарно-показательных микроорганизмов. К **санитарно-показательным микроорганизмам (СПМ)** относят представителей нормальной микробиоты человека и теплокровных животных, обитающих в желудочно-кишечном тракте или в дыхательных путях. Такие микроорганизмы должны постоянно присутствовать в значительных количествах в выделениях и достаточно долго выживать в окружающей среде. Их учет должен быть простым и быстрым. Сами по себе СПМ могут и не представлять опасности для здоровья, но их наличие в пробе говорит о ее загрязненности выделениями человека и животных. Предполагают, что чем больше объект загрязнен такими выделениями, тем больше вероятность присутствия патогенных микроорганизмов. Содержание СПМ выражают в виде титра или индекса. **Титр** — это количество исследуемого материала (в миллилитрах или граммах), в котором содержится 1 микробная клетка. Величина, обратная титру, называется индексом и означает количество СПМ в 1 л жидких, 1 г твердых или 1 см³ газообразных веществ. Чаще всего СПМ выявляют путем посева на специальные диагностические среды, которые изменяют свои свойства при развитии на них определенной группы микроорганизмов. Набор выявляемых санитарно-показательных микроорганизмов зависит от природы исследуемого материала.

Наиболее важными СПМ считаются **бактерии группы кишечной палочки (БГКП)**, природным резервуаром которых является желудочно-кишечный тракт человека и животных, а в окружающей среде (за исключением продуктов питания) они не размножаются и не могут длительно сохраняться. Наличие кишечной палочки (*Escherichia coli*) и энтерококка (*Enterococcus faecalis*) говорит о свежем фекальном загрязнении, так как они выживают вне организма всего несколько дней. Если в пробе обнаруживается протей (*Proteus vulgaris*), то кроме загрязнения фекалиями, это свидетельствует о наличии процесса гниения. Выявление *Clostridium perfringens*, длительно сохраняющегося в окружающей среде, позволяет судить о давнем загрязнении экскрементами и о содержании в пробе анаэробных споровых бактерий — возбудителей опасных заболеваний человека. О загрязнении разлагающимися отбросами говорит резкое увеличение количества термофильных представителей лактобацилл и стрептококков, способных размножаться при 50–60°С.

Золотистый стафилококк и гемолитические стрептококки попадают на объекты окружающей среды воздушно-капельным путем из носо-

глотки, зева и с кожных покровов человека. Наличие этих микроорганизмов позволяет судить о возможном загрязнении исследуемого материала возбудителями респираторных инфекций. Методы прямого обнаружения патогенных микроорганизмов однозначно свидетельствуют о наличии возбудителя в окружающей среде. Для этого проводят посевы на специальные питательные среды с последующим выделением патогена в чистую культуру. Определение возбудителя ведут с использованием биохимических, молекулярно-биологических и серологических реакций. Прямое обнаружение патогена требует существенных затрат времени и затруднено незначительным содержанием и неравномерным распределением возбудителя в пробе на фоне сапротрофных микроорганизмов. Поэтому прямое выделение патогенов в санитарно-микробиологических исследованиях обычно проводят только в том случае, когда косвенная оценка свидетельствует о возможном их наличии в пробе.

Содержание микроорганизмов в открытых водоемах зависит от концентрации органических веществ и других физико-химических факторов. На число микробных клеток в подземных водах влияют глубина залегания и фильтрующая способность грунта. Загрязнение воды происходит при попадании ливневых и сточных вод и различных отходов. Стоки населенных пунктов содержат фекальные выделения и большое количество микроорганизмов, многие из которых способны некоторое время выживать в водоемах. Среди них могут присутствовать и возбудители опасных заболеваний. Микробиологические показатели определяют для воды централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, плавательных бассейнов, артезианских скважин и т.д.

Санитарно-микробиологическую оценку воды проводят путем определения общего микробного числа и содержания СПМ. Воду открытых водоемов для исследования отбирают в стерильные флаконы в количестве 500 мл с глубины 10–15 см. Водопроводные краны сначала протирают спиртом и обжигают, затем в течение 15 мин спускают воду и только потом заполняют стерильный флакон. Флакон для хлорированной воды должен содержать дехлоратор (гипосульфит натрия). Общее микробное число воды определяют путем глубинного посева в МПА в чашках Петри. После выдерживания чашек с посевами при 37°С в течение суток подсчитывают число колоний, образовавшихся на поверхности и в глубине среды. Для хорошей питьевой воды общее количество микробов в 1 мл не должно быть выше 100. При значении 100–150 питьевая вода считается сомнительной, а при 500 и выше — загрязненной. Для питьевой воды определяют также **коли-индекс** (число клеток БГКП в 1 л воды) и **коли-титр** (количество миллилитров воды, в котором содержится 1 клетка этой группы). Так, показателем чистой воды в Российской Федерации является коли-титр более 500 (в Европе более 300).

Определение коли-титра и коли-индекса воды проводят двухэтапным бродильным методом или с помощью мембранных фильтров. При использовании бродильного метода определенные объемы воды вносят в емкости с диагностической средой, содержащей индикатор изменения кислотности и глюкозу. После выдерживания 24 ч при 37°С отмечают наличие мутности, выделение газа, изменение цвета индикатора (т.е. выделение

кислоты или щелочи). Если в среде отсутствуют помутнение, выделение кислоты и газа, то результат считают отрицательным (БГКП в данном объеме воды не обнаружены). Из положительных вариантов делают посев петлей на специальную агаризованную среду Эндо для получения отдельных колоний. Если через 18 ч роста при 37°С не выросли характерные колонии, то результат считают отрицательным. Признаками характерных колоний являются красная, розовая или бледно-розовая окраска, круглая форма, блестящая поверхность и ровный край, иногда наличие металлического блеска. Из таких колоний делают фиксированные окрашенные по Граму препараты и ставят тест на наличие оксидазы. БГКП не имеют оксидазной активности и по Граму окрашиваются отрицательно. Искомые параметры определяют с помощью специальной таблицы (табл. 18.4).

Таблица 18.4

Определение коли-титра и коли-индекса для воды

Объем исследуемой воды, мл				Коли-индекс	Коли-титр
100	10	1,0	0,1		
–	–	–	–	Менее 9	Более 111
–	–	+	–	9	111
–	+	–	–	10	105
+	–	–	–	23	43
+	–	+	–	94	10
+	+	–	–	230	4
+	+	–	+	960	1
+	+	+	–	2380	0,4
+	+	+	+	Более 2380	Менее 0,4

Примечание. «+» — наличие БГКП; «–» означает отсутствие признаков роста.

По методу мембранных фильтров воду сначала фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. При этом микробные клетки остаются на поверхности фильтра. Фильтры затем раскладывают на поверхность среды Эндо в чашках Петри и выдерживают 18–24 ч при 37°С. Красные и темно-красные колонии с металлическим блеском и без него, выросшие на поверхности фильтра, подсчитывают и проверяют на принадлежность к БГКП, как в бродильном методе. Прямое обнаружение патогенов (сальмонелл, холерных вибрионов, возбудителей тифов, дизентерии, энтеровирусов) проводят только после подтверждения опасного фекального загрязнения.

В воздухе (особенно в закрытых помещениях) могут присутствовать патогенные микроорганизмы, выделяемые человеком через верхние дыхательные пути и с поверхности кожных покровов. При оценке санитарного

состояния воздуха определяют общее микробное число и наличие СПМ. Максимально допустимый предел микробной обсемененности нормируется только для медицинских учреждений и спецпроизводств. Общее микробное число определяют в 1 см³ воздуха по числу колоний, выросших на чашке Петри с МПА. Самым простым способом определения является седиментационный метод, когда чашки с МПА оставляют открытыми на 5—10 мин, а затем закрывают и выдерживают 1—2 сут. при 20—30°С. Считается, что под действием силы тяжести на поверхность среды в открытой чашке Петри оседают все частицы (в том числе и клетки) из 10 л воздуха и каждая клетка дает колонию. Отбор проб воздуха с помощью специальных аппаратов позволяет повысить точность определения общего микробного числа. Для выявления СПМ воздуха — золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и гемолитических стрептококков (штаммы *Streptococcus pyogenes*), используют агаризованные среды, содержащие цельную кровь или плазму. Золотистый стафилококк также хорошо развивается при повышенном содержании поваренной соли на молочно- или желточно-солевом агаре. На них колонии СПМ образуют зоны гемолиза или коагуляции. Прямое выделение патогенов проводят из воздуха медицинских стационаров для выявления возбудителей внутрибольничных инфекций. На ряде предприятий пищевой и микробиологической промышленности следят за содержанием микроорганизма-продуцента в воздухе производственных помещений.

Санитарно-микробиологическая оценка почвы проводится при определении пригодности земли для земледелия, застройки, организации зон отдыха и т.д. Почвы в целом характеризуются высоким содержанием микроорганизмов, среди которых могут присутствовать патогенные виды, постоянно обитающие в почве или занесенные туда с выделениями человека и животных. Занесенные микробы при наличии способности к спорообразованию могут длительно сохраняться в почве. Неспоровые возбудители в большинстве своем выживают в почве в течение нескольких недель или месяцев. Для определения общего микробного числа отбирают 10 проб из разных мест исследуемой территории. Образец массой 200—300 г берут стерильным ножом с глубины 10—15 см в стерильную банку или пакет и тщательно перемешивают. Навеску помещают в колбу со стерильной водой и встряхивают в течение 10 мин. Затем из полученной суспензии готовят последовательные десятичные разведения до 10⁻⁷. Из двух последних разведений осуществляют глубинный посев в МПА в чашках Петри. После роста в течение суток при 37°С подсчитывают колонии на агаре и определяют микробное число. Для чистых почв общее микробное число составляет 10 000 на 1 г почвы; для слабо загрязненных — 100 000; для умеренно загрязненных — менее 1000 000; для сильно загрязненных — более 1000 000. В качестве почвенных санитарно-показательных микроорганизмов исследуют БГКП, *Clostridium perfringens* и термофильные бактерии. Коли-титр и коли-индекс почвы определяют бродильным методом, как и для воды, используя десятичные разведения почвенной суспензии. Для вычисления **перфрингенс-титра** (массы почвы в граммах, где обнаруживается одна клетка этого клостридия) пользуются обезжиренным молоком

или железосульфитной средой. Через 1–2 сут. при 43°C после засева разведений почвенной суспензии отмечают образование сгустка на молочной среде или характерных колоний в агаровом столбике железосульфитной среды. Колонии *C. perfringens* имеют форму чечевичек или комочков ваты и черную окраску. Принадлежность колоний подтверждают микроскопированием и биохимическими тестами. Самое большое разведение почвенной суспензии, при котором еще наблюдается рост, и дает значение перфрингенс-титра. Содержание термофильных бактерий в образце определяют с помощью глубинного посева разведений суспензии в МПА в чашках Петри. Посевы выдерживают в течение суток при 60°C и число выросших колоний пересчитывают на 1 г почвы. Оценка санитарного состояния почвы проводится комплексно (табл. 18.5), однако решающее значение имеет степень фекального загрязнения.

Таблица 18.5

Оценка санитарного состояния почвы

Характеристика почвы	Коли-титр	Перфрингенс-титр	Число термофильных бактерий в 1 г
Чистая	Меньше или равно 1,0	Меньше или равно 0,01	10^2 – 10^3
Загрязненная	0,9–0,01	0,009–0,0001	10^3 – 10^5
Сильно загрязненная	Меньше или равно 0,009	Меньше или равно 0,00009	10^5 – $4 \cdot 10^6$

Большинство пищевых продуктов содержит питательные вещества, благоприятные для развития различных групп микроорганизмов. Опасность микробного заражения пищевых продуктов заключается не только в самом присутствии посторонней микробиоты, но и в изменениях, происходящих в продуктах под влиянием микробного метаболизма. Поэтому исследование пищевого продукта на соответствие установленному для него стандарту состоит из целого комплекса процедур. В специальных лабораториях изучают доброкачественность продукта, определяют содержание в нем вредных и ядовитых веществ, а также выявляют общее микробное число и наличие микроорганизмов ряда групп. Санитарно-микробиологическую оценку состояния пищевого продукта проводят в плановом порядке для контроля процессов его приготовления, хранения и реализации, в случае сомнения в его качестве и при возникновении заболеваний, связанных с употреблением продукта. В пробе по утвержденной схеме определяют степень общей обсемененности, содержание плесеней, дрожжевых форм и молочнокислых бактерий, СПМ, наличие условно патогенных и патогенных микроорганизмов. Допустимые количества той или иной группы микроорганизмов в конкретном продукте нормируются государственными стандартами (ГОСТ), санитарными правилами и нормами (СанПиН), методическими указаниями, инструкциями и другими документами (табл. 18.6).

**Санитарно-бактериологические нормативы
для некоторых мясных и молочных продуктов**

Продукт	Микробное число в 1 г или 1 мл, не более	Масса продукта, г, в которой не допускаются			Другие показатели
		БГКП	Сальмо- неллы	Золоти- стый ста- филококк	
Сырое молоко	$3 \cdot 10^5$	—	25	—	—
Пастеризован- ное молоко	$5 \cdot 10^4$	1,0	25	1,0	—
Кисломолоч- ные напитки	— (наличие только микробиоты закваски)	0,01	25	1,0	—
Сметана	—	0,001	25	1,0	—
Сгущенное молоко с саха- ром	$2,5 \cdot 10^4$	1,0	25	—	—
Сыр Россий- ский	—	0,001	25	Менее 500 КОЕ/г	—
Плавленные сыры	$5 \cdot 10^3$	0,1	25	—	Плесени, дрожжи < 50 КОЕ/г
Фарш говяжий	$5 \cdot 10^6$	0,0001	25	—	—
Мясо заморо- женное	$1 \cdot 10^4$	0,1	25	—	—
Колбасные изделия варе- ные	$1 \cdot 10^3$	1,0	25	1,0	Сульфитвосста- навливающие клубридии в 0,01 г не допу- скаются
Птица охлаж- денная и замо- роженная	$1 \cdot 10^5$	—	25	—	—

Примечание. «—» означает, что анализ не проводится.

Из разных мест плотных продуктов (с поверхности и с глубины) отби-
рают пробы, смешивают их и получают усредненную пробу. Ее навеску
затем растирают в стерильной ступке с добавлением стерильного физио-
логического раствора (10 г продукта на 90 мл физраствора). Такую суспен-
зию, а также жидкие продукты используют для посевов и разведения. Для
определения наличия сальмонелл из усредненной пробы сразу отбирается
навеска 25 г. Для посевов готовят последовательные десятичные разве-

дения. Определение общей обсемененности проводят путем глубинного посева разведений в МПА в чашках Петри. Подсчет выросших колоний осуществляют после выращивания при 37°C в течение суток. Наличие плесневых грибов и дрожжей в продукте показывают с помощью глубинного посева разведений на сахаристую среду Сабуро в чашках Петри. Посевы выдерживают 5 сут. при 25°C и подсчитывают отдельно колонии дрожжей и плесневых грибов.

Наличие БГКП определяют бродильным способом, аналогичным определению коли-титра, но для посева берут количество продукта, в котором по нормам предусматривается отсутствие бактерий этой группы. Если в диагностической среде не происходит изменения цвета индикатора и газообразования, то делают заключение о соответствии продукта нормативу по этому показателю. Если признаки роста есть, то производят посев на среду Эндо для получения отдельных колоний. Колонии, типичные для БГКП, подвергают биохимическому и микроскопическому тестированию.

