

**НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Биолого-технологический факультет**

**Краткий обзор курса дисциплины  
Микробиота различных сред обитания**

**Учебное пособие**



**Новосибирск 2021**

УДК 579.6 (075)  
ББК 28.485, я73  
М 596

## Кафедра Экологии

Составитель: канд. биол. наук, доцент *Л.А. Литвина*

Рецензент канд. биол. наук, доцент *С.В. Баталова*

**Микробиота различных сред обитания: краткий обзор курса дисциплины:** учебное пособие / Новосиб. гос. аграр. ун-т, Биолого-технолог. ун-т; сост. Л.А. Литвина. – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2021. – 70 с.

Учебное пособие составлено в соответствии с требованиями ФГОС и необходимо для получения теоретических и закрепления практических знаний по данному предмету, а также для эффективного применения знаний в будущей практической деятельности выпускника. В процессе изучения дисциплины решается главная задача – ознакомление с микроорганизмами, обитающими в самых разных средах – в почве, воде, воздухе, в организме человека и животных.

Учебное пособие предназначены для студентов очной формы обучения по направлению подготовки 06.04.01 – Биология.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к изданию учебно-методическим советом Биолого-технологического факультета Новосибирского ГАУ (протокол №5 от 18 мая 2021 года).

© Новосибирский государственный  
аграрный университет, 2021

## ВВЕДЕНИЕ

Программа данного курса для магистров составляет 144 часа, из которых 100 часов отводится самостоятельной работе (включая написание контрольной работы и подготовку к экзамену), лекции читаются 14 часов и 30 часов проводятся лабораторные занятия.

В результате освоения курса дисциплины магистр будет:

- **знать:** *особенности микробиоты различных сред обитания, включая водную среду;*

- **уметь:** *определять численность и качественный состав микроорганизмов различных сред обитания, включая водную среду;*

- **владеть:** *навыками оценки качества и безопасности различных сред и водной среды по микробиологическим показателям.*

Как видно из названия, в процессе изучения дисциплины решается главная задача – ознакомление с микроорганизмами, обитающими в самых разных средах – в почве, воде, воздухе, в организме человека и животных. Значение существования этих микроорганизмов для биосферы трудно переоценить – именно они осуществляют круговорот всех биогенных элементов в природе. Процессы, происходящие в почве (азотфиксация, аммонификация, нитрификация, денитрификация) обеспечивают распад органических веществ и их минерализацию, делая доступными соединения азота для питания растений. Процессы распада углеродсодержащих соединений, в частности клетчатки, жизненно необходимы для осуществления фотосинтеза растениями, т.к. пополняют запасы диоксида углерода в атмосфере. Состояние почвы и наличие в ней определенных видов микроорганизмов напрямую связаны с плодородием почвы. В почве, как и в воде, наличие автохтонной микробиоты способствует самоочищению этих сред от загрязнений, вызванных антропогенным воздействием.

Но возможности микроорганизмов не бесконечны, особенно когда речь идет о ксенобиотиках – производимых человеком чужеродных для всего живого химических веществах, не входящих в природный биотический круговорот.

Продукция бытовой химии, ядохимикаты, консерванты и стабилизаторы пищевой промышленности со сточными водами поступают в почву и водоемы, нанося непоправимый вред микробиоте этих сред обитания.

Микробиота воздушной среды тесно связано с микробиотой почвы и кожными покровами животных и человека. Микроорганизмы присутствуют не только на кожных покровах, но они обитают и на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, ротовой полости, мочеполовой системы, желудочно-кишечного тракта. Все эти микробы представляют собой постоянную микробиоту животного, которая может несколько меняться в зависимости от условий жизни и кормления животных, но в целом микробиота – это определенные виды микроорганизмов, занявшие свои экологические ниши. Рубцовое пищеварение у жвачных представляет собой сложнейшую систему взаимодействия между простейшими, бактериями и грибами по переработке грубых кормов. Микробиота желудочно-кишечного тракта человека зависит от особенностей питания человека, но в целом в ней преобладают представители фирмикутов и бактериоды. Значимость микробиома человека, связанного с иммунной и нервной системами, все больше становится предметом исследования ученых.

Основные разделы курса, которые предусмотрены программой:

- Основоположники микробиологии.
- Микроорганизмы и биосфера.
- Методы изучения микробиологических показателей состояния природной и антропогенной среды.
- Экология микроорганизмов различных сред обитания.

# ОСНОВОПОЛОЖНИКИ МИКРОБИОЛОГИИ

## ПЛАН

1. Значение работ С.Н. Виноградского в области почвенной микробиологии.
2. Работы М. Бейеринка.
3. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

### 1. Значение работ С.Н. Виноградского в области почвенной микробиологии.

Прежде, чем обсудить вопросы, изучаемые в данном курсе, необходимо вспомнить работы великого русского микробиолога Сергея Николаевича Виноградского (1856-1953), основоположника экологического направления в микробиологии, основателя почвенной и сельскохозяйственной микробиологии.

В те годы, когда классическая микробиология в лице Луи Пастера (1822-1895) и Роберта Коха (1843-1910) исследовала микроорганизмы, вызывающие заболевания, искала способы борьбы с их возбудителями, культивировала бактерии на богатых азотом средах, С.Н. Виноградский избрал другую тактику – он предположил, что в природе есть микроорганизмы, которые могут сами фиксировать азот атмосферы ( $N_2$ ), недоступный другим формам жизни, и блестяще доказал это.



*Виноградский С.Н.*

В тот период вопрос о том, как азот атмосферы становится доступным, не был изучен и ответ на него представлял большой интерес. С.Н. Виноградский (1895) открыл и описал **анаэробный азотфиксатор**, назвав его в честь Пастера *Cl.pasteurianum*. Это открытие помог сделать разработанный им метод, который он применил для поиска азотфиксаторов в почве, а именно создание избирательной, или селективной среды, не содержащей органического и минерального азота. В среде находился атмосферный азот, но

отсутствовал органический и минеральный; была глюкоза, как источник энергии, а кислород отсутствовал.

Создались условия только для роста тех микроорганизмов, которые были способны усваивать атмосферный азот, имеющий в молекуле тройную связь между атомами и не расщепляющийся в обычных условиях нашей планеты. Микроорганизмы почвы выросли без органического азота, используя атмосферный азот, и это была сенсация. Так был получен ответ на один из важнейших для жизни на планете вопросов – как недоступный азот атмосферы становится доступным – происходит его фиксация микроорганизмами.

С.Н. Виноградский (1887) обнаружил микроорганизмы, использующие химическую энергию неорганических веществ (**хемосинтез**). До этого единственными автотрофными организмами считались фотосинтезирующие растения, поэтому данные работы обеспечили Виноградскому мировое признание.

**Хемосинтез** – способ автотрофного питания, при котором источником энергии для синтеза органических веществ из  $\text{CO}_2$  служат реакции окисления неорганических соединений. Микроорганизмы, способные к **хемосинтезу**, Виноградский называл **аноргоксиданты**, т.е. не окисляющие органические вещества. Название **хемосинтез** ввёл позже немецкий химик и ботаник В. Пфееффер (1897). Необходимо отметить, что выделяющаяся в реакциях окисления неорганических соединений энергия не может быть непосредственно использована в процессах ассимиляции. Сначала эта энергия переводится в энергию макроэргических связей АТФ и только потом тратится на синтез органических соединений.

Виноградский описал две группы микроорганизмов (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* и *Nitrobacter*), которые осуществляют **два этапа окисления аммиака в процессах нитрификации**, превращая его сначала в соли азотистой (нитриты), а затем азотной (нитраты) кислоты. Те и другие чрезвычайно важны как источник азотного питания для растений. В настоящее время показано, что к хемосинтезу способны не только бактерии, но и археи.

С.Н. Виноградский изучил особенности развития серобактерий (*Beggiatoa* и *Thiothrix*). Лучше всего об этих исследованиях говорит он сам: «Моя первая

работа появилась в ту эпоху (1885), когда ... методы были строго стандартизованы и считались обязательными для всех исследователей. Я пошел своим путем. Выбранный метод отличался элементарной простотой: микрокультура на предметном стекле в капле сероводородной воды, которую часто сменяют в течение дня; продолжительные наблюдения над нитями *Beggiatoa* и других серобактерий; изучение метаболизма при помощи микрохимических реакций.

Метод продолжительного наблюдения над микрокультурой, несомненно, ближе всего подходил к цели и в этом смысле был наиболее совершенным, несмотря на всю его простоту и полное отсутствие техники. Между тем не было недостатка в критике, обвинявшей в отклонении от принципов, на которых построены методы современной микробиологии».

Результаты работы ученого были следующие (цит. По Виноградскому):

«1. Две исследованные серобактерии окисляют сероводород, накапливая серу в виде капель полужидкой консистенции. В живых клетках сера никогда не образует кристаллов.

2. Сера подвергается в клетках окислению до серной кислоты, которая немедленно нейтрализуется карбонатами среды и удаляется из клеток в виде сульфатов.

3. С исчезновением серы движение клеток прекращается и через несколько дней они погибают.

4. Они способны хорошо развиваться в растворах, содержащих лишь следы органических веществ; в этих растворах организмы, лишенные хлорофилла, не могли бы существовать.

5. Окисление серы по энергии эквивалентно дыхательному акту. Этот процесс является единственным источником энергии, которым располагают серобактерии.

6. Эти необыкновенные особенности позволяют нам рассматривать серобактерии как новый физиологический тип, существенно отличающийся от того типа, к которому принадлежит громадное большинство живых организмов.»

Далее С.Н. Виноградский пишет: «Ведь только благодаря сероводороду,

обеспечивающему анаэробные условия, они могут развиваться в проточной сероводородной воде мелководных источников и канав. Так, по моим наблюдениям, пурпурные серобактерии в изобилии встречаются в воде сероводородных источников Мацесты близ Сочи (Кавказ).

Напомним также, что к автотрофам относятся все виды бактерий, изученные различными авторами, способные окислять до серной кислоты серу и ее производные (не вполне окисленные). Наиболее любопытным организмом является *Thiobacillus thiooxydans* Липмана, Ваксмана и Иоффе, потому что он образует большие количества серной кислоты, легко переносит чрезвычайно низкую концентрацию водородных ионов (рН около 2,0), а местом его обитания являются почвы и компосты, содержащие элементарную серу.