Для определения сальмонелл 25 г усредненной пробы помещают в 100 мл селенитового бульона и после суточного подращивания при 37°C осуществляют посев истощающим штрихом на поверхность висмут-сульфит-агара. Через сутки отбирают черные с металлическим блеском и светло-зеленые колонии и высевают их штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик на специальную диагностическую агаризованную среду с двумя сахарами (глюкозой и лактозой). Варианты, сбраживающие глюкозу с образованием кислоты и газа и не использующие лактозу, микроскопируют и при наличии грамтрицательных подвижных палочек с закругленными концами, не образующих споры и капсулы и не имеющих оксидазной активности, делают вывод о возможном присутствии сальмонелл в образце.

Для определения золотистого стафилококка используют посев разведений в 6,5%-й солевой бульон для подращивания и на поверхность молочно-или желточно-солевого агара для получения отдельных колоний. Посевы выдерживают сутки при 37°C и еще сутки при комнатной температуре. На желточно-солевом агаре колонии стафилококков имеют дисковидную форму с ровными краями с окраской от белой до золотистой. Вокруг колонии образуются радужное кольцо и зона помутнения среды. Выросшие на молочно-солевом агаре колонии стафилококков — круглые, выпуклые, мутные, окрашены в белый, кремовый и желто-оранжевый цвета. Из типичных колоний готовят микроскопические препараты по Граму и ставят тест на наличие каталазы.

Для определения протей в пробе образец высевает в конденсационную воду нижней части свежескошенного МПА и посевы оставляют на 18–20 ч при 37°C. При наличии вползающего нежного вуалеобразного роста и гнилостного запаха из верхнего края культуры отбирают клетки и микроскопируют их в живом препарате и в окрашенном по Граму. Протей — это грамтрицательная прямая подвижная палочка с закругленными концами, склонная к полиморфизму. Результаты микроскопирования подкрепляются положительным тестом на каталазу и отрицательным — на оксидазу. Наличие в образце продукта клостридий определяют с помощью глубинного посева в железо-сульфитный агар в пробирки. Через сутки роста при

37°С появление черных колоний указывает на присутствие сульфитвосстанавливающих клостридий в образце. Из подозрительных колоний готовят окрашенные по Граму препараты и ставят тест на каталазу.

Пищевые продукты, состояние которых не соответствует требованиям нормативных документов, не должны допускаться в продажу. По эпидемиологическим показаниям в таком продукте может быть проведено прямое выделение патогенных микроорганизмов и их токсинов с использованием набора биохимических, молекулярно-биологических и серологических методов.

Резюме

Пищевые продукты — это очень хорошая питательная среда для различных микроорганизмов, при этом микробный рост отражается как на качестве самого продукта, так и на здоровье потребляющего его человека. Неконтролируемый рост микроорганизмов в пищевых продуктах может вызвать их порчу, а загрязнение продукта болезнетворными микробами способно привести к заражению человека. Скорость микробной порчи конкретного продукта определяется широким разнообразием внешних и внутренних условий. В зависимости от состава питательных веществ продукт может быть заселен той или иной группой микроорганизмов. Измельчение, нарезание и смешивание пищи приводит к ускорению порчи и снижению срока хранения продукта. Высокая относительная влажность окружающего воздуха способствует быстрому микробному росту даже при пониженных температурах, тогда как значительное содержание CO_2 ингибирует развитие микроорганизмов.

Молоко скисает и портится прежде всего из-за молочнокислых бактерий. Вытекающее из коровьего вымени молоко стерильно, а микробные клетки попадают в него при дойке, перевозке и хранении. Обработанное молоко также может быть инфицировано при несоблюдении режима обработки или при использовании загрязненного оборудования. Внутренняя мясная мякоть здоровых животных обычно стерильна и заражается микробами только лишь в результате соприкосновения с поверхностями, инструментами или воздухом боен при разделке туш. Состав микробиоты морепродуктов зависит от присутствующих в воде микроорганизмов. Порча морепродуктов происходит путем автолиза, окисления или вследствие активности микроорганизмов. Рост большинства микроорганизмов в консервах сдерживает не только термообработка, но также удаление воздуха из банок и снижение pH консервов. Порча консервов может произойти из-за нарушения технологического процесса или при повреждении упаковки. Здоровые, неповрежденные семена, овощи и плоды несут на своей поверхности естественную микробиоту, препятствующую колонизации нежелательными микроорганизмами. Микробное загрязнение этих продуктов происходит во время сбора и подготовки к хранению, а их порча зависит от температуры и влажности, поддерживаемых в хранилищах. Нарушение целостности поверхностных оболочек фруктов и овощей плесневыми грибами приводит к ускорению колонизации другими микроорганизмами.

Выбор метода защиты определяется свойствами самого продукта, поражающих его микроорганизмов и стоимости процедуры.

Биоповреждения различных объектов и материалов имеют в своей основе как непосредственную микробную активность, так и агрессивные продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Практически любой материал может прямо или косвенно поддерживать их развитие, однако скорость процесса для разных объектов будет существенно различаться. Большой проблемой в нефтедобыче и производстве нефтепродуктов является биокоррозия трубопроводов и порча самого топлива. Для борьбы с биокоррозией в нефтедобыче используют биоциды, замену металлических труб на более инертные пластиковые, облучение и механическую очистку труб и хранилищ. Для борьбы с микроорганизмами, портящими произведения искусства и архитектурные памятники, применяют обработку ингибиторами, нанесение полимерных покрытий и соблюдение режима хранения. Микробное загрязнение в электронной индустрии часто связано с развитием олиготрофных микроорганизмов при очень низких уровнях питательных веществ, вымытых из пластика трубок или адсорбированных из воздуха.

Болезнетворные представители имеются среди бактерий, грибов, простейших и вирусов. Одним из основных факторов патогенности бактерий является образование ими токсинов. Экзотоксины обладают свойствами ферментов, они чрезвычайно активны, действуют на макроорганизм в малых дозах и избирательно. Эндотоксины менее активны, вызывают поражения в больших дозах и обладают более общим действием. Некоторые бактериальные продукты обмена веществ также могут обладать токсическими свойствами и при накоплении в пищевых продуктах вызывать отравления. Если хозяин полностью освобождается от возбудителя, то говорят о стерильном иммунитете. При длительно протекающих заболеваниях невосприимчивость сопровождается присутствием в организме клеток возбудителя (нестерильный иммунитет). У бактерий в процессе эволюции выработались механизмы «ухода» от факторов иммунитета. Гены, кодирующие факторы патогенности и системы их выделения, располагаются у бактерий тесными группами на кольцевой хромосоме. Стафилококки передаются чаще всего воздушно-капельным путем и проникают в организм через кожу и слизистые оболочки. Патогенность стафилококков обусловлена способностью синтезировать большое количество токсинов и ферментов. Патогенные стрептококки вырабатывают различные экзотоксины. Заражение может происходить воздушно-капельным и контактным способом, а также через инфицированные продукты и при попадании в открытые раны. Гонококки образуют эндотоксин, освобождающийся при лизисе клеток возбудителя. Для гонореи характерно явление незавершенного фагоцитоза. Менингококки попадают воздушно-капельным путем от больного человека или носителя на слизистую носоглотки, а затем проникают в лимфу, кровь и мозговую жидкость. Они вырабатывают экзо- и эндотоксины, освобождающиеся при автолизе клеток. Возбудители кишечных инфекций представлены энтеробактериями и родственными микроорганизмами. Среди них имеются как высокопатогенные виды, так

и обычные условно патогенные представители нормальной микробиоты человека. Заражение осуществляется через рот, поражается прежде всего желудочно-кишечный тракт, а возбудитель выделяется в окружающую среду с испражнениями. Патогенность этих бактерий в значительной степени определяется выработкой сильных эндо- и экзотоксинов. Размножение в кишечнике холерных вибрионов приводит к образованию мощного экзотоксина, запускающего процесс обезвоживания организма. Они синтезируют также целый набор гидролаз и сильный эндотоксин. При зоонозных бактериальных инфекциях возбудители поражают животных и передаются от них человеку. Клиническая форма болезни часто зависит от способа проникновения возбудителя в организм. Возбудители выделяют сильные экзотоксины и несколько гидролитических ферментов. Анаэробные инфекции вызывают представители клостридий, образующих эндоспоры. Все возбудители являются типичными обитателями почв или представителями нормальной микробиоты человека и животных. Они синтезируют экзотоксины и гидролазы. Заболевания детского возраста передаются преимущественно воздушно-капельным путем, возбудители продуцируют сильные экзотоксины. Заражение патогенными микобактериями происходит через воздух, при употреблении инфицированных пищевых продуктов, через кожу и слизистые оболочки, а также внутриутробно. Микобактерии туберкулеза синтезируют набор протеолитических и липолитических ферментов и эндотоксины, освобождающиеся при разрушении клеток. Приобретенный иммунитет является нестерильным. Возбудители актиномикозов могут внедряться в организм самыми разными путями. Источником заражения являются почва, воздух, растения, домашние животные, некоторые виды зерновой пищи. Патогенность ветвящихся актинобактерий связана с наличием комплекса мощных гидролаз и образованием эндотоксина. Патогенные спирохеты проникают в организм контактным путем или через укусы вшей и клещей. Инфекционный процесс при микоплазмозах протекает в соответствии со второй стратегией паразитизма. Уклонение от иммунной системы хозяина происходит путем варьирования ответственных за прикрепление соединений, а также с помощью антигенной мимикрии. Микоплазмы формируют слизистые слои на поверхности клетки, выделяют литические ферменты в непосредственной близости от клеток хозяина и образуют активные формы кислорода, вызывающие при контакте окислительный стресс в клетках хозяина, а также вырабатывают эндотоксин. Риккетсии и хламидии — это облигатные внутриклеточные паразиты. Заражение происходит при укусах вшей, блох, клещей и через их экскременты. Патогенность риккетсий связана с выработкой термолабильного токсина. Хламидии паразитируют в клетках птиц и млекопитающих и передаются контактным путем. В тканях и органах хозяина хламидии проходят сложный жизненный цикл, нарушая метаболизм клеток и вызывая общее отравление.

Большинство грибов является типичными обитателями почвы и человек для них — случайный хозяин. Патогенные грибы могут передаваться при непосредственном контакте через кожу и слизистые, попадать в ранки с почвой или вдыхаться вместе с пылью и частичками эпидермиса. Мико-

токсины вырабатываются грибами при росте на ряде продуктов растительного происхождения.

Патогенные простейшие могут передаваться самыми разнообразными путями, а болезни часто характеризуются длительным и тяжелым течением. Распространению простейших помогает образование цист. Многие возбудители протозойных инфекций имеют многостадийный жизненный цикл. Заражение происходит при попадании в желудочно-кишечный тракт и на слизистые пищи и воды, загрязненных фекалиями с цистами возбудителя, через укусы различных членистоногих и воздушно-капельным путем.

Вирусы — это облигатные внутриклеточные паразиты, вызывающие многочисленные заболевания человека и животных. Перенос вирусов может осуществляться воздушно-капельным путем, через пищевые продукты и воду, загрязненные фекалиями, при укусах животных и при непосредственном контакте с больным или предметами его обихода. В зараженных клетках нарушается нормальный метаболизм и создаются условия для размножения вирусов. Вирусы характеризуются высокой специфичностью к хозяину и способностью поражать определенные органы и ткани. При вирусной инфекции организм мобилизует некоторые особые механизмы (апоптоз и выработку интерферона). Внедрение в организм вирусных частиц, при размножении приобретающих наружную оболочку из компонентов клеток хозяина, провоцирует аутоиммунные нарушения. Течение вирусного инфекционного процесса может происходить в острой, хронической или латентной форме.

Развитие многих возбудителей в организме хозяина может вызывать сходные клинические проявления. Для эффективного противодействия инфекции необходимо прежде всего выявить возбудитель. Обнаружение возбудителя начинается со взятия проб биологического материала, в котором на данной стадии заболевания его пребывание наиболее вероятно. Лабораторная диагностика с использованием методов классической микробиологии проводится по стандартной схеме с использованием дифференциально-диагностических сред и биохимических тестов. Иногда для воспроизведения картины заболевания используют лабораторных животных. Определить инфекционный агент непосредственно в материале больного, без выделения чистой культуры, можно молекулярно-биологическими методами. Сократить время лабораторного определения причины заболевания позволяет также применение методов иммунодиагностики.

Для предохранения человека от инфекционных заболеваний применяют как меры общего характера, так и специфические приемы защиты. К общим мероприятиям относятся соблюдение чистоты и снижение количества патогенных микроорганизмов и вирусов в среде, окружающей человека. Специальными способами, направленными на прерывание путей передачи заболеваний, являются дезинфекция, дезинсекция и дератизация. Для пресечения распространения заболевания существенное значение имеют раннее выявление больных, их изоляция от здоровых людей и проверка работников учреждений медицины, питания и водоснабжения на носительство инфекционных агентов. Для создания активного искусственного иммунитета используют вакцины и анатоксины. Введение вакцины в орга-

низм человека или животного называется прививкой. Пассивный искусственный иммунитет формируют с помощью антимикробных и антитоксических сывороток, содержащих готовые антитела.

Для лечения инфекционных заболеваний применяют целый ряд химических препаратов, направленных против возбудителей и относительно безвредных для макроорганизма. Особую группу лечебных препаратов составляют антибиотики. Антимикробное действие антибиотиков заключается в нарушении обмена веществ у возбудителя заболевания. Сравнительно новым направлением в ветеринарии и медицине является использование пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков.

Активное применение лечебных препаратов привело к возникновению множественной лекарственной устойчивости. Микроорганизмы, обладающие такой устойчивостью, либо способны к ферментативному разрушению лекарства, либо могут поддерживать крайне низкие концентрации препарата внутри клетки путем его выброса. Для преодоления множественной лекарственной устойчивости возбудителей проводится постоянный поиск новых антибиотиков, а также химически изменяются известные молекулы и выясняются пути подавления микробных транспортных систем, отвечающих за выброс лекарственных веществ. Одной из проблем современности является возникновение «новых» инфекционных болезней. К факторам, способствующим распространению таких болезней, относят изменения климата, внедрение человека в неосвоенные регионы, перемещение населения, вызванное войнами, катастрофами, путешествиями, биологический терроризм и развитие индустрии обслуживания человека. Многие болезни, ранее не считавшиеся инфекционными, вызываются микроорганизмами. В человеческом обществе появляются возбудители, осуществляющие вторую стратегию паразитизма и способные передаваться при невысокой плотности населения.

Санитарно-микробиологические исследования включают как определение общего количества микроорганизмов и вирусов в воде, воздухе, почве, на предметах обихода и в пищевых продуктах, так и обнаружение возбудителей конкретных заболеваний. Чем большее количество микроорганизмов присутствует в пробе, тем более вероятно наличие среди них патогенных форм. К санитарно-показательным микроорганизмам относят представителей нормальной микрофлоры человека и теплокровных животных, обитающих в желудочно-кишечном тракте или в дыхательных путях. Их наличие в пробе говорит о ее загрязненности выделениями человека и животных, а чем больше объект загрязнен такими выделениями, тем больше вероятность присутствия в них патогенных микроорганизмов. Методы прямого обнаружения патогенных микроорганизмов однозначно свидетельствуют о наличии возбудителя в окружающей среде. Для этого проводят посевы на специальные питательные среды с последующим выделением патогена в чистую культуру. Санитарно-микробиологическую оценку воды и воздуха проводят путем определения общего микробного числа и содержания санитарно-показательных микроорганизмов. Прямое обнаружение патогенов в воде проводят только после подтверждения опасного фекального загрязнения. Для выявления возбудителей внутрибольничных инфекций

осуществляют прямое выделение патогенов из воздуха медицинских стационаров. Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят при определении пригодности земли для хозяйственной деятельности. Почвы в целом характеризуются высоким содержанием микроорганизмов, среди которых могут присутствовать патогенные виды, постоянно обитающие в почве или занесенные туда с выделениями человека и животных. Занесенные микробы при наличии способности к спорообразованию могут длительно сохраняться в почве. Оценка санитарного состояния почвы проводится комплексно, однако решающее значение имеет степень фекального загрязнения.

Опасность микробного заражения пищевых продуктов заключается не только в самом присутствии посторонней микробиоты, но и в изменениях, происходящих в продуктах под влиянием микробного метаболизма. Санитарно-микробиологическую оценку состояния пищевого продукта проводят в плановом порядке для контроля процессов его приготовления, хранения и реализации, в случае сомнения в его качестве и при возникновении заболеваний, связанных с употреблением продукта. Допустимые количества той или иной группы микроорганизмов в конкретном продукте нормируются государственными документами. Пищевые продукты, состояние которых не соответствует требованиям нормативных документов, не должны допускаться в продажу. По эпидемиологическим показаниям в таком продукте может быть проведено прямое выделение патогенных микроорганизмов и их токсинов.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Расположите в ряд следующие продукты (от самого быстро портящегося к наименее подверженному микробной порче): замороженное мясо, селедка в пластиковой упаковке, консервированная томатная паста в жестяной банке, порошок растворимого кофе, салат оливье, леденцовые конфеты, пирожное эклер.
2. Сравните известные вам способы предохранения продуктов от порчи по эффективности и доступности.
3. Почему опасно носительство патогенных микроорганизмов у работников, имеющих дело с пищевыми продуктами?
4. Как соблюдение требований гигиены может приостановить порчу пищевых продуктов? Приведите примеры.
5. Какие заболевания могут возникать при употреблении испорченного зерна и продуктов из него?
6. Из-за чего возникают «болезни» вина и пива?
7. Какие процессы иногда приводят к порче квашеных продуктов и силоса?
8. Проанализируйте факторы, влияющие на процесс порчи основных сельскохозяйственных продуктов. Какие способы защиты для них применяют?
9. Какие функциональные группы микроорганизмов участвуют в биоповреждении трубопроводов при транспортировке нефти?
10. Какие факторы влияют на скорость биокоррозии?
11. Какую роль в процессах биокоррозии могут играть разные группы микроорганизмов?
12. Какие возбудители могут вызывать пищевые токсикоинфекции?

13. Для каких заболеваний характерно явление незавершенного фагоцитоза?
14. Почему опасна хозяйственная деятельность на месте древних сибиреязвенных скотомогильников?
15. Почему при попадании в открытую рану почвы велика вероятность развития анаэробных инфекций?
16. Назовите заболевания, передающиеся половым путем.
17. Почему СПИД называют чумой XX в.?
18. Перечислите способы выявления возбудителя инфекционного заболевания.
19. Что показывают кожные пробы?
20. Как с помощью соблюдения правил гигиены можно замедлить распространение инфекционных заболеваний?
21. Какие формы искусственного иммунитета формируют в условиях эпидемии у здоровых и заболевших людей?
22. Что способствовало возникновению множественной лекарственной устойчивости?
23. Какие последствия может вызвать отказ от прививок?
24. Назовите санитарно-показательные микроорганизмы, определяемые при исследованиях воды, воздуха, почвы.
25. Почему сильное загрязнение фекалиями говорит о вероятности присутствия в пробе патогенных микробов?
26. Почему для разных продуктов установлены разные нормативы микробной обсемененности?

Семинар 1

Участие микроорганизмов в порче пищевых продуктов

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Микробная порча продуктов (на примере хлебобулочных изделий)

Цель работы: в результате проведенной работы студенты изучат процесс порчи хлеба плесневыми грибами, а также факторы, влияющие на его скорость и глубину. Аналогичным образом можно наблюдать процесс порчи других видов продуктов.

Необходимые материалы (на 1 студента): 3 пипетки на 1–2 мл; колба с 20 мл сахарной воды; колба с 20 мл лимонного сока; колба с 20 мл водопроводной воды; 4 куска свежего белого хлеба; 4 куска хлеба разных сортов (серого, черного, зернового, с наполнителями); 8 небольших прозрачных полиэтиленовых пакетов; маркер; липкая лента.

Перед началом опыта готовят сахарную воду, растворяя 1/4 чашки сахара в 1/4 чашки подогретой водопроводной воды (подогревать, но не кипятить). Сироп охлаждают до комнатной температуры. Маркируют 4 п/э пакета следующим образом: 1 — «Сухой белый хлеб», 2 — «Влажный белый хлеб», 3 — «Белый хлеб с лимонным соком», 4 — «Белый хлеб с сахарной водой».

Моют руки с мылом, помещают кусок белого хлеба в 1-й пакет и заклеивают его клейкой лентой. С помощью пипетки вносят на второй кусок

хлеба 20 капель водопроводной воды (хлеб должен быть влажным, но не мокрым), помещают его во 2-й пакет, который также заклеивают клейкой лентой. Другой пипеткой наносят 20 капель лимонного сока на третий кусок хлеба и вкладывают его в 3-й пакет. Отдельной пипеткой смачивают четвертый кусок 20 каплями сахарной воды и помещают его 4-й пакет. Не следует касаться пальцами областей, смоченных различными жидкостями. Повторяют описанные процедуры для других выбранных сортов хлеба, пометив соответствующим образом п/э пакеты. Убедившись, что все пакеты герметично закрыты, их помещают в термостат на 30°С. Ежедневно в течение двух недель проверяют пакеты, записывая результаты наблюдений в лабораторный журнал в виде таблицы (табл. 18.7) и делая зарисовки картины внутри пакетов, не открывая их.

Таблица 18.7

Развитие плесени на белом хлебе в разных условиях

Длительность роста (сут.)	Зарисовки и описание роста в вариантах опыта			
	Сухой хлеб	Влажный хлеб	С лимонным соком	С сахарной водой
1				
2				
...				
14				

Строят графики по результатам эксперимента для каждого варианта, выражая рост плесени в % площади куска хлеба на каждые сутки инкубации (рис. 18.5).

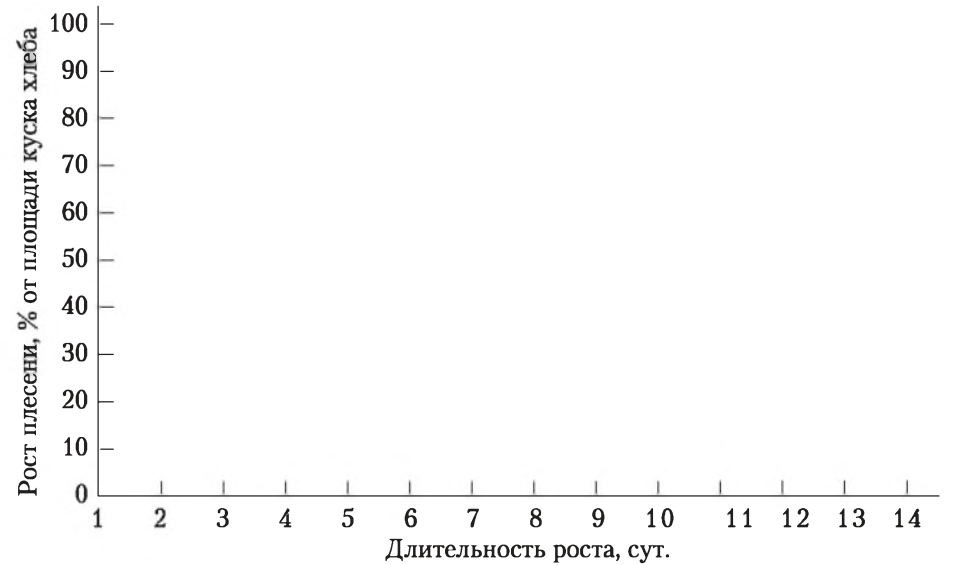


Рис. 18.5. Развитие плесени на белом хлебе в разных условиях

Аналогичные таблицы и графики составляют для других сортов хлеба, взятых в эксперимент. Сравнивают результаты порчи хлеба разных сортов с различными добавками и делают выводы о том, какие факторы влияют на состав поражающих хлеб плесневых грибов и на скорость процесса порчи хлеба.

Лабораторная работа 2

Действие природных антимикробных веществ, содержащихся в приправах, на микроорганизмы

Цель работы: при выполнении данной задачи студенты увидят, что в различных вкусо-ароматических добавках и пряностях могут присутствовать вещества, обладающие ингибирующим действием на рост микроорганизмов.

Использование ароматических и улучшающих вкус пищи приправ не только влияет на органолептические свойства продукта, но и может оказывать ряд других полезных эффектов. Многие из них содержат антиоксиданты, снижающие количество свободных радикалов в крови. Ароматические вещества других пряностей уже в течение нескольких столетий используют в медицине, пищевой и парфюмерной промышленности. В настоящее время их применяют в качестве дезинфектантов с «лимонным» запахом и компонентов разогревающих масел, зубных паст, пищевых ароматизаторов, духов, дезодорантов, мыла и других средств личной гигиены. Большинство продуктов предохраняют от порчи, добавляя различные химические соединения, однако добавление пряностей часто также может продлить срок хранения пищи, не нанося ущерба здоровью потребителя. Именно поэтому в последние годы в значительной степени возрос интерес к натуральным вкусо-ароматическим веществам.

Для успешного проведения данного эксперимента необходимо использовать только достаточно свежие индивидуальные пряности, без примеси других ингредиентов.

Необходимые материалы (на одного студента): культура *Bacillus subtilis* на скошенном агаре в пробирке, чашки Петри со стерильным МПА (из расчета, одна чашка — контрольная и по одной чашке на каждую исследуемую пряность), микробиологическая петля, горелка или спиртовка, различные пряности, маркер, каталожная карточка, сосуд с дезинфектантом.

Перед постановкой опыта оценивают уровень аромата каждой пряности в соответствии со следующей шкалой («–» — нет запаха, «+» — слабый запах, «++» — сильный запах, «+++» — очень сильный запах). Маркируют закрытые чашки Петри, указав на донцах ближе к краю вариант опыта. Поверхность рабочего стола тщательно протирают дезинфектантом. Каждую чашку с МПА засевают культурой *B. subtilis* у пламени горелки, набирая клетки петлей со скошенного агара и проводя ей плашмя и близко друг к другу горизонтальные штрихи по агару в чашке. Затем чашку поворачивают на 90° и проводят той же петлей горизонтальные штрихи перпендикулярно уже сделанным. На крышках закрытых опытных чашек Петри проводят маркером линию по диаметру чашки. Чашки переворачивают вверх дном. В данном положении они будут оставаться до конца эксперимента.

Дно первой опытной чашки поднимают и, не переворачивая, кладут рядом с крышкой. На одну половинку открытой крышки первой опытной чашки Петри осторожно помещают первую изучаемую пряность. Пользуясь каталожной карточкой и держа ее вертикально, распределяют пряность равномерно по половине крышки чашки, не заходя за линию, проведенную маркером. Предельно осторожно, не сдвигая пряность, помещают дно первой опытной чашки Петри на ее крышку. Маркером наносят на дно чашки линию, продолжаящую линию на крышке. Обозначают ту половину дна чашки, которая находится над пряностью. Прodelывают аналогичные процедуры для других опытных чашек и исследуемых пряностей. Осторожно помещают чашки в термостат при 25–30°C на 1–2 сут.

По окончании инкубации рассматривают контрольную и опытные чашки, сравнивая характер роста культуры в них, и регистрируют влияние каждой пряности на рост культуры в соответствии со следующей шкалой: «–» — нет эффекта (рост такой же, как и на контрольной чашке); «+» — слабое действие (немного меньше бактерий по сравнению с контролем); «++» — сильное действие (зона над пряностью свободна от бактерий); «+++» — очень сильное действие (зона над пряностью и вдали от нее свободна от бактерий). Результаты вносят в табл. 18.8.

Таблица 18.8

Аромат и антимикробное действие испытанных приправ

Пряность	Аромат	Влияние на рост бактерий

Если было испытано много пряностей, составляют общую для группы студентов таблицу (табл. 18.9), объединяющую пряности по характеру их действия на культуру.

Таблица 18.9

Группы пряностей, имеющие разную степень антимикробного действия

Группа	Степень антимикробного действия	Пряности
1	Очень сильное	
2	Сильное	
3	Слабое	
4	Не действуют на испытанную культуру	

Делают выводы о корреляции силы аромата и уровня антимикробного действия пряностей.

Семинар 2

Санитарно-бактериологический анализ пищевых продуктов, воды и воздуха. Микробное число, санитарно-показательные микроорганизмы, коли-титр, коли-индекс

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала сту-

денты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 3

Определение возможного источника заражения и действие на него дезинфектанта

Цели работы: при выполнении данного опыта студенты научатся приемам определения и проверки источника заражения на наличие микроорганизмов и изучат действие на них дезинфектантов.

Термином «источник заражения» обозначают любой неживой объект, содержащий болезнетворные микроорганизмы. Практически все вещи, окружающие нас в повседневной жизни, а также живые существа нестерильны, т.е. содержат микроорганизмы на поверхности и внутри. Большинство из них безвредны для человека, однако встречаются и патогенные. Шансы получить инфекционную болезнь возрастают с увеличением концентрации микробных клеток в окружающей нас среде. Основными способами ее снижения служат соблюдение правил гигиены и использование дезинфицирующих веществ.

Необходимые материалы (для каждого проверяемого объекта): 3 стерильные чашки Петри с МПА, 3 стерильные ватные палочки, пинцет, бумажные полотенца или салфетки, маркер по стеклу, дезинфицирующее вещество (70%-й этанол, 10%-й отбеливатель, жидкое мыло, карболка (лизол), хлорамин и т.д.), горелка или спиртовка.

До начала эксперимента готовят и стерилизуют МПА. Разливают его стерильно в стерильные чашки Петри. Стерилизуют в автоклаве при 1,0 ати ватные палочки, уложенные в стеклянную или жестяную банку с крышкой. Перед постановкой опыта протирают поверхность рабочего стола раствором дезинфектанта. Чашки Петри с застывшим МПА раскладывают на столе, и дно каждой чашки делят на четыре сектора маркером, обозначив их цифрами от 1 до 4. Выбирают объекты исследования (дверная ручка, монета, указка, раковина, клавиатура компьютера и т.д.). На первой чашке пишут название объекта и № 1. Стерильным пинцетом у пламени горелки достают одну ватную палочку из контейнера, не касаясь рабочего кончика с ватой. Поверхность выбранного объекта протирают ватным кончиком палочки, периодически ее поворачивая. Открывают чашку Петри около пламени горелки и осторожно проводят ватным кончиком палочки по поверхности агара в секторе 1, не заходя за границы других секторов (рис. 18.6). Затем последовательно проводят палочкой по секторам 2–4, чтобы в 4-м секторе можно было ожидать появления отдельных колоний.