Что касается роли серобактерий в природе, то в те отдаленные времена, когда появилась моя старая работа, нельзя было предположить, что они так широко распространены и, что особенно важно, встречаются в таком большом количестве. Это было выяснено позднее многочисленными исследованиями. Кроме сероводородных источников и стоячих вод, они в изобилии водятся в морских бассейнах и в озерах, глубинные воды которых насыщены сероводородом. Содержание этого газа в таких водоемах постепенно уменьшается к поверхности, а поверхностные слои лишены его совсем. Исследование проб воды, взятых по вертикали, обнаружило уровень зоны, населенной пурпурными серобактериями – *Chromatium*. Скопления их образуют своего рода живую пластинку, простирающуюся от одного края бассейна до другого. С этой точки зрения особенный интерес представляет Черное море, заслужившее название сероводородного».

Изучение железобактерий последовало вслед за серобактериями. Результатом исследования железобактерий явилась опубликованная позже книга Виноградского «Железобактерии как аноргоксида́нты». «Эта группа бактерий исследовалась мной непосредственно после изучения серобактерий; исследование имело целью выяснить, не являются ли микроорганизмы железистых вод также автотрофами. Первые данные изложены в нижеследующем предварительном сообщении. Поглощенный своими исследованиями по нитрификации, я не мог за-



няться в дальнейшем этой интересной темой, но пристально следил за ее развитием и написал несколько критических статей». Из статей и монографии С.Н. Виноградского «Микробиология почвы, проблемы и методы» видно, что исследователи автотрофных микроорганизмов спорили между собой, критиковали друг друга и не сразу приходили к истине. Он отмечает заслуги и других ученых в исследовании микроорганизмов почвы. «Большим вкладом в наши знания о железобактериях явились исследования киевского профессора Н. Холодного. Морфология, физиология и экология этих микроорганизмов изложена в его замечательной монографии, дополненной критическим очерком, в котором автор рассматривает все недоразумения и пренебрежительные суждения, процветавшие в этой области в течение 30 лет. Морфология своеобразного организма – типичной железобактерии, которая носит очень старинное название – *Spirophyllum ferrugineum* или *Gallionella ferruginea*. Уже более ста лет назад ее описывали как нитчатую бактерию: нити – плоские в виде ленты (*Spirophyllum*) или цилиндрические (*Gallionella*), но всегда закрученные спиралью. В них никогда не удавалось обнаружить даже следов клеточной структуры. Разрешить эту морфологическую загадку удалось Холодному. Он погружал покровные стекла, насаженные одним углом на пробку, в водоем, наполненный железистой водой; на поверхности стекол появлялся налет из нитей *Gallionella*. Затем стекла вытаскивают, сушат, окрашивают, не нарушая чрезвычайно хрупких сплетений из нитей. Только благодаря этому остроумному приему удалось обнаружить, наконец, клетки в виде мелких вибрионов, помещающихся по одному на каждом конце длинных, спирально закрученных нитей, которые образуют своего рода стебель. Нити состоят из гидроокиси железа в виде геля, который полностью растворяется в разбавленной соляной кислоте; этот гель выделяется мелким вибрионом со стороны вогнутой поверхности; его выпуклая сторона обращена вверх и всегда свободна. Трудно было бы найти другой организм, морфологический характер которого так своеобразно отражал бы его функции».

Идеи С.Н. Виноградского и его эксперименты по использованию метода **накопительных культур** – пример оригинального подхода к изучению микро-

организмов окружающей среды, давшие начало новому направлению микробиологии – экологии микроорганизмов. Накопительная культура – первый этап в получении чистой культуры микроорганизмов из природных субстратов, т.к. в ней преобладают представители одной физиологической группы микроорганизмов, выращиваемых на **элективной** питательной среде. Такая среда дает преимущество для роста только одной группы микроорганизмов, которая преодолевает конкуренцию со стороны других групп. Чтобы выяснить, есть ли в данном образце интересующие исследователя микроорганизмы, необходимо поместить в среду изучаемый субстрат, и способные усваивать его бактерии дадут рост. Этот метод может применяться для изоляции определенных групп микроорганизмов из почвенных и водных образцов. Накопительные культуры можно получать, используя не только разные источники питания, но и разные условия культивирования – например, для выделения термоустойчивых микроорганизмов, повышая температуру культивирования по сравнению с обычной температурой, применять среду с большей кислотностью или, например, с более высокой концентрацией соли. Развиваться и накапливаться будет культура, способная выживать в этих условиях. В дальнейшем можно выделить чистую культуру обычным путем – сделав посев на плотные питательные среды и взяв для изоляции одну наиболее подходящую колонию для пересева в пробирку.

Для изучения особенностей обмена веществ у почвенных микроорганизмов работа в дальнейшем ведется с чистыми культурами, но С.Н. Виноградский предостерегал от неправильных выводов, так как культивирование в чистой культуре может непредсказуемо повлиять на свойства микроорганизма, развивавшегося до этого в природных условиях. **Он был сторонником изучения бактерий *in situ*, т.е. в их естественных местах обитания.**

Занимаясь изучением жизни почвы, С.Н. Виноградский (1925) выдвинул концепцию деления микроорганизмов почвы на две большие группы – **автохтонные и аллохтонные (зимогенные).** Но еще в 1896 г. в актовой речи на общем собрании членов Императорского института экспериментальной медицины «О роли микробов в общем круговороте жизни» С.Н. Виноградский изложил

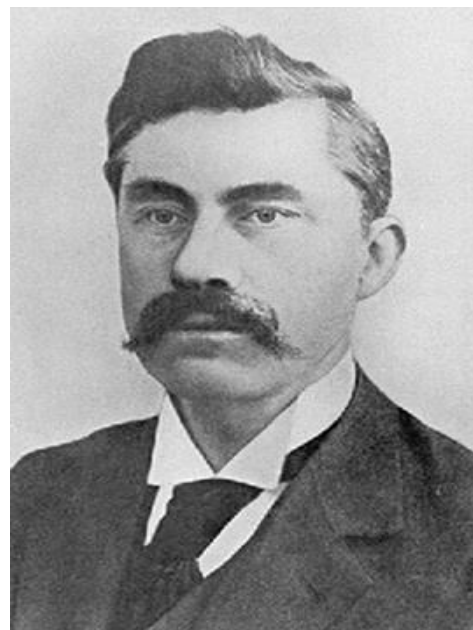
гипотезу о постоянном взаимодействии живой материи и неорганической природы.

#### *Вопросы для самопроверки*

1. Почему про С.Н. Виноградского говорят, что он прожил три жизни.
2. Какая из работ С.Н. Виноградского вам кажется самой главной.
3. В чем принципиальная разница между работами Луи Пастера и С.Н. Виноградского.
4. Перечислите названия микроорганизмов, открытых и описанных С.Н. Виноградским.
5. Что означает термин С.Н. Виноградского «аноргоксиданты».

## **2. Работы М. Бейеринка**

Мартинус Виллем Бейеринк (1851-1931) – голландский микробиолог, по образованию ботаник, был чрезвычайно разносторонним исследователем. Как ботаника его интересовали закономерности листорасположения, природа растительных галов, филлотаксис. Одновременно он получил первые чистые культуры зеленых водорослей. М. Бейеринк является одним из основателей (наряду с С.Н. Виноградским) экологической микробиологии и общепризнанной «Дельфтской школы» бактериологов. Его интересовали клубеньки у злаков и бобовых, которые описал немецкий агрохимик Г. Гельригель (1886 г.) как возможный фиксатор азота, т.к. опыты показали, что растения с клубеньками не нуждаются в азотных удобрениях. Уже в 1887 г. М. Бейеринк выделил из клубеньков *Bacterium radicicola*, т.е. был первооткрывателем симбиотических азотфиксаторов, а затем и свободноживущих аэробных азотфиксаторов рода *Azotobacter* (1901), сульфатредуцирующих бактерий *Spirillum desulfuricans* и сульфатредукции, разработал метод накопительных культур, изучал почвенную микробиологию и связь микроорганизмов с плодородием почв.



***Мартинус Виллем  
Бейеринка***

Независимо от открывшего вирус табачной мозаики Д.И. Ивановского (1864-1920), М. Бейеринк обратил внимание на мозаичную болезнь табака и провел подобные опыты с фильтрацией сока больных растений подтвердив, что фильтрование не освобождает от причины заболевания. Но если Ивановский увидел кристаллы, то Бейеринк предположил, что вирус является некой жидкой материей, называя вирусный раствор *contagium vivum fluidum* – заразной живой жидкостью. Данное представление о вирусах не как о частицах, а как о растворимой материи, было опровергнуто уже после смерти Бейеринка. В 1935 г. вирус табачной мозаики стал первым вирусом, который был закристаллизован Уэнделлом Стенли, что позволило в 1940-х годах установить структуру вируса табачной мозаики методом рентгеноструктурного анализа.

Из сказанного видно, что ученые разных стран занимались самыми насущными научными проблемами своего времени и заслуживают большого уважения и признания независимо от того, сколько лет прошло с момента их открытий.

#### *Вопросы для самопроверки*

- 1. Какие открытия сделаны М. Бейеринком.*
- 2. Что общего в работах С.Н. Виноградского и М. Бейеринка.*
- 3. Почему первооткрывателем вирусов считается Д.И. Ивановский, а не М. Бейеринк.*

### **3. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.**

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН – ведущее учреждение страны, занимающееся вопросами систематики, экологии, генетики и биотехнологии микроорганизмов и вирусов.

Институт микробиологии был создан в Москве 5 ноября 1934 г. (с 2003 года – Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, ИНМИ РАН) – первый микробиологический институт Академии наук. Его основателем был известный российский микробиолог академик Г.А. Надсон, открыватель и осново-



положник общей радиобиологии и радиационной микробиологии. Среди первых сотрудников и организаторов лабораторий в Институте микробиологии были известные биохимики, вирусологи и микробиологи, ученики и соратники Г.А. Надсона: А.Н. Белозерский, Л.А. Зильбер, Н.Д. Иерусалимский, А.А. Имшенецкий, А.Р. Кизель, Н.А. Красильников, А.Е. Крисс, В.И. Кудрявцев, С.И. Кузнецов, М.Н. Мейсель, Е.Н. Мишустин, Д.М. Новогрудский, Я.И. Раутенштейн, В.Л. Рыжков, В.Д. Тимаков, М.П. Чумаков, В.Н. Шапошников и другие.