На второй чашке пишут название объекта и № 2. Протирают половину объекта бумажным полотенцем, слегка смоченным водой. Используя новую ватную палочку, ее рабочим концом берут пробу с вытертой области объекта. У огня открывают крышку чашки № 2 и делают последовательные посевы ватной палочкой в секторах 1–4. Третью чашку помечают № 3. Выбранным дезинфектантом протирают вторую половину объекта,

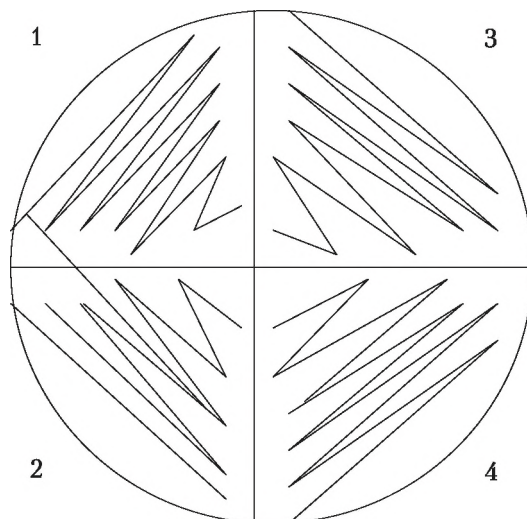


Рис. 18.6. Рассев микроорганизмов с объекта на агар

дают ему просохнуть и отбирают пробу новой ватной палочкой с продезинфицированной поверхности объекта. Производят посев рабочим концом палочки в чашку № 3, последовательно в 1–4 сектора. Все чашки ставят дном вверх на инкубацию в термостат при 30°С на 2 сут. По окончании инкубации последовательно просматривают чашки и на каждый объект заполняют таблицу (табл. 18.10). Отмечают характер роста микроорганизмов в секторах (обильный или скудный, сплошной по штриху или в виде колоний, отсутствие роста).

Таблица 18.10

Рост микроорганизмов с изучаемого объекта на МПА

Номер чашки	1 (без обработки)				2 (после протирания водой)				3 (после обработки дезинфектантом)			
Номер сектора	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Характер роста												

Делают выводы о возможностях контроля микробной обсемененности объектов окружающей среды и об эффективности снижения уровня микробного загрязнения с помощью простой уборки или при использовании дезинфицирующих веществ.

Лабораторная работа 4

Действие биоцидов на микроорганизмы

Цель работы: данный эксперимент продемонстрирует студентам влияние разных концентраций антимикробных веществ на рост микроорганизмов. Они научатся определять минимальную эффективную концентрацию вещества, оказывающую бактерицидное действие.

В качестве модельного микроорганизма в опыте используется непатогенный штамм *E. coli* К-12. Для работы следует выбрать концентраты таких

известных биоцидов, как этанол, хлорамин, лизол, бытовой отбеливатель и т.д.

Необходимые материалы (на 1 студента): пробирки с ватными пробками (количество зависит от начальной концентрации биоцида), чашки Петри (по числу сделанных разведений + контрольная), стерильный МПА в колбе, культура *E. coli* на скошенном агаре в пробирке, стерильный МПБ в колбе, микробиологическая петля, пипетки на 1–2 мл, маркер, выбранный биоцид.

До начала эксперимента готовят пробирки с 4,5 мл водопроводной воды для десятичных разведений, МПБ и МПА в колбах и стерилизуют их в автоклаве при 1,0 ати. Стерилизуют сухие чистые чашки Петри и пипетки в сухо-жаровом шкафу. За сутки до начала опыта засевают МПБ с помощью петли культурой *E. coli* со скошенного агара и ставят в термостат при 37°C.

В день эксперимента готовят стерильно десятичные разведения выбранного биоцида в водопроводной воде, используя для каждого разведения новую стерильную пипетку. В одну пробирку (контроль) биоцид не вносят. В каждую пробирку, включая контрольную, вносят стерильно 0,1 мл культуры *E. coli* и оставляют пробирки при комнатной температуре на 30 мин. Закрытые стерильные чашки Петри маркируют, указывая концентрацию биоцида в пробе. МПА в колбе расплавляют и остужают до 45°C. По окончании инкубации содержимое пробирок перемешивают и вносят около пламени горелки 0,1 мл каждого разведения в соответствующую чашку Петри. Из колбы расплавленный и остуженный МПА разливают по чашкам (по 15–20 мл) с пробами разведений около пламени горелки, осуществляя глубинный посев. После застывания агара чашки крышками вниз помещают в термостат при 37°C на 1–2 сут. (до появления видимых колоний).

После инкубации подсчитывают колонии в каждой чашке и определяют минимальную концентрацию биоцида, при которой рост бактерий отсутствует. Если использовали несколько биоцидов, то делают вывод о том, какой из них эффективнее угнетает микробный рост.

Лабораторная работа 5

Дезинфекция кожи спиртом

Цель работы: наглядно показать студентам эффективность такого простого способа дезинфекции кожи рук, как протирание их спиртом.

Микроорганизмы, живущие на коже человека, являются частью его нормальной микробиоты, препятствующей проникновению возбудителей заболеваний в организм через кожные покровы. Эти микроорганизмы присутствуют на коже всегда и не причиняют нам вреда. Однако иногда бывает необходимым удалить с кожи все микробные клетки, например, перед уколом лекарства или перед операцией. В этих случаях наиболее часто используется этанол как недорогой и нетоксичный дезинфектант. Он действует на большинство бактерий и грибов, разрушая липидные компоненты мембран и денатурируя белки, начиная с концентрации 33%, а максимальная его активность против микроорганизмов наблюдается при 70%.

Необходимые материалы (на 1 студента): чашка Петри со стерильным МПА, маркер, ватный диск или салфетка, 70% этанол в пузырьке.

С помощью маркера делят дно закрытой чашки Петри с МПА на четыре сектора, обозначив их цифрами от 1 до 4. Переворачивают чашку крышкой вверх (цифры должны отчетливо различаться через слой агара). Открывают чашку и касаются поверхности агара в середине сектора 1 подушечкой правого указательного пальца на 2 с. Затем сразу же касаются той же подушечкой агара в секторе 2. Палец удерживают 2 с. Потом подушечку левого указательного пальца помещают на 2 с на агар в секторе 3. Закрывают крышку чашки, смачивают ватный диск или салфетку спиртом и протирают подушечку левого указательного пальца в течение 10 с. После высыхания спирта на коже прикладывают обработанную подушечку пальца к агару в секторе 4 на 2 с. Чашку закрывают и помещают в термостат при 37°C на 1–2 сут.

По окончании инкубации зарисовывают вид чашки и описывают характер роста микроорганизмов в каждом из четырех секторов. Подсчитывают и сравнивают количество колоний в секторах. Делают вывод об эффективности дезинфекции кожи спиртом.

Опыт можно усложнить, применяя для дезинфекции разные концентрации этанола (от 20 до 96% через 10–20% интервалы) или используя наряду со спиртом для обработки другие дезинфектанты (например, антибактериальное мыло). В этих случаях следует обсудить эффективность других способов дезинфекции по сравнению с протиранием смоченной спиртом, а также определить минимальную бактерицидную концентрацию этанола.

Семинар 3

Множественная лекарственная устойчивость и способы ее преодоления

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, который дополнен конкретными примерами из монографий и оригинальных статей научных микробиологических журналов, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 6

Образование микроорганизмами антибиотиков

Цели работы: эксперимент демонстрирует способность некоторых микроорганизмов подавлять рост других бактерий, а также устойчивость некоторых микроорганизмов к антибиотикам.

Пенициллин и открытые вслед за ним другие антибиотики рассматривают как эффективное средство в борьбе со многими болезнями с высокой смертностью, приводящими к тяжелым эпидемиям среди людей. В этом эксперименте студенты будут использовать образующие антибиотики микроорганизмы из разных систематических групп (доменов). Это плесневый гриб *Penicillium notatum*, который продуцирует пенициллин, и мицелиальная актинобактерия *Streptomyces griseus*, синтезирующая стрептомицин. При росте на МПА в чашке Петри они образуют антибиотики, которые

диффундируют в агар. Поэтому любые бактерии, чувствительные к этим антибиотикам, не будут расти вблизи микроорганизмов-продуцентов.

Необходимые материалы (на 1 студента): термостат на 37°C, культуры *Escherichia coli*, *Penicillium notatum*, *Streptomyces griseus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* на скошенном агаре в пробирках, микробиологическая петля, газовая горелка или спиртовка, МПА (600–700 мл) в колбе, 3 стерильные чашки Петри, 3 пробирки с 5 мл водопроводной воды в каждой, маркер.

За 3–5 сут. перед началом эксперимента заворачивают и стерилизуют «сухим жаром» сухие чистые чашки Петри. Готовят и стерилизуют в автоклаве при 1,0 ати МПА в колбе и водопроводную воду в пробирках по 5 мл. Расплавленный и остуженный до 45–50°C стерильный МПА разливают у пламени горелки в стерильные чашки Петри по 20–25 мл. После застывания агара чашки переворачивают вверх дном, чтобы конденсат оказался на крышке. Культуры продуцентов антибиотиков *Penicillium notatum* и *Streptomyces griseus* засевают каждую в отдельную чашку с МПА. Засеянные чашки инкубируют вверх дном при комнатной температуре.

Перед началом опыта закрытые чашки Петри с МПА маркируют, обозначив на дне с краю чашки один из продуцентов или контрольный вариант и линии, по которым будут подсеиваться продуцент и тест-культуры (рис. 18.7).

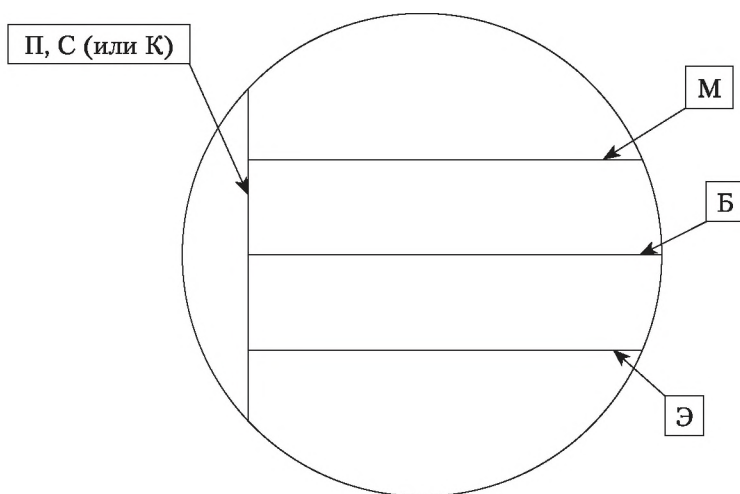


Рис. 18.7. Схема посева продуцента антибиотика и тест-культур:

П — пеницилл; С — стрептомицет; К — контроль; М — микрококк; Б — бацилла;
Э — эшерихия

У пламени горелки проводят посев культур-продуцентов в опытные чашки в соответствии с маркировкой. Петлей дотрагиваются до газона продуцента в ранее засеянных чашках и проводят штрих по соответствующей линии в стерильной чашке с МПА. На контрольную чашку посев не производят. Засеянные и контрольные чашки помещают на инкубацию в течение 4–7 сут. при 30°C.

За сутки до окончания инкубации тест-культуры пересевают со скошенного агара на МПА в чашках Петри и выдерживают при температуре 37°C в течение 18—24 ч. Затем готовят суспензии бактериальных тест-культур в стерильной водопроводной воде в пробирках. Для этого у пламени горелки петлей отбирают клетки с агара в чашке и переносят в воду в подписанной пробирке, растирая биомассу о стенку пробирки и тщательно перемешивая содержимое. К выросшим в опытных чашках штрихам продуцентов подсевают петлей суспензии бактериальных тест-культур, открывая крышку чашки у пламени горелки и ведя штрих каждой тест-культуры по обозначенной для нее линии от края чашки к штриху выросшего продуцента. После посева каждой тест-культуры следует прожигать и остужать петлю. В контрольной стерильной чашке проводят три штриха из суспензий тест-культур, перпендикулярно к линии К. Засеянные чашки инкубируют вверх дном при 30°C в течение 1—3 сут.

По окончании инкубации описывают и зарисовывают картины роста тест-культур и продуцента в опытных и контрольной чашках. Делают выводы о том, какие тест-культуры и в какой степени чувствительны, а какие устойчивы к данным антибиотикам.

Список литературы

1. *Заварзин, Г. А.* Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. — М. : Книжный дом «Университет», 2001.
2. *Кожевин, П. А.* Микробные популяции в природе. — М. : Изд-во МГУ, 1989.
3. *Нетрусов, А. И.* Введение в биотехнологию. — М. : Академия, 2014.
4. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Кн. I / под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной. — М. : БИНОМ, 2008.
5. Современная микробиология. Прокариоты. В 2 т. / под ред. Дж. Ленгелера [и др.]. — М. : Мир, 2005.
6. Экология микроорганизмов : учебник для бакалавров / под ред. А. И. Нетрусова. — 2-е изд. — М. : Издательство Юрайт, 2013.
7. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* — New York, Heidelberg, Berlin : Springer-Verlag, V. I — 2001, V. II [II A, II B, II C] — 2005, V. III — 2009, V. IV — 2010, V. V — 2011.
8. *Brock's Biology of Microorganisms.* — 12th ed. — 2011. — <http://www.aw-bc.com/brock>.
9. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria.* — Dworkin M., Ed.-in-Chief. — 3rd ed. — New York : Springer, V. 1—7, 2007. URL: <http://www.springerlink.com>.

Интернет-ресурсы

1. MSU, Woods Hole Oceanographic Institute (USA) and NASA sites. URL: <http://www.mmg.msu.edu/about-microbiology.html> ; <http://www.whoi.edu/oceanus/feature/the-most-inhospitable-places-on-earth> ; http://www.nasa.gov/home/hqnews/2012/nov/HQ_12-408_Lake_Vida_Microbes.html.
2. British and USA sites on Biotech. URL: <http://www.sfam.org.uk/> ; <http://rzv054.rz.tu-bs.de/Biotech/index.html> ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/education>.
3. Diffent educational sites. URL: www.sci-eng.mmu.ac.uk/intheloop ; <http://www.survivalrivals.org/the-x-bacteria/video> ; <http://www.microbelibrary.org/index.php/about/50>.
4. Different Culture collection sites. URL: <http://www.dsmz.de/> ; <http://www.lgcstandards-atcc.org/en/> ; <http://www.genetika.ru/vkpm/> ; <http://www.vkm.ru>.
5. Document on establishing of Astrobiology Committee of RAS. URL: <http://www.ras.ru/presidium/documents/directions.aspx?ID=3fbd5602-aa2f-4957-af09-6ca2e10d8b6e>.
6. Microbe's news ASM. URL: <http://www.microbemagazine.org/> ; <http://www.microbeworld.org>.

Краткий систематический обзор микроорганизмов-прокариот

При идентификации микробной культуры микробиологи опираются на указания «Руководства Берджи по систематике бактерий» («Bergey's Manual of Systematic Bacteriology»). В настоящее время выпущено 5 томов 2-го издания этого руководства.

Все прокариотические микроорганизмы в «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» разбиты на основании их происхождения и родства на группы, иногда не имеющие четкого таксономического статуса, называемые филумами (Phylum), или филогенетическими группами (линиями). Ниже будут перечислены группы, относящиеся к прокариотическим организмам и упомянутые в «Руководстве Берджи...», и представлены некоторые наиболее известные представители этих групп.

Домен *Archaea*

Домен *Archaea* разделен на пять филумов: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Nanoarchaeota*, включающих культивируемых представителей, причем только первые два кластера содержат значительное число микроорганизмов, полученных в виде чистых культур.

К первому филуму **A1. *Crenarchaeota*** относятся микроорганизмы, обитающие в очень специфических местах с узкими границами значений физико-химических факторов. Это экстремофилы, зависящие от серных соединений, оптимумы pH и температуры роста которых отличаются экстремальными значениями. Представляют собой морфологически разнородную группу, включающую грамотрицательные палочки, кокки, нитчатые формы, дисковидные клетки. Некоторые подвижны. облигатные термофилы, имеющие температурный интервал роста от 70 до 121°C. Ацидофилы. Аэробные, факультативные или строго анаэробные хемоли-тоавтотрофы или хемогетеротрофы. Большинство использует в метаболизме S⁰. Хемогетеротрофы могут расти за счет серного дыхания. Филум включает один класс *Thermoprotei* из трех порядков — I. *Thermoproteales* (роды *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Thermofilum*); II. *Desulfurococcales* (роды *Desulfurococcus*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium*); III. *Sulfolobales* (роды *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Sulfurococcus*).

Ко второму филуму **A2. *Euryarchaeota*** относятся повсеместно распространенные микроорганизмы нескольких физиологических и систематических групп, отличающиеся значительным морфологическим разнообразием (палочки, кокки, неправильные кокки, ланцетовидные, спиральные, дисковидные, треугольные и квадратные клетки). Клеточные стенки с псевдомуреином, белковые или полностью отсутствуют. Филум разделен на семь классов.

Классы *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri* (метаногенные археи) — это строгие анаэробы, обитающие в донных осадках пресноводных зон, богатых органикой, или в рубце жвачных и образующие метан из H_2/CO_2 , формиата, ацетата, метанола, метиламинов и H_2 /метанола. При 420 нм флуоресцируют сине-зеленым светом. Клетки содержат коферменты М, В, F_{420} , F_{430} , метаноптерин, метанофуран.

Экстремально галофильные археи объединены в класс *Halobacteria*. Это аэробные или факультативно анаэробные хемоорганотрофы, требующие для роста высоких концентраций NaCl (1,5 М и выше), палочки и кокки, окрашивающиеся грамвариабельно. Нейтрофилы или алкалифилы, растущие в мезофильных или умеренно термофильных (до 55°C) условиях. Способны осуществлять особый тип фотосинтеза с помощью бактериородопсина, который на свету работает как протонная помпа.

Класс *Thermoplasmata* включает археи, лишенные клеточной стенки. Это термоацидофильные, аэробные организмы, имеющие коккоидные клетки, цитоплазматическая мембрана которых содержит богатый маннозой гликопротеин и липогликан. У представителей рода *Thermoplasma* ДНК конденсирована в нуклеосомы с гистоноподобными белками. При высокой температуре клетки имеют вид неправильных филаментов, а при пониженной приобретают сферическую форму и могут иметь жгутики. Неправильные кокковидные клетки рода *Picrophilus* формируют на поверхности белковые S-слои.

Сульфатредуцирующие археи объединены в класс *Archaeoglobi* и являются строгими анаэробами, способными к диссимиляционной сульфатредукции. Экстремальные термофилы. Обладают сине-зеленой флуоресценцией при 420 нм. Имеют в клетках коферменты F_{420} и метаноптерин.

Класс *Thermococci* содержит строго анаэробных облигатных термофилов. Кокки неправильной формы окрашиваются по Граму отрицательно. Оптимум роста 67—103°C. Гетеротрофы, некоторые для роста используют элементарную серу.

Третий, четвертый и пятый филумы содержат единичные штаммы, полученные в виде чистых культур, а основная часть представителей не поддается культивированию, но для них известны последовательности генов, кодирующих молекулу 16S рРНК.

Домен *Bacteria*

Этот домен объединяет прокариотические микроорганизмы, обладающие типичными признаками бактерий, в частности, способностью к синтезу пептидогликана как основного опорного биополимера клеточных стенок. В настоящее время домен *Bacteria* разделен на 32 филогенетические группы, часть представителей которых культивируется в лаборатории. Ниже будут перечислены группы, упомянутые в «Руководстве Берджи...».

Филум **B1. *Aquificae*** — это древняя ветвь бактерий, объединяющая грамотрицательные неспорообразующие палочки или нити. Они являются термофилами с оптимумом роста 65—85°C, обладающими хемолитоавтотрофным или хемоорганотрофным типом метаболизма. Многие виды способны расти анаэробно за счет нитратредукции. Есть микроаэрофилы и аэробы. Представители родов *Aquifex* и *Hydrogenobacter* — микроаэрофилы, гипертермофилы (оптимальная температура роста 85°C), хемоли-

тоавтотрофы, использующие водород, тиосульфат и элементарную серу в качестве доноров электронов.

Филум **B2. *Thermotoga*** считается очень древней ветвью и объединяет граммотрицательные не образующие спор палочки, обитающие в геотермальных зонах, морских гидротермах, сольфатарах. Клетки имеют внешние покровы (тогу), отстающие от ЦПМ. Пептидогликан не содержит мезо-диаминопимелиновой кислоты (мезо-ДАП). Это строгие анаэробы, гипертермофилы (оптимальная температура роста 85°C), сахаро- и пептолители, использующие гликолиз, хемогетеротрофы. Потребляют широкий спектр органических соединений. Восстанавливают тиосульфат и (или) S^0 . H_2 подавляет их рост.

Филум **B3. *Thermodesulfobacteria*** группирует граммотрицательные палочки, внешний мембранный слой которых образует выпячивания. Это термофильные, строго анаэробные хемогетеротрофы, способные к диссимиляционной сульфатредукции.

Филум **B4. *Deinococcus*** — *Thermus* включает один класс *Deinococci*, состоящий из двух порядков.

Порядок I. *Deinococcales* объединяет грамположительные неподвижные сферические или палочковидные клетки со сложной многослойной клеточной стенкой, существующие парами или в тетрадах, синтезирующие пептидогликан без тейхоевых кислот. Растут мезофильно или термофильно. Это аэробы с хемоорганотрофным дыхательным метаболизмом. Клетки чрезвычайно устойчивы к ионизирующей радиации (выдерживают 3—5 млн рад, тогда как для человека летальной дозой является 100 рад). Порядок II. *Thermales* содержит граммотрицательные прямые палочки или нити. Они неподвижны и не образуют спор. Это термофилы и хемогетеротрофы со строго дыхательным метаболизмом. Некоторые виды способны использовать нитрат или нитрит в качестве конечного акцептора электронов. Этот филум является примером того, как кластеризация по молекулярно-генетическим критериям привела к объединению микроорганизмов, совершенно не схожих по морфологическим и цитологическим признакам.

Филум **B5. *Chrysiogenetes*** включает один класс с тем же названием и объединяет граммотрицательные подвижные изогнутые палочки, способные к анаэробному дыханию, в котором конечным акцептором электронов служит арсенат. Мезофилы. Близки по молекулярно-генетическим тестам к клостридиям, бациллам и дельтапротеобактериям.

Филум **B6. *Chloroflexi*** объединяет граммотрицательные нитчатые бактерии, обладающие скольльзящим движением. Их пептидогликан содержит в качестве диаминокислоты L-орнитин. Во внешней мембране отсутствуют липополисахариды. Один класс с тем же названием делится на два порядка. Порядок I. *Chloroflexales* включает нитчатые аноксигенные фототрофные бактерии (зеленые несерные бактерии), образующие бактериохлорофиллы и каротиноиды. Фотосинтетические пигменты находятся в хлоросомах. Все виды предпочитают использовать органические субстраты как при фото-, так и при хемотрофном метаболизме. В этот порядок входят два семейства: *Chloroflexaceae* (роды *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Heliothrix*) и *Oscillochloridaceae* (род *Oscillochloris*). Порядок II. *Herpetosiphonales* содер-

жит всего один род *Herpetosiphon*, у которого отсутствуют бактериохлорофиллы и имеются только каротиноиды. Метаболизм аэробный, хемогетеротрофный.

Филум **B7. *Thermomicrobia*** состоит из грамотрицательных коротких неправильных неподвижных палочек, не образующих споры. Пептидогликан не содержит диаминокислот в значительных количествах. Это гипертермофилы с оптимумом роста 70–75°C, облигатные аэробы и хемоорганотрофы.

Филум **B8. *Nitrospirae*** группирует грамотрицательные изогнутые, вибриоподобные или спиральные клетки с различными типами метаболизма. Большинство представителей — аэробные хемолитотрофы, включающие нитрификаторов, железобактерии и формы с магнитотаксисом (рода *Nitrospira*, *Leptospirillum*, *Magnetobacterium*). Один род *Thermodesulfovibrio* объединяет термофилов, облигатных ацидофилов и анаэробов. Близки к клостридиям, бациллам и дельтапротеобактериям.

Филум **B9. *Deferribacteres*** — это хемоорганогетеротрофы, дышащие анаэробно и использующие в качестве конечного акцептора электронов Fe^{3+} , Mn^{4+} , S^0 , Co^{3+} и нитрат (роды *Deferribacter*, *Geovibrio*, *Geobacter*). Близки к дельтапротеобактериям и нитроспирам.

Филум **B10. *Cyanobacteria*** состоит из пяти подсекций, выделенных в соответствии с морфологией, способом деления и дифференцированностью входящих в них организмов. Подсекции сразу подразделяются на формо-роды. В целом это грамотрицательные одноклеточные, колониальные или нитчатые окислительные фототрофные бактерии, имеющие жизненные циклы разной сложности. Фотосинтетический аппарат содержит две фотосистемы, что позволяет использовать H_2O в качестве фотовосстановителя при фотосинтезе. Все известные представители способны к фотоавтотрофии, а некоторые виды и штаммы могут расти фотогетеротрофно или хемогетеротрофно. Содержат хлорофилл *a*, а некоторые роды, ранее относимые к прохлорофитам, и хлорофилл *b*. Фикобилипротеины (аллофикоцианин, фикоцианин, иногда фикоэритрин) могут присутствовать или отсутствовать. Клеточная стенка имеет толстый слой пептидогликана (до 200 нм). По филогении близки к фирмикутам.

Филум **B11. *Chlorobi*** (зеленые серные бактерии) состоит из одного класса *Chlorobia*, содержащего пять родов (*Chlorobium*, *Ancalochloris*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon*, *Prosthecochloris*). Это грамотрицательные сферические, овоидные, прямые или изогнутые палочки, строгие анаэробы и облигатные фототрофы. Клетки растут преимущественно за счет фотоассимиляции простых органических соединений. Некоторые виды могут использовать сероводород или тиосульфат как донор электронов для фиксации CO_2 . Глобулы серы запасаются на внешней стороне клетки в присутствии сульфида и света, сера редко окисляется дальше до сульфата. Большинство родов способно расти как хемогетеротрофы в микроаэрофильных или аэробных условиях. В качестве источника азота используют аммоний и N_2 . Большинство родов требует одного или больше факторов для роста (биотин, тиамин, ниацин, ПАБК). Группа имеет общие корни с бактериоидами.

Филум **B12. *Proteobacteria*** является полифилетической группой (происходящей от нескольких предковых форм), объединяющей морфологически и физиологически разнообразные формы. Она условно подразделяется на двенадцать фенотипических групп, представители которых «разбросаны» в пяти классах *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Delta*- и *Epsilonproteobacteria*.

Первая группа — это грамотрицательные аэробные/микроаэрофильные палочки и кокки, в основном, хемоорганогетеротрофы, но некоторые могут расти автотрофно, используя H_2 как донор электронов. Они обладают строго дыхательным типом метаболизма с кислородом в качестве конечного акцептора. Некоторые роды также способны к анаэробному дыханию. Обитают в почве, пресной и морской воде, на различных частях растений, во внутренних органах человека и животных. Некоторые патогенны для человека и животных.

В этой группе два главных подтипа:

а) аэробные палочки и кокки, которые могут расти на воздухе при концентрации 21% O_2 . Некоторые роды в микроаэрофильных условиях фиксируют азот, а при наличии связанного азота растут как аэробы;

б) микроаэрофильные прямые палочки, показывающие кислород-зависимый рост при уменьшенных концентрациях кислорода и в отсутствии альтернативных акцепторов электронов. Некоторые роды могут дышать анаэробно с использованием нитрата, фумарата и т.д. Такие фенотипы представлены среди *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- и *Deltaproteobacteria*.

Вторая группа — это анаэробные прямые, изогнутые и спиральные грамотрицательные палочки, хемоорганогетеротрофы, получающие энергию путем анаэробного дыхания или брожения. Сюда не относят роды, использующие соединения серы как акцепторы электронов. Обычны среди *Beta*-, *Gamma*- и *Deltaproteobacteria*.

Третья группа включает аноксигенные фототрофные бактерии, содержащие бактериохлорофилл и способные использовать свет как источник энергии. При наличии света эти организмы растут анаэробно и не образуют кислород при фотосинтезе. В темноте способны расти в присутствии кислорода. Не содержат фикобилипротеинов. Группа делится на три подтипа:

а) клетки, способные расти с сульфидом и серой как единственными донорами электронов для фотосинтетической ассимиляции CO_2 . Они хорошо растут в фотоавтотрофных условиях, глобулы серы запасают внутри клетки, а затем могут дальше окислять до сульфата; содержат бактериохлорофиллы *a* и *b* и каротиноиды; могут нуждаться в витамине B_{12} (*Gammaproteobacteria*);

б) клетки, растущие преимущественно за счет фотоассимиляции простых органических соединений. Некоторые виды могут использовать сульфид или тиосульфат как донор электронов для фиксации CO_2 , глобулы серы формируются только вне клетки и редко окисляются до сульфата. Большинство родов способно расти как хемогетеротрофы в микроаэрофильных или аэробных условиях. Источник азота для них — аммоний и молекулярный азот. Большинство родов нуждается в факторах роста: биотине, тиамине, ниацине, ПАБК (*Alpha*- и *Betaproteobacteria*);

в) клетки, растущие хемогетеротрофно в аэробных условиях и не растущие анаэробно на свету. Метаболизм преимущественно дыхательный, содержат бактериохлорофилл *a* и каротиноиды (*Alphaproteobacteria*).

Четвертая группа — это нефототрофные бактерии, не образующие плодовые тела, палочки или нити без жгутиков, способные скользить по твердой поверхности. Имеют простые жизненные циклы. Некоторые представители формируют чехлы, иногда образуют микроспоры.

Группа подразделяется на четыре подтипа:

а) одноклеточные палочковидные скользящие бактерии, часто плейоморфные, хемоорганотрофы, аэробы, факультативные или облигатные анаэробы (некоторые *Gammaproteobacteria*);

б) плоские, нитчатые скользящие бактерии, хемоорганотрофы, аэробы, сахаролитики; найдены в ротовой полости теплокровных (*Betaproteobacteria*);

в) окисляющие соединения серы скользящие бактерии, размеры клеток которых сильно варьируют, в большинстве — нитчатые. В присутствии сульфида и тиосульфата сера накапливается внутри клеток. Они хемоорганотрофы и хемолитотрофы, для которых показана миксотрофия и дыхательный метаболизм (*Gammaproteobacteria*);

г) организмы, не вошедшие в первые три подтипа (некоторые *Beta*- и *Gammaproteobacteria*).