В разное время Институт возглавляли выдающиеся ученые с мировым именем: специалист в области общей микробиологии и экологии микроорганизмов академик Б.Л. Исаченко, академик А.А. Имшенецкий, при котором активно развивались геологическая и нефтяная микробиология, основы культивирования микроорганизмов, экзобиология (моделирование микробной жизни на Марсе), академик М.В. Иванов, внесший новое направление в научную тематику Института – экспериментальную биогеохимию микробных процессов различных экосистем планеты. С 2003 года директором Института стал член-корреспондент РАН Гальченко Валерий Федорович. В 2014 г. Институт микробиологии вошел в состав федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Основные **направления научной деятельности** Института микробиологии связаны с изучением биоразнообразия микроорганизмов, их физиологии, биохимии, экологии и геохимической деятельности, с использованием микроорганизмов в биотехнологии, а также с исследованиями в области молекулярной биологии вирусов микроорганизмов.

Институт микробиологии является **мировым центром изучения разнообразия прокариот**. В авторских коллекциях микроорганизмов присутствуют более 2,5 тыс. штаммов и изолятов, представляющих новые таксоны, в том числе высокого ранга (новые филумы, классы, порядки, семейства). Наряду с филогенетическим разнообразием, большое внимание уделяется исследованию метаболического разнообразия прокариот. Выделены различные группы экстремофилов, растущих при предельных значениях основных физико-химических пара-

метров – высокой и низкой температуре, высоких и низких значениях pH, максимальной солености, характеризующиеся разнообразными типами метаболизма. Среди исследованных экосистем – микробные сообщества нефтяных месторождений, хранилищ радиоактивных отходов, содовых, соленых и антарктических озер, наземных и морских гидротерм. Изучаются разнообразие и экология вирусов бактерий, а также микроскопических грибов, в том числе с целью применения в биотехнологии и медицине. Созданы новые биотехнологии извлечения металлов из руд с помощью ацидофильных микроорганизмов, увеличения нефтеотдачи нефтяными пластами, очистки почв и осадков от нефтяных загрязнений, а также бытовых сточных вод с участием анаэробных аммоний окисляющих бактерий анаммокс.

На базе Института функционирует межрегиональная общественная организация «Микробиологическое общество», которое является членом Европейской Федерации микробиологических обществ (FEMS). ИНМИ РАН является соучредителем издаваемого под руководством отделения биологических наук РАН научного журнала «Микробиология». При Институте работают научный совет РАН по микробиологии, экспертная комиссия РАН по присуждению премии имени С.Н. Виноградского РАН.

Сотрудники Института награждены Государственными премиями, Ленинской премией, премией Совета Министров СССР, премиями Правительства РФ, Государственной премией для молодых ученых, золотыми медалями им. И. И. Мечникова и им. Д.Н. Прянишникова, медалью им. А.А. Ячевского, премиями им. В.Р. Вильямса, премиями им. С.Н. Виноградского, международной медалью им. Берги.

Современные фундаментальные исследования Института микробиологии им. С.Н. Виноградского следующие:

- ✓ Биоразнообразие, метаболизм и геохимическая деятельность микроорганизмов.
- ✓ Геномика и постгеномные исследовательские платформы для биотехнологии и биомедицины.

✓ Биоинженерия, генетическая инженерия микроорганизмов, растений и клеток млекопитающих.

✓ Биокатализ.

✓ Системная биология.

✓ Структурная биология.

## РАЗДЕЛ 1. МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСФЕРА

### План

1. Определение понятия биосфера по В.И. Вернадскому
2. Место и роль микроорганизмов в биосфере

#### 1. Определение понятия биосфера по В.И. Вернадскому.

В каждом из разделов рассматривается целый ряд вопросов, освещающих направление данной дисциплины. Так, в разделе «Микроорганизмы и биосфера», микроорганизмы рассматриваются как часть глобальной экосистемы. Согласно определению В.И. Вернадского (1926) **биосфера – это глобальная экосистема, оболочка Земли, населенная живыми организмами**, которая возникла с появлением живых существ в результате эволюционного развития планеты и преобразований, которые произошли при развитии живых организмов. Биосфера включает верхнюю часть литосферы, всю гидросферу, тропосферу и нижнюю часть стратосферы. Живое вещество биосферы неоднородно и обладает тремя типами трофических взаимодействий: автотрофностью, гетеротрофностью, миксотрофностью. Трофические связи в микробном сообществе позволяют одним микроорганизмам питаться продуктами жизнедеятельности других и обеспечивать потоки вещества и энергии внутри сообщества. При этом каждая стадия цепи последовательных химических реакций окисления начального питательного субстрата в сообществе должна обеспечивать энергией другие микроорганизмы.

Трофические экологические взаимодействия способствуют преобразованию неорганического (косного) вещества в органическое, и обратной перестройке органических веществ в минеральные.

В ходе биогеохимических циклов атомы большинства химических элементов проходили бесчисленное количество раз через живое существо. Например, весь кислород атмосферы «оборачивается» через живое вещество за 2000 лет, углекислый газ – за 200-300 лет, а вся вода биосферы – за 2 млн. лет.

Живое вещество является совершенным приемником солнечной энергии. Энергия, поглощенная и использованная в реакции фотосинтеза, а затем запа-



сенная в виде химической энергии углеводов, очень велика. Предполагается, что она сопоставима с энергией, которую потребляют 100 тысяч больших городов в течение 100 лет. Гетеротрофы используют органическое вещество растений, как пищу: органика окисляется кислородом, который доставляют в организм органы дыхания, с образованием углекислого газа – т.е. реакция идет в обратном направлении по отношению к фотосинтезу. Таким образом, «вечной» делает жизнь одновременное существование автотрофов и гетеротрофов.

Факты и рассуждения о «колесе жизни» в биосфере дают право говорить о законе биогенной миграции атомов, который сформулирован следующим образом: «миграция химических элементов на земной поверхности и в биосфере в целом осуществляется или при непосредственном участии живого вещества или же она протекает в среде, геохимические особенности которой обусловлены живым веществом, как тем, которое сейчас населяет биосферу, так и тем, которое действовало на Земле в течение всей геологической истории».

Живое вещество представителей разных доменов (бактерии, археи, эукариоты) и входящих в них царств обеспечивает непрерывный круговорот веществ и преобразование энергии.

## **2. Место и роль микроорганизмов в биосфере.**

Микроорганизмы согласно научно-подтвержденным фактам были первыми Землянами, принимавшими непосредственное и важнейшее участие в формировании биосферы. Они появились 3,5 млрд. лет назад и заняли все важнейшие «посты», связанные с круговоротами. Рассматривается место микроорганизмов в иерархии живого, особенности микроорганизмов как объектов познания (размеры микроорганизмов, скорость размножения и особенности обмена веществ у микроорганизмов, их вездесущность, особенности и сложности систематики).

Микробное сообщество в целом выступает как совокупность взаимодействующих между собой разнообразных в видовом отношении организмов. Рассматривая функции микроорганизмов в природе, необходимо подчеркнуть их **незаменимую роль в круговоротах веществ, а именно всех макро-** (углерод,

кислород, азот, водород, кальций, фосфор, сера) и **микро-** (железо, медь, селен, йод, хром, цинк, фтор, молибден) **биогенных элементов, обеспечивающих устойчивость биосферы.**

**Молибден** – жизненно важный микроэлемент для всех организмов. Он входит в состав ферментов нитрогеназы и нитратредуктазы, которые участвуют в фиксации азота и в восстановлении нитрат-ионов, а также присутствует в оксидазах. В ферментах молибден играет роль переносчика электронов. Считается, что жизнь без микроорганизмов в том виде, какая она сейчас, просто была бы невозможна. Биогенные элементы входят в состав органического вещества и без них создание и функционирование живых организмов неосуществимо.

Микроорганизмы могут служить и **индикаторами (показателями) качества окружающей среды.** Определение в почве, воде, воздухе санитарно-показательных микроорганизмов дает возможность судить о том, насколько безопасна данная среда для деятельности человека, подвергалась ли она антропогенному воздействию и каковы последствия этого воздействия.

О санитарном состоянии почвы, например, будет свидетельствовать обнаружение загрязняющих почву микроорганизмов из кишечника человека и животных. Такие показатели, как наличие эшерихий или других представителей семейства энтеробактерий, объединяемых общим термином БГКП (бактерии группы кишечной палочки) свидетельствует о свежем фекальном загрязнении почвы и необходимости ее санирования.

На примере **разнообразия микробиологических процессов** в почве можно судить о том, как активно протекают процессы, **связанные с усвоением и превращением соединений азота,** т.е. предвидеть плодородие почвы. Наличие в почве аэробных или анаэробных азотфиксаторов, симбиотически связанных с растениями азотфиксаторов, нитрификаторов, микроорганизмов- денитрификаторов и аммонификаторов дает представление об активности процессов азотфиксации, превращении органических соединений в минеральные. В почве **формируются минеральные формы азота:** аммонийная, нитритная, нитратная – они легко усваиваются растениями, на них приходится до 5% от общего азота. Рас-

тения используют азот в виде солей аммония ( $\text{NH}_4^+$ ), и нитратов ( $\text{NO}_3^-$ ): Аммоний называют "долгим" азотом, так как он неподвижен в почве, не вымывается и долго превращается в нитратную форму. Наличие данных микроорганизмов тесно связано с доступностью минерального азота для растений, т.е. с плодородием почв.

Азот – важнейший элемент, входящий в состав белков и нуклеиновых кислот живых организмов и, следовательно, имеющий исключительное значение для жизни. В живых организмах, населяющих планету, содержится примерно 15-20 млрд. т азота, в почвах (в 30-сантиметровом слое) на каждом гектаре имеется в среднем 5-15 т азота.

В круговороте азота в природе с участием микроорганизмов различают следующие этапы: усвоение атмосферного азота (азотфиксация), распад органических соединений, содержащих азот, до аммиака (аммонификация), окисление аммиака до солей азотистой и азотной кислот (нитрификация), возврат молекулярного азота в атмосферу (денитрификация).

**Усвоение азота ( $\text{N}_2$ ) из атмосферного воздуха азотфиксирующими бактериями.**

Среди микробов, усваивающих атмосферный азот, различают две группы – свободноживущих и симбиотически связанных с растениями (клубеньковых). Свободноживущие азотфиксаторы живут и фиксируют азот в почве независимо от растений. Основные виды этих микробов: *Azotobacter chroococcum*, *Cl. pasteurianum*. Азотобактер на площади в 1 га в течение года фиксирует от 20 до 50 кг газообразного азота, повышая плодородие почвы. Наиболее интенсивно этот процесс идет при хорошей аэрации почвы.