Пятая группа аэробных хемолитотрофов условно подразделяется на три подтипа:

а) нитрификаторы, использующие восстановленные неорганические соединения азота как источник энергии для роста;

б) организмы, окисляющие серу и серные соединения для получения энергии;

в) облигатные окислители водорода.

Первые встречаются среди *Beta*-, *Gamma*- и *Epsilonproteobacteria*, вторые — только среди *Betaproteobacteria*, а третьи — везде, кроме *Epsilonproteobacteria*.

Шестая группа факультативно анаэробных грамотрицательных палочек содержит хемоорганогетеротрофов, некоторые из которых могут расти автотрофно с H_2 в качестве донора электронов. На воздухе растут за счет дыхания, в анаэробных условиях — за счет брожения. Живут как свободно, так и в мутуалистических и паразитических ассоциациях с животными, человеком или растениями (группа энтеробактерий).

Седьмая группа почкующихся и (или) простековых нефототрофных бактерий подразделяется на два подтипа по присутствию или отсутствию простек и по способу клеточного деления. Оба фенотипа встречаются среди *Alphaproteobacteria*, а беспростековые формы — среди *Gammaproteobacteria*.

Восьмая группа — это аэробные/микроаэрофильные подвижные спиральные/вибриоидные грамотрицательные бактерии. Клетки в виде вибрионов или спиралей, движущиеся с помощью полярных жгутиков, аэробы или микроаэрофилы с дыхательным метаболизмом. Некоторые способны к фумаратному или нитратному анаэробному дыханию. Большинство —

хемоорганотрофы, но часть представителей способна расти автотрофно с молекулярным водородом. Обитают в почве, пресной и морской воде, на корнях и репродуктивных органах растений, в кишечнике человека. Некоторые являются хищниками по отношению к другим микроорганизмам. Имеются во всех классах протеобактерий.

Девятая группа симбиотических и паразитических бактерий позвоночных и беспозвоночных содержит облигатных внутриклеточных паразитов эукариотических хозяев. Клетки могут быть палочковидными, кокковидными или плейоморфными. Размножаются бинарным делением. Клеточная стенка содержит муравовую кислоту. Некоторые патогенны для человека, других позвоночных и беспозвоночных. Присутствуют среди *Alpha*- и *Gammaproteobacteria*.

Десятая группа — это скользящие бактерии, образующие плодовые тела. Они являются хемоорганотрофами и строгими аэробами без жгутиков, которые могут скользить по твердой поверхности. При исчерпании питательных веществ клетки агрегируют и формируют плодовые тела, состоящие из модифицированной слизи и клеток, часто ярко окрашенные и имеющие макроскопические размеры. Плодовые тела различаются по сложности строения и размерам. Внутри плодовых тел формируются микоспоры или микроцисты (порядок *Myxococcales*).

Одиннадцатая группа бактерий в чехлах объединяет нефототрофные аэробные микроорганизмы, не обладающие скользящим движением. Растут в виде нитей, заключенных в прозрачные чехлы, окрашенные в цвета от желтого до темно-коричневого в зависимости от мощности отложений оксидов железа или марганца. Единичные клетки могут двигаться с помощью полярных или субполярных жгутиков или быть неподвижными (два рода из класса *Betaproteobacteria*).

Двенадцатая группа неподвижных или малоподвижных изогнутых грамотрицательных бактерий включает хемоорганогетеротрофных сапрофитов четырех морфотипов (по степени «извитости») — от слабо закрученных до кольцевых структур. Наиболее оригинальная морфология у рода *Ancylobacter* — изогнутые или С-образные клетки могут образовывать кольца путем перехлестывания концов клетки. Иногда содержат газовые вакуоли. Растут аэробно (*Alphaproteobacteria*).

На примере строения филума *Proteobacteria* видно, что выделенные на основании молекулярно-генетического подхода большие группы получают «сборными» с точки зрения морфолого-физиологической классификации бактерий. Стремление ввести филогенетические критерии привело к передвижке многих таксонов в другие группы, разделению и переопределению таксонов.

Филум *Proteobacteria* состоит из пяти классов.

Класс I. *Alphaproteobacteria* включает шесть порядков.

Порядки I и III (*Rhodospirillales* и *Rhodobacterales*) объединяют фототрофных пурпурных несерных бактерий (например, из родов *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*).

Порядок II. *Rickettsiales* содержит облигатных внутриклеточных паразитов, возбудителей болезней человека. Род *Rickettsia* включает палочковид-

ные формы со сложным жизненным циклом, имеющие очень маленький геном. Они не могут самостоятельно катаболизировать углеводы и другие вещества и синтезировать АТФ, не содержат флавопротеинов и цитохромов, но имеют транслоказы для АТФ хозяина и белки-порины. Нуждаются в предшественниках для синтеза ДНК, РНК, гликогена, липидов и белков, но сами способны синтезировать некоторые аминокислоты и коферменты.

Порядок IV. *Sphingomonadales* объединяет скользкие бактерии (сфингобактерии). К роду *Cytophaga* относятся длинные гибкие палочки с заостренными концами, аэробы, разлагающие целлюлозу или хитин при тесном контакте с субстратом. Клетки содержат каротиноид флексирубин. Представители рода *Sporocytophaga* образуют покоящиеся округленные клетки-цисты. Бактерии, формирующие длинные нити, способные к лизису структурных белков (кератина) и клеток других бактерий (образованию «пятен» на газоне), относятся к родам *Flexibacter*, *Microscilla* и *Lysobacter*. Образующие трихомы *Vitreoscilla* и *Leucothrix* обитают на поверхности илов. Организмы рода *Sphingomonas* содержат в клеточной стенке сфинголипиды. Роды *Erythrobacter*, *Erythromicrobium*, *Erythromonas*, *Porphyrobacter* относятся к эритробактериям — «квазифототрофам». В группу скользких бактерий относят также нитчатых серобактерий родов *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*, *Thiomargarita*, *Macromonas* и др.

В порядок V. *Caulobacterales* включены почкующиеся и простекобактерии. У таких организмов материнская и дочерняя клетки легко различимы. Представители рода *Hyphomicrobium* образуют дочернюю клетку на гифе в виде небольшого вздутия со жгутиком. Вместо почки могут образовываться экзоспores. Гифы иногда ветвятся. Это типичные обитатели почвы и воды, метилотрофы. Микроорганизмы рода *Pedomicrobium* разлагают почвенный гумус. Простекобактерии характеризуются клетками, имеющими вид «кегли» из-за того, что нитевидные выросты раздуваются вошедшей в них цитоплазмой. Это типичные обитатели водоемов и почв, аэробы, олиготрофы. Представители рода *Caulobacter* образуют розетки из клеток, соприкасающихся простеками, дочерняя клетка имеет жгутик и способна двигаться после деления. Клетки рода *Prosthecomicrobium* могут формировать несколько простек. Организмы, относящиеся к роду *Stella*, образуют клетки в виде плоской шестилучевой звезды.

Порядок VI. *Rhizobiales* объединяет симбиотических и свободноживущих азотфиксаторов, а также так называемых «квазифототрофов» (род *Photorhizobium*). Микроорганизмы рода *Rhizobium* относятся к симбиотическим азотфиксаторам, обитающим в клубеньках на корнях бобовых растений. К свободноживущим азотфиксаторам почвы относятся представители родов *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*. Раковые разрастания в тканях высших растений образуют организмы рода *Agrobacterium*, обладающие Ti-плазмидами.

Класс II. *Betaproteobacteria* состоит из шести порядков (*Burkholderiales*, *Hydrogenophilales*, *Methylophilales*, *Neisseriales*, *Nitrosomonadales*, *Rhodocyclales*) и содержит микроорганизмы с разной физиологией (хемооргано-гетеротрофы, водородные бактерии, метилотрофы, возбудители тяжелых заболеваний человека, нитрификаторы I фазы, фототрофные пурпурные

несерные бактерии). Сюда же входит род *Roseateles*, способный разлагать антропогенные полимеры, синтезирующий компоненты фотосинтезирующего аппарата и осуществляющий аноксигенный фотосинтез в аэробных условиях. К этому классу также относятся грамотрицательные палочки в цепочках, заключенные в общий чехол, органотрофы, аэробы, обитающие в загрязненной воде и в активных илах аэротенков. Например, у рода *Sphaerotilus* клетки заключены в трубчатый чехол и формируют серые обрастания в воде. Организмы рода *Leptothrix* имеют чехлы, инкрустированные окислами металлов. Представители рода *Haliscamenobacter* ответственны за «вспухание» активного ила. У бактерий рода *Crenothrix* чехол расширяется к концу, и в этом месте путем дробления образуются мелкие клетки.

Класс III. *Gammaproteobacteria* включает тринадцать порядков (*Chromatiales*, *Xanthomonadales*, *Cardiobacteriales*, *Thiothrichales*, *Legionellales*, *Methylococcales*, *Oceanospirillales*, *Pseudomonadales*, *Alteromonadales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales*, *Enterobacteriales*, *Pasteurellales*). Самые значимые из них содержат пурпурные серные бактерии родов *Chromatium*, *Thiocystis*, *Thiospirillum*, *Thiocapsa*, *Thiodictyon*, *Amoebobacter*, *Thiopedia*, *Ectothiorhodospira*, возбудителей тяжелых легочных заболеваний человека рода *Legionella*, метилотрофов различной морфологии (роды *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylococcus*), роды *Aquaspirillum* и *Oceanospirillum* объединяют свободноживущие водные микроорганизмы. Представители рода *Pseudomonas* являются космополитами в мире микробов. Псевдомонады быстро растут на богатых средах и способны к использованию разнообразных органических веществ, в том числе ксенобиотиков. Род *Alcaligenes* включает палочки с редкими перитрихальными жгутиками, растут на средах с водородом. Микроорганизмы рода *Zymomonas* осуществляют термофильное спиртовое брожение. Род *Zoogloea* объединяет аэробные, труднокультивируемые организмы, образующие хлопья в виде слизистых, разветвленных микроколоний, обитающие в аэротенках. Коккобациллы с широкими метаболическими возможностями объединены в род *Paracoccus*. В аэробных условиях они используют сахара, метанол и органические кислоты, могут осуществлять анаэробное нитратное дыхание, а в присутствии $H_2 + CO_2$ вести хемолитоавтотрофный образ жизни. Микроорганизмы, осуществляющие неполные окисления и являющиеся ацидофилами, относятся к роду *Acetobacter*. Род *Halomonas* объединяет хемоорганотрофных аэробов, растущих в высокоминерализованных водоемах с большим содержанием поваренной соли. Водородные бактерии рода *Acidovorax* используют в своем метаболизме молекулярный водород и органические кислоты. Представители рода *Alteromonas* обитают в морской воде. Изогнутые подвижные палочки с полярным жгутиком относятся к роду *Vibrio* и являются алкалифилами с преимущественно бродильным типом метаболизма. Энтеробактерии являются грамотрицательными подвижными палочками, факультативными анаэробами, органотрофами, в анаэробных условиях обладающими бродильным типом метаболизма. Легко растут на агаризованных средах, большинство из них — сахаролитики. Перитрихальное жгутикование присуще микроорганизмам родов *Escherichia* (типичные обитатели кишечника, относятся к условно патогенным, оппортунистиче-

ским организмам), *Proteus* (гнилостные бактерии, обитающие в почве и на продуктах питания), *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* (возбудители кишечных инфекций), *Klebsiella* (свободноживущие азотфиксаторы, обитающие в воде и почве), *Serratia* (типичные почвенные организмы, синтезирующие ярко-красные пигменты), *Erwinia* (возбудители болезней растений). Свободноживущие и симбиотические микроорганизмы рода *Photobacterium* обладают способностью к биолюминесценции.

Класс IV. *Deltaproteobacteria* состоит из семи порядков.

Порядки I—IV (*Desulfurellales*, *Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales*) включают сульфидогенов. Сюда относятся сульфат- и серуредуцирующие бактерии разной морфологии: *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfonatronovibrio* (экстремальные алкалифилы), *Desulfohalobium* (экстремальные галофилы), *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*. Сульфатредукторы в анаэробных сообществах обычно функционируют как вторичные анаэробы, удаляющие молекулярный водород из анаэробной системы. К серуредуцирующим микроорганизмам относятся, например, представители родов *Desulfuromonas* и *Desulfurella* (термофилы).

Порядок V. *Syntrophobacterales* объединяет микроорганизмы, склонные к существованию в синтрофных ассоциациях.

Порядок VI. *Bdellovibrionales* включает водных хищников (паразитов) грамотрицательных бактерий и водорослей, очень мелких подвижных вибрионов родов *Bdellovibrio* и *Vampirovibrio*.

Порядок VII. *Myxococcales* содержит грамотрицательные палочки со скользящим движением и сложным жизненным циклом, приводящим к образованию плодовых тел. Это аэробные органотрофы, обладающие мощными гидролазами и способные разлагать природные полимеры. Они способны к индивидуальной дифференциации от вегетативной клетки до микроцисты и коллективной дифференциации от колонии до образования плодового тела. Вегетативные клетки делятся и образуют координированно движущуюся колонию (рой). Когда запасы питательных веществ достаточны, такая колония движется по поверхности, поедая субстрат и выделяя слизь. При истощении питания миксобактерии агрегируют и образуют плодовые тела. Этот процесс запускается кроме голодания еще пятью сигналами. Два из них: А-фактор — смесь пептидов и аминокислот и белковый С-фактор, выделяют сами клетки. На плодовых телах некоторые клетки дифференцируются в миксоспоры в спорангиях. Миксобактерии обитают в почве, компостах, навозе, многие являются «микрохищниками». Веретеновидные клетки, образующие круглые миксо(микро)цисты без спорангиев, объединяют в род *Myxococcus*. К роду *Archangium* относятся организмы, формирующие палочковидные микроцисты. Род *Cystobacter* имеет спорангии без стебельков, спорангии на стебельках образуют клетки рода *Mellitangium*. Представители рода *Polyangium* отличаются клетками с прямыми концами и округлыми спорангиями. Род *Nannocystis* образует сложные плодовые тела.

Класс V. *Epsilonproteobacteria* объединяет представителей двух семейств *Helicobacteraceae* и *Campylobacteraceae*. Это грамотрицательные подвижные прямые, изогнутые и спиральные палочки, микроаэрофилы, обитающие

в желудочно-кишечном тракте человека и других млекопитающих. Есть как непатогенные виды, так и возбудители септицемии, диареи, энтеритов, гастритов и язв. Обладают мощной уреазой. Кампилобактеры являются хищниками (паразитами) микроводорослей, внедряясь под клеточную оболочку и лизируя клеточное содержимое.

Филум **B13. *Firmicutes*** объединяет преимущественно грамположительные бактерии с низким содержанием Г + Ц в ДНК. Включает три класса.

Класс I. *Clostridia* содержит три порядка.

Порядок I. *Clostridiales* подразделяется на ряд семейств, самые значимые из которых семейства *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Heliobacteriaceae*. Порядок II. *Thermoanaerobacteriales* объединяет термофильные микроорганизмы, осуществляющие брожения с выделением H_2 и органических кислот (роды *Moorella*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobium*).