Клубеньковые бактерии – активные фиксаторы атмосферного азота в симбиозе с бобовыми растениями. Наличие бактерий в клубеньках бобовых растений установлено М. Ворониным. В чистой культуре эти микробы выделены Бейеринком в 1888 г. и названы *Bact. radicicola* (современное – род *Rhizobium*).

Все азотфиксирующие системы можно отравить даже следовыми количествами кислорода. Это означает, что фермент нитрогеназа даже в аэробных

клетках должен содержаться в основном в анаэробных условиях. В корневых клубеньках бобовых это достигается с помощью леггемоглобина (LHb) – красный железосодержащий белок, по ряду свойств сходный с гемоглобином крови.

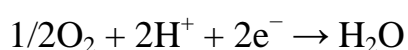
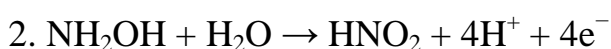
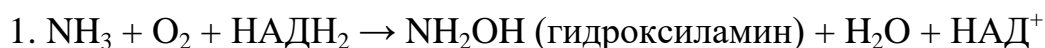
**Аммонификация** – это начальный этап минерализация азотсодержащих органических веществ, протекающий под воздействием аммонифицирующих микроорганизмов, выделяющих протеолитические ферменты, расщепляющие белки на менее сложные соединения – пептоны, пептиды, аминокислоты. Последние дезаминируются и декарбоксилируются под действием микробных дезаминаз и декарбоксилаз. Благодаря аммонификации отмершие представители растительного и животного мира и отходы жизнедеятельности человека и животных (мочевина, фекалии, навоз) разлагаются до аммиака. Почва обогащается азотом за счет дальнейшего преобразования аммиака и другими элементами, входившими в состав белка. Одновременно с этим аммонификаторы выполняют огромную санитарную роль, очищая почву и гидросферу от разлагающегося органического субстрата. Основными представителями широко распространенных в природе аммонифицирующих микробов являются бактерии, бациллы, клостридии, которые могут разлагать органику в аэробных и анаэробных условиях. Спорообразующие аэробы-аммонификаторы – это *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*. К анаэробным спорообразующим аммонификаторам относятся *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. oedematiens*, *Cl. perfringens*. Не образующие спор факультативно-анаэробные аммонификаторы – это *E. coli*, *Proteus vulgaris*, пигментообразующие псевдомонады – *Ps. fluorescens*.

Распад белка под действием аммонификаторов в аэробных условиях приводит к образованию аммиака ( $\text{NH}_3$ ) и углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ). В анаэробных условиях, в глубоких слоях почвы, образуются промежуточные продукты распада белка – меркаптаны, индол, скатол и др.

Среди отходов жизнедеятельности человека и животных находится большое количество мочевины. Из литературы известно, что весь животный мир земного шара за сутки выделяет 150 тыс. т мочевины. За год это составляет бо-

более 50 млн. т мочевины, или 20 млн. т азота. Микроорганизмы, разлагающие мочевины, переводят ее в аммиак и углекислый газ. К ним относятся *Bac. probatus* и *Sporosarcina ureae*. Аммонификацию в почве могут осуществлять также актиномицеты и грибы, живущие в почве.

**Нитрификация** – следующий за аммонификацией этап превращения азота, а именно освободившегося из белков в виде аммиака, микроорганизмами. Этот процесс, изученный С.Н. Виноградским, представляет собой окисление аммиака, образующегося при разложении органических азотсодержащих соединений, до солей азотистой и азотных кислот, и проходит в два этапа. Нитрификация – микробиологический процесс окисления аммиака сначала до азотистой кислоты или её солей далее до азотной кислоты, что связано либо с получением энергии, либо с защитой от активных форм кислорода, образующихся при разложении пероксида водорода ( $H_2O_2$ ). Протекает в аэробных условиях в почве, а также в природных водах. Первый этап окисления аммиака до нитританиона, которое осуществляют **нитрозные** бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* и *Nitrospira* (ранее выделялись также рода *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, но сейчас их представители включены в *Nitrospira*) по следующему механизму:



Ферментом для первой реакции служит **аммиакмонооксигеназа**.

Следующую реакцию осуществляет **гидроксиламинооксидоредуктаза, расположенная в периплазме бактерий**. Окислителем в них служит цитохром с, с него электрон передаётся на убихинон и далее в дыхательную цепь, на **цитохром-оксидоредуктазу** и, в конечном итоге, на кислород. При этом запасается энергия в виде трансмембранного протонного потенциала.

**Второй этап нитрификации** – Вторая стадия – окисление аниона азотистой кислоты до аниона азотной, производимое **нитратными** бактериями (почвенный род *Nitrobacter* и водные *Nitrospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*). Процесс протекает в одну реакцию:  $NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e^-$  катализируемую

**нитрит:нитрат-оксидоредуктазой**, локализованной в ЦПМ. Далее электроны передаются на цитохромы дыхательной цепи, в которой единственным пунктом транслокации протонов является цитохромоксидаза.

### **Характеристика микроорганизмов-нитрификаторов – нитрозных и нитратных бактерий.**

Ранее их выделяли в семейство *Nitrobacteraceae*, сейчас с развитием гено-систематики их роды разнесены по разным подклассам протеобактерий. Оптимальная для развития микроорганизмов температура 25-30 °С и pH 7,5-8,0. В кислой среде процесс не идет. Все эти бактерии – грамотрицательные **хемолито-автотрофы**, использующие энергию окисления соединений азота для синтеза органических веществ из углекислого газа. Некоторые из них способные переключаться на хемоорганогетеротрофный метаболизм, однако ни одного хемолитогетеротрофа среди данных организмов найдено не было. Морфологически эти группы разнообразны, в большинстве своем мелкие, подвижные, с полярным или перитрихальным жгутикованием. **Окисление они проводят на цитоплазматической мембране.**

**Денитрификация**, протекающая под воздействием микробов, представляет собой восстановление нитратов в нитриты и в последующем с образованием в качестве конечного продукта – молекулярного азота ( $N_2$ ), возвращающегося из почвы в атмосферу. Вызывается этот процесс денитрифицирующими бактериями. Наиболее распространенные из них в природе: *Thiobacillus denitrificans* – палочка, не образующая спор, факультативный анаэроб; *Ps. fluorescens* – подвижная палочка, выделяет флюоресцирующий пигмент, быстро разлагает нитраты; *Ps. aeruginosa* – бактерия сходна с предыдущей, образует похожий зеленоватый пигмент; *Ps. stutzeri*, (синоним *Bacillus denitrificans*) – пигмента не выделяет, небольшая палочка, образующая цепочки, факультативный анаэроб, разлагает нитраты в анаэробных условиях. Отнесена к псевдомонадам на основании исследования 16s рРНК.

При исследовании на твердой среде у этой бактерии есть сухие, жесткие колонии, которые так плотно слипаются друг с другом, что зачастую легче уда-

лить целую колонию, если необходимо, а не только ее часть. Цвет колоний обычно коричневый, хотя может изменяться при смене среды. Форма каждой колонии имитирует кратер, поскольку внешние края приподняты, образуя углубление в центре. Края каждой колонии выступают наружу, часто позволяя колониям контактировать друг с другом. Изолированы и изучены многие штаммы этой широко распространенной в природе бактерии. *Ps. stutzeri*, которая встречается в окружающей среде и занимает широкий спектр экологических ниш, включая даже то, что является условно-патогенным возбудителем заболеваний у человека. Среда обитания и экология *P. stutzeri* разнообразны не только из-за его способности к органотрофному или анаэробному росту с использованием окислительного метаболизма, но также из-за его хемолитотрофных свойств, устойчивости к металлам, использования разнообразных источников азота и диапазона температур, поддерживающих его рост.

*Ps. stutzeri* были обнаружены в области ризосферы почвы, что свидетельствует о значимости этой бактерии как фиксатора азота. Эта бактерия была выделена из загрязненных нефтью образцов почвы и морской воды / донных отложений. Этот штамм отвечает требованиям устойчивости к NaCl и обнаружен в толще воды в Тихом океане и в отложениях в. Эти морские штаммы выполняют множество экологических функций, включая разложение нафталина, окисление серы и, что наиболее важно, денитрификацию и диазотрофию (фиксацию азота).

**Превращение микроорганизмами фосфора, железа и серы.** Содержание фосфора в теле взрослого человека около 1% (примерно 700 г на 70 кг массы тела). Суточная потребность человека в фосфоре составляет 1,3 г. Фосфор в организме теплокровных входит в состав костной и зубной ткани, нуклеиновых кислот, фосфолипидов, один из основных компонентов клеточных мембран, участвует в запасах энергии в виде АДФ и ФТФ, в поддержании кислотно-щелочного равновесия. Особенно много фосфора в ядрах клеток, головном мозге человека и животных. Микроорганизмы, участвующие в превращении соединений фосфора, живут в почве, воде. Их роль сводится к двум процессам: минерализации фосфора, входящего в состав органических веществ, и превращению фосфорнокислых

солей из слаборастворимых в хорошо растворимые. Минерализацию фосфора вызывают гнилостные бактерии, в частности *Bac. megatherium*. Образующаяся при этом фосфорная кислота связывается со щелочами почвы и превращается в слаборастворимые соли кальция, железа, магния и, следовательно, малодоступные для растений. В дальнейшем под действием почвенных кислотообразующих бактерий, особенно нитрифицирующих, эти соли превращаются в растворимые соединения фосфорной кислоты, доступные для растений.

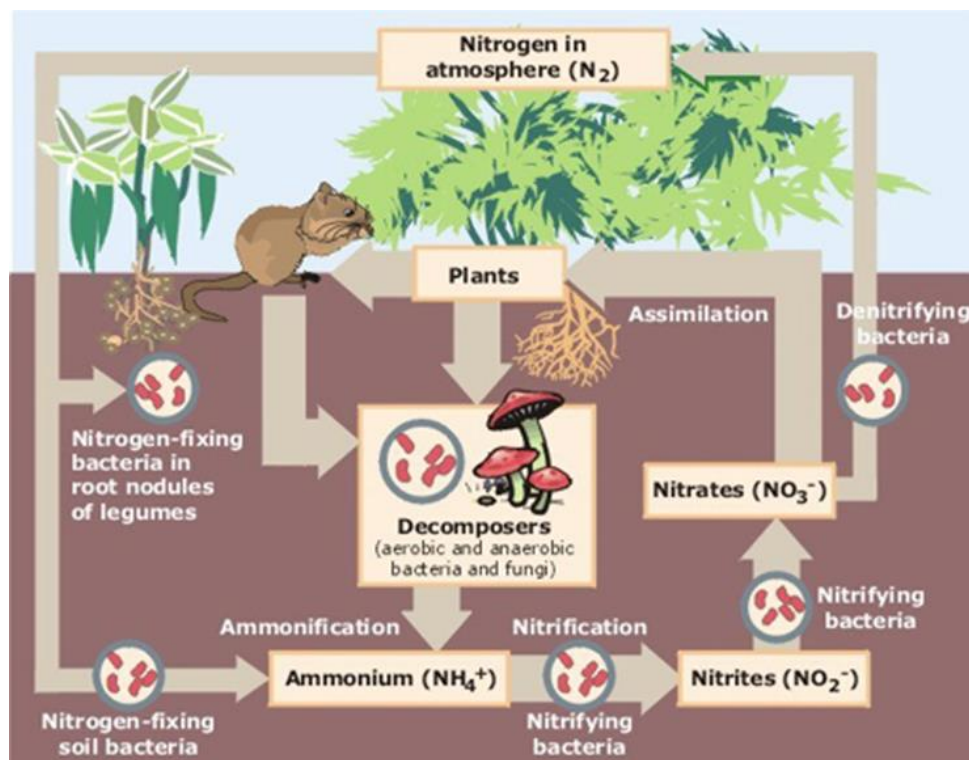


Рис. 1 Схема круговорота азота

### Железо и значение его превращения микроорганизмами.

В норме в организме человека содержится 4-5 г железа. Около 70 % от этого количества составляет железо, "встроенное" в гемоглобин эритроцитов: оставшееся в основном запасается в тканях в виде ферритина и гемосидерина. Железо входит в состав белка гемоглобина, переносчика кислорода, содержащегося в эритроцитах, чем и объясняется его важная роль в процессе дыхания человека и животных.

Основные представители железобактерий в природе – нитчатые бактерии родов *Crenotrix* (один из видов этого рода изучал С.Н. Виноградский),



*Chlamydothrix*, *Cladothrix*. Эти бактерии представляют собой длинные нити, покрытые общим слизистым влагалищем, в котором отлагается гидрат окиси железа. По химической природе **гидратом оксида железа** являются соединения состава  $\text{FeO}(\text{OH})$  или  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . При взаимодействии соли **оксида железа** со щелочами **гидрат оксида железа** выделяется в виде аморфного осадка буро-желтого цвета, который при высыхании переходит в гель с переменным содержанием воды. После отмирания бактерий образуется болотная и озерная железная руда, залегающая островами в десятки и сотни квадратных метров. Железобактериям принадлежит важная роль в образовании железомарганцевых отложений в природе.

**Сера и ее превращения микроорганизмами.** В состав белка растений и животных входит сера (серосодержащие аминокислоты – цистин, цистеин, метионин). Этим объясняется важность данного элемента в круговороте серы для всех живых организмов. Бактерии, преобразующие соединения серы, относятся к тионовым серобактериям, широко распространенным в природе (почва, вода, навоз). Тионовые бактерии (род *Thiobacillus*) – мелкие, одиночные клетки, грамотрицательные, аэробы, у которых при окислении сероводорода  $\text{H}_2\text{S}$  и его соединений не происходит отложения серы в микробной клетке и на ее поверхности, т.к. они превращают ее в серную кислоту  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (затем в почве образуются сульфаты). Тионовые бактерии получают химическую энергию для синтеза органических соединений из  $\text{CO}_2$ , т.е. они хемолитоавтотрофы. Они участвуют в превращении не только серы, но и других элементов. Различаются устойчивостью к pH среды (от 0,6 до 10,0). Имеются галофильные штаммы. Оптимальная температура роста 28-30 °C.

Серобактерии *Beggiatoa* распространены в болотах и в прудах с илистым дном, вообще в водах, содержащих разлагающиеся растительные остатки. Но скопления *Beggiatoa* бросаются в глаза только в сероводородных водах в виде бесцветных длинных нитей. Внутри клеток или на их поверхности откладываются капли серы. Первым, кто стал изучать эти бактерии, был С.Н. Виноградский. При разложении в почве органических серосодержащих веществ, а также при

восстановлении солей серной, сернистой и серноватистой кислот образуется сероводород, ядовитый для растений и животных. Этот газ превращается серобактериями в безвредные, доступные для растений соединения. Бактерии используют энергию химических реакций; это **хемолитоавтотрофы**.

К пигментообразующим, цветным, серобактериям относятся пурпурные и зеленые микроорганизмы, которые используют свет в качестве источника энергии. Сероводород они окисляют, используя его как донор водорода для синтеза из  $\text{CO}_2$  органических соединений. **Процесс происходит в анаэробных условиях и не сопровождается выделением кислорода; это фотолитоавтотрофы.**

### **Роль микроорганизмов в круговороте углерода.**

Важнейшим органогеном, входящим в состав бактерий, грибов, растений, тканей человека и животных, т.е. всех живых организмов, является углерод. В клеточном веществе этот элемент составляет около 50% сухого вещества. Он входит в состав белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот. Кроме тканей живых организмов и продуктов, образующихся после их разрушения (каменный уголь, нефть), углерод входит в состав минералов, образуя связи с двухвалентными металлами. Самым распространенным из таких минералов является  $\text{CaCO}_3$  (кальцит), образующий на поверхности Земли большие скопления.

В атмосфере планеты углерод входит в состав углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ), который находится в небольшом количестве (0,03%), но в растворенном состоянии  $\text{CO}_2$  находится во всех водах. Поступление в атмосферу больших количеств углекислого газа от современных промышленных предприятий может отрицательно повлиять на изменение климата планеты, вызвав «тепловой» эффект.

Одним из первых, кто обратил внимание на круговорот углерода в природе был В.И. Вернадский. В дальнейшем этому вопросу было уделено внимание многих ученых. Представлялось удивительным, как при таком малом содержании  $\text{CO}_2$  в атмосфере процесс фотосинтеза на планете продолжается тысячи лет, а мировая флора потребляет углерода в год до 10 кг. Растения, являясь основными потребителями  $\text{CO}_2$ , могли бы исчерпать весь  $\text{CO}_2$  из атмосферы за несколько десятков лет. В природе существуют и автотрофные микробы для превращения

углекислоты, не имеющей энергетических свойств, в органические энергетические соединения нуждаются в тепловых источниках, которыми для них служит солнечная энергия или химическая энергия окисления минеральных веществ. Усвоение углерода с использованием солнечной энергии называется фотосинтезом, а с использованием химической энергии – хемосинтезом. К фотоавтотрофам относят бактерии, имеющие пигмент: зеленые содержат в цитоплазме хлорофилл, а пурпурные – красный или коричневый пигмент. Наиболее значимы из них нитрифицирующие бактерии, окисляющие аммиак в соли азотистой кислоты. Источником углерода для синтеза клеточного вещества у них служит углекислота. Тионовые бактерии относятся к хемоавтотрофам, они окисляют серу до серной кислоты. Таким образом, автотрофные микробы, используя солнечную или химическую энергию, превращают углекислоту в органическое вещество.

Основной процесс, возвращающий углекислоту в атмосферу, – разложение органических соединений под влиянием микроорганизмов. Процесс, происходящий в присутствии кислорода, является дыханием, а процесс разложения органических безазотистых соединений в анаэробных условиях называется *брожением*. В природе существует много типов брожения, вызываемых определенными видами микроорганизмов, обладающими соответствующими ферментативными системами. При брожении из исходного органического вещества освобождается только часть энергии, а оставшаяся находится в конечном продукте брожения. Название брожений соответствует этому продукту (спиртовое, молочнокислое, пропионовокислое и т.д.).

Процессы, связанные с **активностью целлюлозоразрушающих** микроорганизмов, свидетельствуют о биологической продуктивности почвы. Поскольку полисахарид целлюлоза  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , входящий в состав клеточных стенок растений, в большом количестве попадает в почву, почвенные микроорганизмы возвращают в атмосферу так нужный для нее углекислый газ, разлагая растительные остатки, содержащие большие запасы углерода. Исследования показали активность аэробных и анаэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов. **Аэробное разложение клетчатки** наиболее интенсивно происходит под влия-

нием следующих трех родов микроорганизмов, широко распространенных в природе: *Cytophaga* – подвижных длинных палочек с заостренными концами, *Celvibrio* – изогнутых палочек, *Celfacicula* – коротких палочек. В аэробных условиях клетчатку разлагают также актиномицеты и плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*. Целлюлозные микроорганизмы выполняют огромную санитарную роль, разлагая клетчатку отмерших растений, благодаря чему в почве накапливается гумус, повышающий ее плодородие

По данным ученых НИИ с.-х. микробиологии (г. Санкт-Петербург) на основании фенотипических и филогенетических признаков описана структура ассоциации бактерий, утилизирующая целлюлозу. Выделенные из ассоциации бактерии по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам идентифицированы как *Sporocytophaga* sp., *Xanthomonas* sp. и *Pseudomonas* sp. Согласно результатам филогенетического анализа, основанного на сравнении нуклеотидных последовательностей ПЦР фрагментов гена 16S рРНК, выделенных из ассоциации, выявлено 6 видов бактерий, относящихся к филогенетическим кластерам *Alcaligenes* sp., *Ochrobacterium* sp., *Sphingomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp. и *Flexibacteraceae* (*Sporocytophaga*).

**Анаэробное разложение клетчатки.** Интенсивно разлагает клетчатку в навозе в анаэробных условиях термофильный микроб *Cl. termocelum*, разогревая навоз до 60-65 °С. Анаэробное брожение клетчатки, в виде водородного и метанового брожения клетчатки, происходит в преджелудках крупного рогатого скота и имеет особое значение. При поедании этими животными большого количества зеленой массы бобовых растений (люцерны, клевера), особенно влажной от росы или дождя, в их преджелудках происходит интенсивное брожение с образованием большого количества водорода, метана, углекислоты. В настоящее время появилось мнение, что животноводство в связи с обилием отрыгиваемых животными газами наносит вред экологии, способствуя развитию теплового эффекта.

**Брожение пектиновых веществ.** Разрушение отмерших растений происходит при активном участии микроорганизмов, вызывающих брожение пектино-

вых межклеточных веществ, связывающих растительные клетки. При нагревании пектиновые вещества приобретают студневидную консистенцию (*pectis* – студень). Возбудители этого брожения – *Cl. pectinovorum* – спорообразующие подвижные крупные палочки.