Представители порядка III. *Haloanaerobiales* существуют при повышенных концентрациях поваренной соли.

Класс II. *Mollicutes* объединяет микроорганизмы, лишенные клеточной стенки, со сложными пищевыми потребностями.

Класс III. *Bacilli* включает два порядка.

Порядок I. *Bacillales* содержит ряд семейств, из которых наиболее значимы *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Thermoactinomycetaceae*, *Staphylococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Listeriaceae*.

В порядок II. *Lactobacillales* входит значительное количество семейств, из которых наиболее известны *Aerococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*.

Филум объединяет фенотипически разнородные микроорганизмы (14 групп). Первая группа — термофильные и гипертермофильные бактерии, растущие при температурах $> 65^\circ C$. Это два рода из класса *Clostridia* — *Coprothermobacter* и *Carboxydotherrmus*.

Вторая группа — анаэробные прямые, изогнутые и спиральные грамотрицательные палочки (несмотря на характер окраски по Граму отнесены в этот филум в соответствии с молекулярно-генетическими тестами). Хемоорганогетеротрофы получают энергию за счет анаэробного дыхания или брожения (кроме организмов, использующих окисленные соединения серы или S^0 в качестве акцепторов электронов). Широко распространены в классе *Clostridia* и есть в одном роде класса *Bacilli* — *Acetoanaerobium*.

Третья группа — аноксигенные фототрофные бактерии. Клетки растут за счет фотоассимиляции простых органических соединений. Строгие анаэробы и фотогетеротрофы. Не используют восстановленные соединения серы. Источник азота для них — аммоний и N_2 . Внутренние мембранные системы и хлоросомы отсутствуют. Клетки содержат бактериохлорофилл *g* и каротиноиды. Клеточная стенка без ЛПС (семейство *Heliobacteriaceae*).

Четвертая группа — скользящие нефототрофные бактерии, не образующие плодовые тела, это палочки или нити без жгутиков, способные скользить по твердой поверхности. Имеют простые жизненные циклы (два рода из класса *Bacilli* — *Filifactor* и *Agitococcus*).

Пятая группа — аэробные нефототрофные хемолитотрофные бактерии, могут окислять восстановленные неорганические соединения серы (род *Sulfobacillus* из класса *Bacilli*).

Шестая группа — бактерии, способные к диссимиляционной сульфат- или сульфитредукции, — это хемоорганогетеротрофы, дышащие анаэробно с сульфатом и другими окисленными соединениями серы или с S^0 в качестве конечного акцептора электронов (род *Desulfotomaculum* из класса *Clostridia*).

Седьмая группа — симбионты или паразиты позвоночных и беспозвоночных. Сюда относятся облигатные внутриклеточные паразиты эукариотических хозяев. Это палочковидные, кокковидные или плеоморфные организмы. Многие виды патогенны. Встречаются среди классов *Mollicutes* и *Bacilli*).

Восьмая группа — анаэробные грамотрицательные кокки (несмотря на характер окраски по Граму отнесены в этот филум в соответствии с молекулярно-генетическими тестами). Хемоорганогетеротрофы со строго бродийным типом метаболизма (семейство *Acidaminococcaceae* из класса *Clostridia*).

Девятая группа — грамположительные кокки — это хемоорганотрофы, мезофилы, не образующие спор. Первый подтип содержит аэробные кокки, образующие пары, гроздьи или тетрады (роды *Streptococcus*, *Sarcina*), которые имеют каталазу и цитохромы. В клеточной стенке нет тейхоевых кислот. При росте на углеводах часто отсутствует кислотообразование. Второй подтип объединяет факультативно анаэробные или микроаэрофильные кокки в парах, цепочках, гроздьях или тетрадах (род *Staphylococcus*). Наличие каталазы, цитохромов и тейхоевых кислот варьирует. Третий подтип — это строго анаэробные кокки в парах, цепочках, тетрадах или кубических пакетах (роды *Peptococcus*, *Ruminococcus*). Цитохромы не обнаружены. Реакция на каталазу обычно негативная.

Десятая группа — образующие эндоспоры грамположительные палочки и кокки, формируют устойчивые к нагреванию эндоспоры. Подвижны, в основном, палочки или нити. Один род (*Sporosarcina*) содержит подвижные кокки в тетрадах или кубических пакетах. Встречаются как строгие аэробы, микроаэрофилы, так и факультативные или строгие анаэробы (представители родов *Bacillus*, *Clostridium*).

Одиннадцатая группа — правильные не образующие спор грамположительные палочки (от коккобацилл до удлиненных палочек или нитей). Обычно непигментированные мезофильные хемоорганотрофы, растущие только в сложных средах. Некоторые патогенны для животных. Первый подтип объединяет сахаролитических микроаэрофилов без гем-содержащей каталазы, цитохромов или менахинонов, использующих кислород через флавиновые оксидазы и пероксидазы. Второй подтип включает аэробов или факультативных анаэробов, которые имеют кофакторы и ферменты дыхания. Эти организмы также способны сбраживать сахара, в основном, до лактата в лимитированных по кислороду или анаэробных условиях. Третий подтип объединяет строгих аэробов, которые не используют глюкозу как источник углерода и энергии и не сбраживают сахара до органических

кислот (встречаются во всех трех классах филума *Firmicutes*, например это роды *Lactobacillus*, *Caryophanon*).

Двенадцатая группа — неправильные неспорулирующие грамположительные палочки, имеют грамвариабельную окраску. Растут в присутствии воздуха (от строгих аэробов до строгих анаэробов) и не образуют эндоспор. Могут быть патогенными для животных и растений (во всех трех классах филума *Firmicutes*).

Тринадцатая группа, микоплазмы, — это плеоморфные клетки, лишенные клеточной стенки, образующие на агаре колонии в виде «яичницы-глазуньи». Могут передвигаться скольжением. Имеют сложные пищевые потребности, некоторые виды нуждаются в стеролах. Некоторые осуществляют гликолиз и молочнокислое брожение, не имеют полного ЦТК. Факультативные или облигатные анаэробы. Содержание Г + Ц (23–46%), класс *Mollicutes*.

Четырнадцатая группа — термоактиномицеты. Это грамположительные организмы, формирующие субстратный и воздушный мицелий. Клеточная стенка содержит мезо-ДАП. На обоих видах мицелия образуются эндоспоры. Являются термофилами, обитающими в саморазогревающихся субстратах (компостах). Некоторые патогенны для человека (аллергическое заболевание «фермерские легкие», один род *Thermoactinomyces* из класса *Bacilli*).

Филум **B14. Actinobacteria** объединяет грамположительные бактерии с высоким содержанием Г + Ц в ДНК и родственные им организмы, красящиеся по Граму отрицательно. Содержит один класс с тем же названием, включающий пять подклассов и десять подпорядков. Морфологически и физиологически разнообразны. К одноклеточным актинобактериям относят ряд фенотипических групп. Это грамотрицательные аэробные палочки и кокки, относящиеся к хемоорганогетеротрофам, способные расти на воздухе (21% O₂), имеющие дыхательный тип метаболизма. В микроаэрофильных условиях могут фиксировать азот (семейство *Actinothermaceae*). Второй группой являются аэробные окислители серы, нефототрофы, способные окислять восстановленные соединения серы с получением энергии (род *Acidimicrobium*). Еще одна нефототрофная группа, содержащая одноклеточные почкующиеся и (или) простековые бактерии, составляет род *Blastococcus* из подпорядка *Frankineae*. Группа грамположительных кокков, не образующих спор, хемоорганотрофов, мезофилов, входит в подпорядки *Micrococcineae*, *Propionibacterineae* и семейство *Kineosporiaceae*. Это строгие анаэробы, у которых не обнаружены цитохромы и каталаза. Клетки образуют устойчивые сочетания в виде пар, цепочек, тетрад, кубических пакетов. В родах *Cellulomonas*, *Rhodococcus* присутствуют правильные бесспоровые грамположительные палочки (от коккоидов до удлинённых палочек или нитей). Они обычно непигментированы, растут только в сложных средах, являются мезофильными хемоорганотрофами, аэробами или факультативными анаэробами. Содержат кофакторы и ферменты дыхания. Неправильные бесспоровые грамположительные палочки, способные формировать разветвленные нитчатые элементы, смеси палочек и нитей, коккоидные формы, относятся к родам *Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*. Некоторые имеют жизненный цикл «палочки — кокки». От строгих ана-

эробов до строгих аэробов. Есть представители, патогенные для животных или растений, и обычные обитатели желудочно-кишечного тракта и рубца. Род *Mycobacterium* составляют аэробные, неподвижные, бесспорные, медленно растущие, кислотоустойчивые палочки (микобактерии), которые иногда формируют ветвящиеся нити. Воздушного мицелия не образуют. Обычные обитатели почвы и воды. Некоторые патогенны для животных и человека (вызывают туберкулез, проказу).

К спороактиномицетам также относится несколько фенотипических групп. Это нокардиоформы — грамположительные, морфологически различные организмы (прямые и изогнутые палочки, могут формировать рудиментарный и разветвленный мицелий, фрагментирующийся в бациллярные или коккоидные элементы). Некоторые роды могут образовывать воздушный мицелий и цепочки артроспор. Аэробы или факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Большинство — свободноживущие сапротрофы, обитатели почвы. Некоторые патогенны для человека и животных (вызывают дифтерию, ноккардиомикозы). Присутствуют в подпорядках *Corynebacterineae*, *Pseudonocardineae*, семействах *Nocardioideaceae*, *Promicromonosporaceae*. Актиномицеты с многоклеточными спорангиями составляют семейство *Dermatophilaceae* подпорядка *Frankineae*. Их филаменты делятся, образуя цепочки из коккоидных элементов, иногда формируется воздушный мицелий. Клетки на поверхности образуют спорангии с подвижными или неподвижными спорами. Это аэробы, органотрофы, некоторые — микроаэрофилы, симбиотические азотфиксаторы. Актинопланы, клеточная стенка которых содержит мезо-ДАП и глицин, являются хемоорганотрофами, обитают на влажных растительных остатках и в почве. Воздушный мицелий не формируется или образуется в незначительных количествах. Некоторые имеют подвижные споры, которые образуются в спорангиях. Другие образуют неподвижные споры, одиночные или в цепочках (род *Actinoplanes*, семейство *Micromonosporaceae*). У стрептомицетов мицелиальный рост часто сопровождается сильным развитием воздушного мицелия с длинными цепочками спор. Клеточная стенка содержит L-ДАП и глицин. Колонии обычно ярко пигментированы. Большинство представителей — строгие аэробы, хемогетеротрофы, использующие широкий спектр соединений, но отличающиеся медленным ростом. Обладают мощными гидролазами. Типичные обитатели почв, есть патогенные виды (вызывают актиномикозы). Ряд представителей являются продуцентами важнейших антибиотиков (род *Streptomyces*). Клеточная стенка мадурамицетов содержит мезо-ДАП и мадурузу. Первый подтип объединяет актинобактерий с разветвленным нефрагментированным вегетативным мицелием, который формирует воздушный мицелий, производящий две или более артроспоры или спорангии с одной или более спорами, подвижными или неподвижными (роды *Actinomadura*, *Microbispora*). Второй подтип содержит актинобактерий с сильно разветвленными, нефрагментированными гифами, которые образуют плотный вегетативный мицелий. Воздушного мицелия может не быть. Цепочки артроспор могут быть прямыми и спиральными (роды *Spirillospora*, *Streptosporangium*). Мадурамицеты — хемогетеротрофы, аэробы. Термомоноспоры формируют споры одиночные, в цепочках или в спорангиоподобных структурах. Мицелиальный

рост с разной степенью развития воздушного мицелия. Клеточная стенка содержит мезо-ДАП (род *Dactylosporangium*). К другим спороактиномицетам относятся хемоорганотрофы с мицелиальным ростом, формирующие длинные цепочки артростор на воздушном мицелии. Клетки не синтезируют миколовые кислоты (семейство *Actinomycetaceae*).

Филум **B15. *Planctomycetes*** включает один класс с тем же названием из одного порядка *Planctomycetales*, содержащего одно семейство *Planctomycetaceae* (наиболее изучены представители родов *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*). Это грамотрицательные сферические, овоидные и пузыревидные клетки, размножающиеся почкованием. Клетки могут образовывать один или больше слизистых стебельков. Клеточная стенка не содержит пептидогликана. Представители родов *Pirellula* и *Gemmata* имеют мембрану, покрывающую нуклеоид. Олиготрофы, водные организмы. Часть планктомицетов способна осуществлять анаэробное окисление аммония (анаммокс). Планктомицеты являются труднокультивируемыми формами.

Филум **B16. *Chlamydiae*** состоит из одного класса *Chlamydia*, включающего один порядок *Chlamydiales* из четырех семейств (*Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*). Это неподвижные облигатные паразиты, коккоиды, размножающиеся внутри вакуолей клеток млекопитающих. За исключением организмов рода *Parachlamydia*, красящихся грамвариабельно, остальные представители филума — грамотрицательные. Клеточная стенка не содержит муравовой кислоты или она есть в следовых количествах. Размножение происходит в сложном жизненном цикле. В клетках отсутствует ряд ферментов и кофакторов катаболических и анаболических путей, АТФ транспортируется из клеток хозяина, для синтеза основных биологических полимеров необходимы предшественники. Имеют очень маленький геном (272 гена). Некоторые являются возбудителями болезней человека (вызывают пневмонию, трахому, хламидиозы).

Филум **B17. *Spirochaetes*** состоит из одного класса с тем же названием, включающего один порядок *Spirochaetales* из трех семейств (*Spirochaetaceae*, *Serpulinaceae*, *Leptospiraceae*). Это грамотрицательные, длинные спиральные клетки, имеющие аксиальные фибриллы (эндожгутики). Хемогетеротрофы. Род *Spirochaeta* — это анаэробы, осуществляющие брожение сахаров по пути Эмбдена — Мейергофа, отличаются широкой адаптацией к физическим факторам (температуре, минерализации среды, pH). Являются типичными свободноживущими членами целлюлозоразрушающих сообществ, обитают в ротовой полости человека, в метантенках, в анаэробных осадках морей и щелочных озер. Представители рода *Leptospira* имеют характерный крючок на конце клетки, являются свободноживущими аэробными водными формами. Роды *Treponema*, *Borrelia*, *Cristispira* содержат возбудителей тяжелых заболеваний человека и животных (сифилиса, возвратных тифов и т.д.).

Филум **B18. *Fibrobacteres*** представлен одним родом *Fibrobacter*. Это грамотрицательные палочковидные или плейоморфные бактерии, не образующие спор. Облигатные анаэробы, хемоорганогетеротрофы. Связаны с пищеварительным трактом млекопитающих. Родственны спирохетам и хламидиям.

Филум **B19. *Acidobacteria*** включает один класс *Acidobacteria* из одного порядка *Acidobacteriales*, содержащего одно семейство *Acidobacteriaceae* (наиболее значимые роды *Acidobacterium*, *Sporohalobacter*, *Geothrix*). Это грамотрицательные бесспоровые палочки, мезофилы, хемоорганогетеротрофы. Первый подтип содержит аэробные ацидотолерантные микроорганизмы. Второй подтип включает анаэробные организмы, получающие энергию за счет анаэробного дыхания или брожения.