**Спиртовое брожение** вызывается дрожжевыми грибами, преобразующие сахара ферментом зимазой с образованием этилового спирта, углекислоты и энергии по следующему уравнению:



Особенности дрожжей в отношении способности к дыханию и брожению делает их незаменимыми в пивоварении, виноделии, в пищевой промышленности, а большое содержание белка и витаминов в животноводстве и медицине. Дикie дрожжи широко распространены в природе, они живут на цветах, листьях и стеблях растений, особенно в большом количестве на плодах. Культурные дрожжи используются в хлебопечении. Кефир изготавливается также с участием дрожжей. Вся промышленность по изготовлению этилового спирта, различных вин, пива основана на деятельности дрожжей. В животноводстве применяются жидкие и сухие кормовые дрожжи, богатые белками, и витаминами.


*Saccharomyces cerevisiae* – пекарские, хлебные дрожжи – представляют собой овальные клетки величиной 8-10 мкм. Эти дрожжи вызывают верховое и низовое брожение. Верховое брожение происходит при температуре 14-24 °С с обильным выделением газа, при этом дрожжи поднимаются вверх, образуя пленку. Этот вид брожения используется в хлебопечении и виноделии. Низовое брожение протекает при температуре 4-10 °С, дрожжи размножаются медленно в нижних слоях, используется в пивоварении.

*Torula utilis* – кормовые дрожжи – крупные, круглые клетки, обладающие энергичным ростом, цитоплазма их богата жиром. *Torula kephir* – кефирные дрожжи – овальные и круглые клетки, располагающиеся в кефире скоплениями.

**Молочнокислое брожение.** Природу этого брожения установил Л. Пастер, доказав, что это не химический процесс, как принято было считать. Возбудители этого брожения весьма широко распространены в природе, их обнаруживают

в почве, воде, воздухе, на растениях, в животноводческих помещениях. В результате молочнокислого брожения углеводы, а также многоатомные спирты расщепляются до молочной кислоты. Можно представить брожение следующим уравнением:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHONCOOH + \text{энергия}$ .

Молочнокислое брожение – анаэробный процесс, протекающий без кислорода, широко используется человеком для изготовления различных кисломолочных продуктов. Приготовление силоса, квашение и соление овощей основано также на молочнокислом брожении.

*Streptococcus lactis* – шарообразные или овальные клетки этого микроба располагаются попарно, но чаще цепочками; образует 0,8-1% молочной кислоты. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (лат.), болгарская палочка – подвижная *Lactobacillus delbrueckii*, одна из двух бактерий, используемых для производства йогурта. Ранее бактерия была известна как вид *Lactobacillus bulgaricus*, названа в честь Болгарии, в которой была впервые открыта и  выделена И. И. Мечниковым из болгарской простокваши. Это неподвижная, длинная, не образующая спор палочка, термофил, оптимальная температура для нее 40-48 °С, накапливает 3-3,5% молочной кислоты.

*Lactobacillus acidophilus* – вид бактерий рода *Lactobacillus*, используется в промышленности совместно со *Streptococcus salivarius* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* для изготовления ацидофилина и других ацидофильных напитков – морфологически и физиологически сходна с болгарской палочкой.

*Lactobacillus casei* – неподвижная палочка, встречаются короткие и длинные формы, располагающиеся цепочками.

*Bact. brassicum* – основной возбудитель брожения при сквашивании капусты, накапливает около 2 % молочной кислоты. *Bact. cucumeris fermentati* – возбудитель брожения при засолке огурцов, накапливает 1 % молочной кислоты.

Все молочнокислые бактерии являются антагонистами гнилостных микробов, расщепляющих белки с образованием аммиака. На этом основано применение диетических молочнокислых продуктов для профилактики и лечения желу-

дочно-кишечных заболеваний, вызванных гнилостными микробами у человека и новорожденных животных.

**Уксуснокислое брожение.** По своей сути является **окислением** – микробиологический процесс окисления этилового спирта в уксусную кислоту, т.е. осуществляется в присутствии воздуха. Природу его впервые установил Л. Пастер, доказав ведущую роль в нем бактерий, а не химических процессов. Бактерии рода *Acetobacter* широко распространены в природе, их обнаруживают в почве, воздухе, на растениях в кишечнике насекомых. Род состоит из множества видов, среди них главной является *Acetobacter aceti* – уксусная палочка. Это неподвижная, короткая, бесспорная, аэробная палочка, располагается изолированно, но чаще длинными цепочками.

При длительном хранении пива, сухих (не крепленных спиртом) вин на их поверхности появляется морщинистая пленка, носящая название «уксусная матка», или *Mycoderma aceti*. Она состоит из трех наиболее распространенных в природе уксуснокислых бактерий – *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianum* и *A. kuetzingianum*. В промышленности уксус получают с использованием этих бактерий путем размножения их на буковых опилках, обильно увлажненных раствором этилового спирта.

Уксуснокислое брожение имеет важное практическое значение при силосовании кормов.

**Маслянокислое брожение** впервые изучил Л. Пастер, вызывается маслянокислыми бактериями, разлагающими углеводы с образованием масляной кислоты, по следующему уравнению:



Маслянокислые бактерии в большинстве анаэробы, они широко распространены в природе, их обнаруживают в почве, воде, воздухе, на растениях, продуктах питания и кормах. Одновременно с углеводами они разлагают жиры и белки, при этом вначале образуются промежуточные продукты – пировиноградная кислота, уксусный альдегид, затем масляная кислота и побочные продукты – ацетон, бутиловый спирт, углекислота, водород. Маслянокислое брожение вы-

зывает около 25 видов микроорганизмов.

Основные из них: *Cl. pasteurianum*, *Cl. pectinovorum*, *Cl. felsineum*. Это подвижные крупные палочки с закругленными концами, образуют споры, приобретая характерную веретенообразную форму. В цитоплазме этих микробов содержится гликоген и гранулеза, поэтому они хорошо окрашиваются раствором йода в синий и бурый цвет. Споры бактерий устойчивы к высокой температуре и могут переносить стерилизацию при температуре 120 °С, оставаясь, например, в мясных и рыбных консервах. Размножаясь в консервах, бактерии расщепляют белки, образуют газы, вызывающие вздутие банок (бомбаж). Одновременно в этих продуктах накапливаются и ядовитые вещества.

Маслянокислое брожение нередко является причиной прогоркания семян подсолнечника, сои, прогоркания растительных масел и жиров животного происхождения. При накоплении в силосе масляной кислоты в количестве 0,3-0,4 % корм плохо поедается животными. Маслянокислые клостридии участвуют в самосогревании влажного зерна, сена.

Кроме названных видов брожений в природе существуют и другие – пропионово-кислое, муравьинокислое, бифидоброжение, гомоацетатное.

В мире существует около 5 тысяч различных продуктов питания, получаемых с использованием брожения. Брожение имеет значение и для заготовки кормов в сельском хозяйстве.

Человек использует природные способности микроорганизмов в своих целях.

#### *Вопросы для самопроверки*

- 1. Что входит в понятие биосфера.*
- 2. Назовите микроорганизмы-аммонификаторы и объясните их роль в круговороте азота.*
- 3. Напишите уравнения нитрификации и микроорганизмы, его осуществляющие.*
- 4. Значимость брожений для планеты.*
- 5. Приведите уравнение одного из брожений и объясните его значение.*
- 6. Назовите примеры микроэлементов, входящих в состав важнейших ферментов.*



## **РАЗДЕЛ 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСТОЯНИЯ ПРИРОДНОЙ И АНТРОПОГЕННОЙ СРЕДЫ**

### **План**

1. Методы общей микробиологии.
2. Методы исследования почвенной микробиоты
3. Исследование микроорганизмов воды.
4. Исследование микроорганизмов воздушной среды.

#### **1. Методы общей микробиологии.**

Раздел дисциплины – Методы изучения микробиологических показателей состояния природной и антропогенной среды, связан с освоением микробиологических методов исследования с тем, чтобы магистры могли самостоятельно выполнить не только предусмотренные программой опыты, но и планировать и осуществлять собственные эксперименты в будущем.

На лабораторных занятиях будут осваиваться методики отбора проб из разных сред обитания микроорганизмов – почвы, воды, воздуха. При культивировании микроорганизмов магистры знакомятся с большим разнообразием питательных сред, соответствующих потребностям бактерий – среды универсальные, элективные, естественные, синтетические, дифференциально-диагностические.

Осваиваются различные методы посева бактерий, что связано с их разной исходной концентрацией в испытуемом образце. Проводится учет численности микроорганизмов различных субстратов и сравнительная их оценка. Описывается морфология колоний выросших микроорганизмов и дается предварительная оценка принадлежности к той или иной группе бактерий. Микроорганизмы из выросших колоний можно выделять в чистые культуры, микроскопировать после окраски различными методами, что также представляет большой интерес для ознакомления с морфологией бактерий.

Приготовление мазков-препаратов и окраска бактерий по методу Грама по-прежнему остается актуальной несмотря на наличие современных молекулярно-

генетических методов определения видов. Изучение морфологии микроорганизмов в световом микроскопе всегда интересно, т.к. это непосредственный взгляд в невидимую и обычно недоступную для нашего глаза область. При микроскопии нативных препаратов грибов можно обнаружить наличие ложного мицелия у грибов рода *Candida*, сумки со спорами у дрожжей родов *Lipomyces*, *Debaryomyces*, *Williopsis*, выявить капсулы у почвенных дрожжей *Lipomyces* или *Cryptococcus* методом негативного контрастирования.

## **2. Методы изучения почвенной микробиоты.**

Благодаря наличию огромного разнообразия микроорганизмов почвы разработано множество методов исследования как количественного, так и качественного состава микроорганизмов, выполняющих определенные функции. Можно делать посевы почвы на жидкие и плотные питательные среды, подбирая их состав, подходящий для жизнедеятельности определенных групп микроорганизмов. Учитывая большое количество микроорганизмов в 1 г почвы из отобранных образцов перед посевом делают разведения в стерильном физиологическом растворе (1:10, 1:100 и т.д.). При учете результатов и подсчете количества выросших колоний микроорганизмов учитывают эти разведения.

На плотных средах (МПА) можно выделить микроорганизмы, использующие органические формы азота, на КАА – крахмало-аммиачный агар – микроорганизмы, в том числе актиномицеты, способные использовать минеральные формы азота. Для определения азотфиксаторов (азотобактер и олигонитрофильные микроорганизмы, включая дрожжи рода *Lipomyces*) применяют среду Эшби без азота, а для выделения грибов – благоприятную для них кислую среду Чапека. На бобовом агаре выращивают симбиотические бактерии из клубеньков. На среде Гетчинсона с бумажным фильтром определяют целлюлозоразрушающие микроорганизмы. При посеве микроорганизмов почвы применяют метод обрасстания комочков, когда учет аэробов ведется по проценту обрасстания почвенных комочков определенной функциональной группой микроорганизмов.

На жидких средах можно выделить по методу и на среде Виноградского

анаэробные азотфиксаторы, обеспечив им рост в высоком столбике питательной, не содержащей органического и минерального азота, среде. Также на среде Виноградского учитывают микроорганизмы первой фазы нитрификации. Среда Гильтая служит для выявления денитрификаторов, а среда Имшенецкого и Солнцевой – для выявления аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

**Биологическая активность почвы** – это совокупность биологических и биохимических процессов, протекающих в почве и связанных с жизнедеятельностью почвенной фауны, микробиоты почвы и корней растений. Ее определяют, используя различные **методы**: микробиологические (прямой подсчет микроорганизмов разных групп: бактерий, актиномицетов, грибов, и определение количества микроорганизмов на разных питательных средах), биохимические (определение ферментативной активности почв, и др.).

Биологическая активность почвы – ёмкое понятие, в которое входят все возможные варианты деятельности микроорганизмов – активность выделения диоксида углерода, свидетельствующая о наличии аэробных микроорганизмов (определяется в аппарате Варбурга); выделение аммиака, показывающее аммонифицирующую активность, проводят, используя для отгонки аммиака отгонный аппарат для определения азота по микрометоду Кьельдаля, или в особых чашках Конвея; о нитрифицирующей активности судят по определению использованных нитратов, добавленных в опытные образцы почвы в виде сульфата аммония, по сравнению с контролем без сульфата. Процессы денитрификации и их активность определяют по методу Фадеевой с использованием ацетилена, что позволяет вычленив процесс от других и количественно оценить его методом газовой хроматографии. Газовый хроматограф используют и при определении азотфиксирующей активности микроорганизмов почвы и активности симбиотических бактерий ризосферы. Об интенсивности процесса азотфиксации в почве судят на основании определения активности нитрогеназы – азотфиксирующего ферментного комплекса микроорганизмов, способного восстанавливать не только молекулярный азот, но также и ряд других соединений с тройной связью, в

частности ацетилен. Ацетиленовый метод определения активности азотфиксации основан на способности нитрогенезы восстанавливать ацетилен до этилена в количестве, пропорциональном количеству азота, которое может быть восстановлено в тех же условиях. Оценка активности азотфиксации проводится по измерению количества образовавшегося этилена.

Принято считать, что содержание в почве подвижного азота и других элементов питания способствует разрушению целлюлозы. Это процесс изучают, закапывая льняную ткань, натянутую на стеклянные пластинки, на глубину 35 см. Через 20-30 дней плотно выкапывают, отряхивают от почвы и обнаруживают участки с разрушенной тканью – это места, где активно развивались микроорганизмы. Обработка этих участков 0,5% нингидрином дает сиреневое окрашивание, т.к. нингидрин реагирует с аминокислотами.

#### **Экологические методы исследования почвенной биоты**

Метод стекол обрастания (по Росси – Холодному). Метод позволяет наблюдать «микробные пейзажи». В небольшом почвенном разрезе одну из стенок зачищают и, сделав ножом вертикальную щель, закладывают в нее стерильные предметные стекла, плотно прижимая их к почве. Закапывают разрез, отмечая колышком местонахождение препаратов. Если почва содержит достаточно влаги, то закопанное стекло вскоре покрывается почвенным раствором, к его поверхности прилипают коллоидные частички органического и минерального происхождения. В этой среде поселяются и активно развиваются различные микроорганизмы, образующие на стеклах характерные для данной почвы микропейзажи. По истечении срока экспозиции (не менее одного месяца) стекло осторожно отделяют от почвы (не скользящим движением), подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени, отмывают препарат водой от крупных частиц почвы, оставив стекло в стакане с водой в наклонном положении на несколько часов, окрашивают 1%-ным карболовым эритрозинном в течение 1 ч во влажной камере, промывают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Метод широко применяется в микробиологической практике. С помощью этого метода впервые оказалось возможным наблюдение за распределением различных мик-

роорганизмов в их природной среде обитания, наблюдение за формой и размерами группировок микроорганизмов, их взаимоотношениями.

Модификации метода заключаются в том, что стекла перед помещением в почву покрывают какой-нибудь питательной средой или специфическим субстратом (например, фильтровальной бумагой, льняной тканью и т.д.).

**Метод капиллярных педоскопов.** В естественных условиях в почве, илах развитие микроорганизмов может происходить в почвенных капиллярах, к стенкам которых прикрепляются почвенные микроорганизмы. На этом основан метод, предложенный Б.В. Перфильевым и Д.Р. Габе. Используют специальный прибор – педоскоп, состоящий из набора плоских капилляров, и ставят его по направлению почвенного раствора в мягкую почву вертикально, при небольшом нажиме, а в плотную почву – с помощью пробойника. Каналы капилляров имеют ширину 0,65-1,0 мм и высоту 0,2-0,3 мм. В них и происходит развитие микробов. Педоскоп оставляют в почве на месяц, а затем вынимают, отряхивая от прилипших снаружи частичек почвы. Микробные клетки в педоскопах могут быть зафиксированы и окрашены. Фиксируют их в парах осмиевой кислоты или в парах 40%-ного раствора формалина. Окрашивают 1%-ным раствором карболового эритрозина, промывают водой.

**Самоочищение почвы – один из важнейших процессов, происходящих в почве.** Основная роль в минерализации органических веществ, обуславливающей самоочищение почвы, принадлежит почвенным микроорганизмам. Под действием ферментов гнилостных бактерий сложные органические вещества, попавшие в почву, разлагаются на простые минеральные соединения ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ), доступные для питания автотрофных организмов. В почве непрерывно совершаются процессы, обусловленные жизнедеятельностью микроорганизмов: гниение, тление, нитрификация, денитрификация, разложение клетчатки, мочевины. Эти процессы распада и минерализации органических веществ имеют большое санитарно-гигиеническое значение.

В процессе самоочищения почвы содержание санитарно-показательных микроорганизмов – бактерий группы кишечных палочек (БГКП) и термофиль-

ных споровых бактерий в ней изменяется. Наличие БГКП, свидетельствующее о свежем фекальном загрязнении почвы, проводится на дифференциально-диагностической среде Эндо, обеспечивающий рост кишечных бактерий. Термофильные клостридии, указывающие на старое фекальное загрязнение почвы, выращиваются на среде Вильсон-Блера или Кит-Тароцци.

В качестве показателя активности самоочищения почвы используют определение энергии нитрификации. Усиленному размножению нитрифицирующих бактерий способствует наличие в почве большого количества аммиака – продукта белкового распада. Чем больше минерализовано органических веществ в почве, тем интенсивнее протекает процесс нитрификации и, следовательно, процесс самоочищения почвы.

Все эти опыты, упомянутые выше по выделению из почвы и культивированию микроорганизмов на различных питательных средах, магистры проделают сами. Для этого предварительно будут изучаться особенности физиологии бактерий с тем, чтобы правильно подобрать необходимые питательные среды.

### **3. Исследование микроорганизмов воды.**

В водоемы попадает огромное количество органических веществ, микробы окисляют их до минеральных соединений. Загрязнение воды, в том числе болезнетворными микробами, может быть препятствием для использования воды. Поэтому любой водный источник необходимо подвергать санитарно-микробиологической оценке по следующей схеме: отбор проб; определение окисляемости (количество растворенного в воде кислорода при норме 5 мг/л); общее количество микробов (не более 1000 КОЕ в 1 мл); коли-титр, коли-индекс.

Коли-титр дает представление о наименьшем количестве воды, в котором содержится одна кишечная палочка.

Коли-индекс – общее количество кишечной палочки в 1 л воды.

Питьевая вода имеет свои критерии, отличные от природной.

Изучение различных групп микроорганизмов дает возможность представить, насколько разными будут показатели природной воды и воды, подверг-

шейся антропогенному воздействию. Вода представляет собой благоприятную среду для существования и размножения микроорганизмов. Содержание микроорганизмов и разнообразие их видов зависит от количества в воде доступных для питания микроорганизмов органических и минеральных веществ, а также от процентного содержания в воде кислорода, попадающего в воду солнечного света, от температуры воды и др. факторов. В связи с этим в воде могут находиться самые разные по типу питания и получения энергии микроорганизмы как сапрофитные, так и патогенные.

Сотрудники института микробиологии им. С.Н. Виноградского впервые исследовали и описали разнообразие микроорганизмов аапа болот, чтобы лучше понять роль этих экосистем в круговороте углерода и регулировании парникового эффекта (2022). Это особый тип болот, в которых центральная часть низинного типа, а окраины – верхового. Аапа-болота представляют собой широкие равнинные или слабо наклонённые заболоченные территории, большей частью без деревьев. Они получают питательные вещества от окружающих территорий и обычно покрыты буйной и разнообразной растительностью. Как правило, лишённые деревьев аапа-болота окружены топиями с низкорослыми соснами. В центре по линиям стока располагаются вторичные озера и топи. Характеризуются евтрофными мочажинами с редким покровом из пушицы и осоки. Торф усиливает микробную деятельность в аапа-болотах, в результате чего образуется быстро разлагающийся осоковый торф. Характерная особенность аапа-болот – залегание в сильно обводненных понижениях с вогнутым поперечным профилем, часто достаточно выраженный грядово-мочажинный микрорельеф с расположением гряд и их фрагментов перпендикулярно направлению стока. В зависимости от богатства водного питания торфяная залежь мочажин низинного или переходного типа, а возвышающихся над ними гряд – от мезотрофного до олиготрофного.