Филум **B20. *Bacteroidetes*** состоит из трех классов (*Bacteroidetes*, *Flavobacteria*, *Sphingobacteria*) и содержит грамотрицательные микроорганизмы разной морфологии и физиологии. Представлен несколькими фенотипическими группами. Аэробные/микроаэрофильные палочки способны расти на воздухе и имеют строго дыхательный метаболизм. Акцептор электронов чаще всего O_2 , но некоторые способны к анаэробному дыханию. Преимущественно хемоорганогетеротрофы, но некоторые могут расти автотрофно с H_2 как донором электронов. Обитают в почве, пресной и морской воде, на разных частях растений, во внутренних органах человека или животных. Есть патогенные представители. Первый подтип содержит аэробные палочки, которые растут на воздухе (21% O_2). Ряд родов в микроаэрофильных условиях фиксируют азот, при наличии связанных форм азота растут как аэробы (представители класса *Flavobacteria*). Второй подтип объединяет микроаэрофильные прямые палочки, которые не растут при концентрации кислорода 21%. Кислород-зависимый рост наблюдается при уменьшенных концентрациях O_2 и в отсутствии альтернативного акцептора электронов. Некоторые роды могут дышать анаэробно с нитратом, фумаратом и др. (представители класса *Sphingobacteria*). Коккоиды разного размера входят в род *Bacteroides*, изогнутые палочки с пучком жгутиков на вогнутой стороне — представители родов *Succinivibrio*, *Selenomonas*. Анаэробные грамотрицательные палочки присутствуют в классе *Bacteroidetes* и роде *Psychromonas* из класса *Flavobacteria*. Они хемоорганогетеротрофы, получают энергию путем анаэробного дыхания или брожения. Сюда не включают организмы, дышащие анаэробно с использованием окисленных соединений серы в качестве акцепторов электронов. Скользящие нефототрофные бактерии, не образующие плодовые тела, представляют собой одноклеточные скользящие палочки, часто плейоморфные. Жгутиков нет. Они хемоорганотрофы, аэробы, факультативные или облигатные анаэробы. Имеют простой жизненный цикл (представители класса *Sphingobacteria*). Симбионты беспозвоночных являются облигатными внутриклеточными паразитами эукариотических хозяев, грамотрицательными палочками (род *Blattabacterium* из класса *Bacteroidetes*). Бактерии в чехлах — это нефототрофные аэробные организмы, не способные к скользящему движению. Они растут в виде филаментов, в которых клетки покрыты прозрачными чехлами (цвет — от желтого до темно-коричневого в зависимости от отложений оксидов железа и марганца). Отдельные клетки могут быть неподвижны или двигаться с помощью полярных или субполярных жгутиков (несколько родов класса *Sphingobacteria*). Неподвижные или малоподвижные изогнутые грамотрицательные бактерии входят в роды *Ancylobacter*, *Renobacter*, *Tetrarcus*. Это аэробные,

аэротолерантные или анаэробные хемоорганогетеротрофы, сапротрофы. Клетки могут быть изогнутые, сильно извитые, спиральные или кольцевидные за счет перехлестывания концов С-образных клеток. Газовые вакуоли отсутствуют. Обитатели почвы, пресной и морской воды.

Филум **B21. *Fusobacteria*** включает один класс с тем же названием, один порядок *Fusobacteriales* и одно семейство *Fusobacteriaceae*. Объединяет анаэробные грамотрицательные палочки с хемоорганогетеротрофным метаболизмом, при брожении образующие смесь органических кислот. Обитают в рубце жвачных, кишечном тракте и ротовой полости человека и животных. Имеются патогенные представители.

Филум **B22. *Verrucomicrobia*** содержит два рода *Verrucomicrobium* и *Prostheco bacter*, объединенные в одно семейство *Verrucomicrobiaceae*, один порядок *Verrucomicrobiales* и один класс *Verrucomicrobiae*. Это грамотрицательные бактерии с пептидогликаном клеточной стенки, содержащим ДАП. Некоторые виды способны образовывать простеки или фимбрии. облигатные или факультативные аэробы, хемогетеротрофы, мезофилы. Размножаются бинарным делением или почкованием. Почки могут образовываться на верхушке простеки или прямо на клеточной поверхности. Микроорганизмы рода *Prostheco bacter* имеют кеглевидные клетки, соединенные донышками.

Филум **B23. *Dictyoglomi*** включает один род *Dictyoglomus*. Это грамотрицательные экстремально термофильные палочки, не образующие спор. облигатные анаэробы, хемоорганогетеротрофы с бродильным типом метаболизма. Отдельные клетки могут собираться в сферические агрегаты, содержащие до нескольких сотен особей, покрытых общей оболочкой.

В данном кратком обзоре приведены лишь те филогенетические группы, которые имеют культивируемых представителей, все или часть которых выделены в виде чистых культур. С учетом групп, не содержащих культивируемых форм и составленных только из генетических клонов микроорганизмов, общее количество филумов по современным данным составляет от 84 до 92 для бактерий и от 7 до 26 — для архей.

Предметный указатель

Азотфиксация симбиотическая	107
Активность:	
амилолитическая	24
протеолитическая	24
Актиномикозы	262
Актинориза	107, 144
Аллерген	90
Аллергия	90
Аменсализм	59
Анатоксин	277
Анафилактический шок	91
Анаэробы:	
аэротолерантные	51
облигатные	52
факультативные	51
Антибиоз	57
Антибиотики	79, 278
Антигенная мимикрия	89, 257
Антигенное варьирование	89, 257
Антигены	87, 211
Антитела	86
Апоптоз	269
Аппертизация	251
Арбускулы	108
Археи	16
Атопии	91
Аэротенк	230
Бактериальный газовый фильтр	32
Бактерии группы кишечной палочки (БГКП)	283
Бактериородопсин (ретиаль)	17
Бактериофор	71
Бактериоцины	280
Бактероиды	107
Барофилы (пъезофилы)	48
Бешенство	270
Биогаз	61, 72, 151, 209, 233
Биодеградация	226
Биоконтролирующие агенты	106
Биокоррозия	254
Биологическое потребление кислорода (БПК)	227
Биопленка	38, 78, 254
Биоразрушение	153, 226

Биоремедиация	154, 234
Биосенсор	223
Биотопливо	210
Биофилтры	225
анаэробные	230
дисковые	229
струйные	228
Бифидобактерии	78
Болезнь Чагаса	266
Ботулизм	261
Ботулин	252
Брожение	216
Брюшной тиф	258
Вакцина	88, 211, 276
Везикулы	107, 108
Ветряная оспа	271
Вирулентность	79
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)	272
Вирусы	267
Водоросли	13
Возвратный тиф	263
Возобновляемая энергия	221
Воспаление	88
Выщелачивание металлов	222
Газовая гангрена	261
Галофилы	43
Гепатит	271
Гигиена	276
Гидрогеназа	216
Гиперчувствительность:	
замедленного типа	90
немедленного типа	90
Гонорея	258
Гранулы	39
Грибные сады	72
Грибы	15
Грипп	270
Гумус	28, 138
Дезинсекция	276
Дезинфекция	276
Дератизация	276
Деструкция	137
Диагностикум	275
Дизентерия	259, 266
Дисбактериоз	79
Дифтерия	261
Дрожжи	16, 65
Евтрофикация	145
Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ)	73
Замораживание	254

Зона:

ингибирования	41
лимитирования.....	41
оптимальная	41
Идентификация	10
Иммунитет	83
врожденный	86
гуморальный.....	86
клеточный.....	87
нестерильный.....	256, 270
приобретенный.....	86, 88
стерильный	256
Иммунный ответ.....	86
Инкубационный период.....	81, 110
Интерферон.....	269
Инфекции:	
анаэробные.....	260
зоонозные	259
кишечные.....	258, 266
латентные	269
медленные	269
мочеполовых путей	266
протозойные	266
стафилококковые.....	257
стрептококковые.....	258
Инфекционный процесс	81
Каталаза	25, 52
Кефирные зерна	63, 196
Классификация	9
молекулярно-генетическая	11
морфофизиологическая	11
нумерическая	11
Клещевой энцефалит	271
Клубеньки	107
Коклюш.....	261
Коли-индекс	284
Коли-титр.....	284
Комменсализм	59, 65
Комплемент	83
Компостирование	215, 234
Консорциум.....	60
Конъюнктивит.....	265
Кооперация.....	57
Корневые экссудаты	105
Корь	270
Космы	38
Круговорот фосфора	142
Ксенобиотики	138, 152, 225
Ксерофилы.....	42
Латентное состояние (латентные вирусы).....	78
Леггемоглобин.....	107

Лектины	107
Лизис	65
Лимфоциты:	
В-	87
Т-	87
Лиофилизация	254
Лихорадка Q	264
Малярия	266
Матрикс	40
Медиатор	218
Мезофилы	47
Менингит	258
«Метановые/сероводородные сипы»	56, 71
Метаногены	74
Метанотрофы	71
Метантенк	209, 232
Микозы	265
Микоплазмы	263
Микориза	58, 107, 144
Микроаэрофилы	51
Микробиология санитарная	282
Микробиота нормальная человека	76, 78
Микробное сообщество	60
активного ила	230
ризосферы	106
целлюлозоразрушающее	72
Микробные топливные элементы (МТЭ)	216
Микроокружение	123
Микроорганизмы:	
автохтонные	41
аллохтонные (зимогенные)	41
психротрофные (психроактивные)	48
резидентные (резиденты)	58, 76
термофильные	48
тионовые	71
транзитные	58
условно патогенные (оппортунисты)	59, 78
фитопатогенные	109
эпифитные	108
Микрофоссилии	174
Множественная лекарственная устойчивость	280
Молочнокислые бактерии (МКБ)	72, 79
Мутуализм	58
Нанопровода	219
Натуральная оспа	269
Нейтрализм	59
Низин	254, 280
Номенклатура	9
Носительство	59, 82
Облигатные:	
анаэробы	51
аэробы	51

Обратная транскриптаза.....	273
Общее микробное число (микробная обсемененность)	282
Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП, Rh)	53
Окрашивание:	
на кислотоустойчивость	23
по Граму	22
Оксидазы	25
Операционные таксономические единицы (OTU)	12
Органическое вещество:	
автохтонное.....	34
аллохтонное	34
Осмопротекторы (осмолиты, совместимые растворители)	43
Осмофилы.....	43
«Острова патогенности»	89, 257
Отстаивание	227
Отходы органические.....	225
жидкие	225
полужидкие.....	225
твердые	225
Очистные сооружения	229
Пандемия.....	82
Паразитизм	58, 81
Паразиты	79
облигатные.....	80, 81
случайные	80, 81
факультативные	80, 81
Паратрофия	59
Парниковые газы	32, 151
Пастеризация	244, 254
Патогенность.....	79
Патогенные кокки	257
Патогенные спирохеты.....	262
Переносчики инфекции	81
Пероксидаза.....	52
Перфрингенс-титр	286
Плазмиды	281
Полиомиелит	271
Полифилетическая (полифазная) таксономия	13
Полная минерализация	122, 226
Почва.....	26
Почвенные частицы.....	28
Пребиотики	280
Пределы толерантности	41
Прививка	277
Пробиотики	211, 280
Провирус	273
Простейшие	14
Простой герпес	270
Профилактика	276
Псевдомуреин.....	16
Пситтакоз	265

Психрофилы.....	47
Пути проникновения инфекции:	
воздушно-капельный.....	93
контактный	93
половой.....	93
попадание в открытые раны.....	94
фекально-оральный	92
через укус.....	94
Реактор с восходящим потоком воды через взвешенный слой ила.....	230
Реакция серологическая	275
Резервуар возбудителя:	
природный.....	91
техногенный	92
Рецептор	268
Ризодепозиты.....	105
Ризоплана.....	105
Ризосфера.....	58, 105
Риккетсии.....	264
Риккетсиозы	264
Рубец	74
Сальмонеллез.....	259
Санитарно-показательные (микро)организмы (СПМ).....	283
Сапротрофия.....	59
Светящиеся бактерии	71
Свинка (паротит)	270
Сибирская язва.....	260
Сидерофоры	83
Симбиоз	58
мутуалистический.....	62, 70
облигатный	59
паразитический	65
ризосферный	106
факультативный.....	59
экзо- (экзо-).....	58
эндо-	58
Синбиотики	280
Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД).....	274
Синтрофия.....	60, 153, 226
Систематика	9
Сифилис	262
Сонная болезнь	266
Стерилизация	254
Столбняк	260
Сточные воды.....	220
Стратегия:	
паразитизма	81
роста	40
Строматолиты.....	148, 174
Сукцессия.....	60, 104
Супероксиддисмутаза (СОД).....	52
Сыворотка	88, 211, 277

Сыпной тиф.....	264
Таксон.....	9
Твердофазная анаэробная переработка.....	234
Твердые бытовые отходы (ТБО).....	232
Темновая репарация.....	50
Теория	
панспермии.....	182
симбиогенеза.....	181
Титр.....	283
Токсикоинфекции.....	93
Токсин.....	80, 256
Трансформация (хим.).....	226
Трахома.....	265
Туберкулез.....	262
Уксуснокислые бактерии.....	65
Фагоцитоз.....	83
завершенный.....	84
незавершенный.....	85, 258, 264
Факторы:	
абиотические.....	41
биотические.....	57
неспецифические.....	83
патогенности.....	79
специфические.....	86
Ферментные топливные элементы (ФТЭ).....	220
Филлоплана.....	108
Филлосфера.....	108
Фильтрация.....	227
Фитонциды.....	109
Фосфатазы.....	143
Фотобактерии.....	71
Фотореактивация.....	50
Фотосинтез.....	50
Фрагментация.....	226
Хемофоссилии.....	176
Химиотерапевтический индекс.....	278
Химические консерванты.....	254
Химическое потребление кислорода (ХПК).....	227
Хищничество.....	57
Хламидии.....	264
Хлопья.....	39
Хозяин.....	58, 79
Холера.....	259
Циано-бактериальный мат.....	56
Цикл кальция.....	148
Чайный гриб.....	65
«Черные курильщики».....	54, 71
Чума.....	260
Эдификаторы.....	39, 231
Экологическая ниша.....	123
Экология микроорганизмов.....	121

Экосистема.....	121
Экстремофилы	41
Электромагнитные излучения.....	254
Эпидемия.....	82
Эффект «кворума».....	110
<i>K</i> -стратегии	41
<i>L</i> -стратегия.....	41
<i>r</i> -стратегия	40

Новые издания по дисциплине «Микробиология» и смежным дисциплинам

1. *Емцев, В. Т.* Микробиология : учебник для бакалавров / В. Т. Емцев. — 8-е изд., испр. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2017.
2. *Емцев, В. Т.* Общая микробиология : учебник для академического бакалавриата / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — М. : Издательство Юрайт, 2017.
3. *Емцев, В. Т.* Сельскохозяйственная микробиология : учебник для академического бакалавриата / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — М. : Издательство Юрайт, 2017.
4. *Емцев, В. Т.* Сельскохозяйственная микробиология : практ. пособие / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — М. : Издательство Юрайт, 2017.
5. *Леонова, И. Б.* Основы микробиологии : учебник и практикум для академического бакалавриата / И. Б. Леонова. — М. : Издательство Юрайт, 2017.
6. *Нетрусов, А. И.* Экология микроорганизмов : учебник для бакалавров / А. И. Нетрусов ; отв. ред. А. И. Нетрусов. — 2-е изд. — М. : Издательство Юрайт, 2017.