При оценке воды для использования ее в дальнейшем в качестве питьевой учитываются такие биологические показатели как наличие донных отложений (наносы и твердые частицы, осевшие на дно водного объекта), фитопланктона,

зоопланктона, макрофитов, водорослей. Вода исследуется также на наличие водных сапрофитных микроорганизмов (гетеротрофные микроорганизмы, использующие для питания органические вещества, в том числе продукты жизнедеятельности и останки организмов). Поскольку вода используется непосредственно человеком, а также для выпаивания животным, для бытовых и хозяйственных нужд, она должна подвергаться очистке с целью предотвратить возможное распространение возбудителей различных заболеваний, вызванных бактериями, грибами, вирусами, простейшими. Через воду передаются такие заболевания как холера, брюшной тиф, паратиф В, дизентерия, туляремия, лептоспироз, колиэнтериты – заболевания, вызываемые энтеропатогенными кишечными палочками. Меньшее, но все же определенное значение имеет водный путь передачи для таких заболеваний, как бруцеллез, гепатиты А и Е, полиомиелит. Длительную сохранность в воде имеют споры сибирской язвы (в воде колодцев – до 10 лет). В литературе описаны случаи заражения туберкулезом при пользовании инфицированной водой. Водным путем могут передаваться паразитарные заболевания – амебиаз (амебная дизентерия, вызываемая *Entamoeba histolytica*), лямблиоз, причиной которого служит жгутиконосец *Lambliа intestinalis*, балантидиаз, вызываемый инфузорией *Balantidium coli*, а также заболевания, вызываемые гельминтами. Экспертами ВОЗ установлено, что 80% всех болезней в мире связано с неудовлетворительным качеством питьевой воды и нарушениями санитарно-гигиенических норм водоснабжения.

Санитарный контроль качества воды – многоуровневый процесс, который начинается с выбора и мониторинга источника водоснабжения, подготовки воды до обеззараживания и отведения использованной воды в приемник сточных вод. Санитарно-микробиологическая оценка качества воды подразумевает определение совокупности санитарных показателей – критериев, отражающих соответствие или несоответствие санитарного состояния исследуемого водного объекта требованиям нормативным документов.

В России введен ГОСТ Р 31952-2012 Устройства водоочистные. Общие требования к эффективности и методы ее определения. Общие требования к эф-



фективности и методы ее определения. Настоящий стандарт распространяется на устройства для доочистки (дообеззараживания) воды централизованных систем и нецентрализованного питьевого водоснабжения, а также очистки (обеззараживания) воды поверхностных и подземных источников водоснабжения, для которых суточный объем очищаемой воды не выше 5 м<sup>3</sup>/сут. Настоящий стандарт устанавливает общие требования к эффективности водоочистных устройств и методы ее определения.

Оценка санитарно-гигиенического состояния воды проводится в соответствии с СанПиН 2.1.4.1074-01. 2.1.4. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Безопасность воды с точки зрения микробиологических и паразитологических показателей определяется по следующим показателям – Общее микробное число, Общие колиформные бактерии, Термотолерантные колиформные бактерии, Колифаги, Споры сульфитредуцирующих клостридий, Цисты лямблий по Нормативам, приведенным в табл. 1.

Необходимо познакомиться и с системами оценки водопроводной воды, существующими сейчас (Российская, ВОЗ, США, Европейского союза).

В настоящее время в мире существует несколько стандартов на питьевую воду. Это стандарты США, Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), Европейского Союза (ЕС) и Российский стандарт, определяемый соответствующими ГОСТами.

С 01.01.2004 г. введен в действие Межгосударственный стандарт Вода и водоподготовка (ГОСТ 30813-2002), содержащий термины, предусмотренные ИСО ISO 6107-1:2004 «Качество воды. Словарь», с уточнениями и дополнениями, отражающими практику в области водоподготовки. Этот стандарт принят Республиками Армения, Казахстан, Кыргызстан, Молдова, Таджикистан, Туркменистан, Узбекистан и Российской Федерацией. В последующем тексте термины, приводимые согласно этому словарю, даются в кавычках.

Таблица 1. Санитарно-гигиенические показатели воды

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл* (1)	Отсутствие
Общие колиформные бактерии *(2)	Число бактерий в 100 мл* (1)	Отсутствие
Общее микробное число *(2)	Число образующих бактерий в 1 мл	Не более 50
Колифаги *(3)	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие
Споры сульфитредуцирующих клостридий *(4)	Число спор в 20 мл	Отсутствие
Цисты лямблий *(3)	Число спор в 50 мл	Отсутствие

*П р и м е ч а н и я:*

1) При определении проводится трехкратное исследование по 100 мл отобранной пробы воды.

2) Превышение норматива не допускается в 95% проб, отбираемых в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 месяцев, при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

3) Определение проводится только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

4) Определение проводится при оценке эффективности технологии обработки воды.

Одним из критериев санитарно-гигиенического состояния воды является общее микробное число (**ОМЧ**), которое расценивается как показатель интенсивности загрязнения воды органическими веществами. ОМЧ – «Общее число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37 °С в течение 24 ч, видимые с увеличением в два раза. Наряду с инкубацией при температуре 37 °С используют инкубацию посевов при температуре 20-22 °С в течение 72 ч для учета сапрофитных водных организмов». Общее количество бактерий определяют в пересчете на число колоний, выросших при посеве 1 мл воды. В настоящее время ОМЧ, выраженное в количестве КОЕ (Колонии Образующих Единиц или CFU по-английски) согласно рекомендации ВОЗ должно отсутствовать; по Американским стандартам (USEPA) ОМЧ может равняться цифре 500;

по Европейским стандартам (ЕС) ОМЧ может быть 10 (при 22 °С) и 100 (37 °С). СанПиН допускает ОМЧ как цифру 50.

Магистр должен продемонстрировать умение организовать проведения мониторинга качества и безопасности водных биологических ресурсов, среды их обитания и продуктов из них по микробиологическим показателям в соответствии со стратегией развития технологических процессов управления водными биоресурсами и объектами аквакультуры.

#### **4. Исследование микроорганизмов воздушной среды.**

Средой обитания человека и многих видов животных и растений является наземно-воздушная среда, находящаяся на поверхности земли и в нижних слоях атмосферы. Воздушная часть этой среды не является по сложившемуся мнению благоприятной для существования и развития микроорганизмов из-за недостатка в ней влаги и питательных веществ. Вместе с тем, по воздуху, с его потоками, на большие расстояния могут переноситься бактерии, споры грибов, вирусы, и роль этой среды в распространении возбудителей заболеваний человека, животных и растений значительно возрастает.

Санитарное состояние воздуха оценивается по ОМЧ – количество всех микроорганизмов, обнаруженных в 1 м<sup>3</sup> воздуха, и по наличию санитарно-показательных микроорганизмов (гемолитические стрептококки и золотистый стафилококк).

Обнаружение микроорганизмов воздуха проводится с использованием питательных сред, на которых бактерии растут и размножаются в виде колоний. Как правило, используют универсальную питательную среду – МПА (мясопептонный агар), на которой хорошо развиваются сапрофиты, попадающие в воздух из почвы или окружающей среды. Определение золотистого стафилококка проводится на молочно-солевой среде, а гемолитического стрептококка – на МПА с кровью. При наличии роста этого стрептококка вокруг колоний микроорганизмов образуется зона гемолиза (колония – это потомство, выросшее из одной микробной клетки, оказавшейся на питательной среде).

Основными методами, определяющими бактериальную обсемененность воздуха, являются: метод определения общей обсемененности воздуха по Коху (метод оседания), метод определения общей обсемененности воздуха аппаратом Кротова, метод мембранных фильтров, метод посева воздуха с помощью бактериоуловителя Речменского и с помощью прибора Импактор Флора 100.

Простым и информативным методом определения микробной обсемененности воздуха является метод оседания по Коху.

**Посев воздуха методом Коха** (или седиментационный метод) основан на способности микроорганизмов в силу тяжести и под влиянием движения воздуха вместе с частицами пыли и капельками аэрозоля оседать на поверхность питательной среды. Для посева чашку Петри с питательной средой открывают в помещении или на открытом пространстве на 5 мин. Затем чашки закрывают, подписывают и ставят в термостат на 48 ч для культивирования.

**Подсчет количества колоний по правилу Омелянского.** По правилу В.Л. Омелянского, за 5 мин. на поверхность чашки размером  $100 \text{ см}^2$  оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха.

Могут быть использованы чашки разного диаметра, поэтому необходимо провести пересчет площади чашек. Например, площадь стандартной чашки Петри  $78,5 \text{ см}^2$ . Предположим, что на ней обнаружено в результате посева 25 колоний (т. е. 25 бактерий). Необходимо подсчитать, сколько бактерий (X) осело бы на чашку площадью  $100 \text{ см}^2$ . Составим пропорцию:

$$\begin{aligned} 25 \text{ бак.} &- 78,5 \text{ см}^2 \\ X \text{ бак.} &- 100 \text{ см}^2 \\ X &= \frac{100 \cdot 25}{78,5} = 31 \text{ бакт.} \end{aligned}$$

Следовательно, 31 бактерия выросла бы на площади в  $100 \text{ см}^2$ , т.е. столько бактерий содержится в 10 л воздуха. Один кубический метр воздуха равен 1000 л, поэтому в нем будет содержаться  $31 \times 100 = 3100$  бактерий. Полученное количество бактерий в  $1 \text{ м}^3$  воздуха сравнивают с нормами для каждого типа помещений. Опыт проводят в четырех повторностях, определяют среднее и с нормой

сравнивается среднее количество бактерий.

Пользуясь этим методом чашки Петри можно размещать в различных помещениях на различных уровнях и определять учитывая среднее количество бактерий в 1 м<sup>3</sup> воздуха.

Кроме метода Коха, основанном на простом осаждении воздуха на поверхности питательной среды, можно для посева использовать различные приборы, дающие более точные данные (аппарат Кротова).

### **Метод определения общей микробной обсемененности воздуха аппаратом Кротова**

**Посев аппаратом Кротова** (аспирационный метод) основан на использовании ударного действия воздушной среды на питательную среду в чашках Петри. Прибор состоит из трех частей: для отбора воздуха, микроманометра и электрической части (рис.2). Сущность его действия заключается в том, что при работе электромотора вращается диск с поставленной на него чашкой Петри, центробежный вентилятор засасывает через клиновидную щель в крышке воздух, который ударяется о поверхность питательной среды, оставляя на ней микроорганизмы. За 1 мин прибор может засасывать от 25 до 50 л воздуха. В зависимости от предполагаемого содержания микроорганизмов в воздухе устанавливают ту или иную скорость его протекания. При обычных анализах пропускают 50 л воздуха за 2 мин, при большом загрязнении экспозицию сокращают до 1 мин, иначе на чашках будет слишком много колоний, и учесть их будет трудно.

#### **Подсчет количества колоний.**

Расчет ведут по формуле:

$$X \equiv \frac{a \cdot 1000}{V},$$

где  $a$  – количество выросших на чашке колоний;

$V$  – объем пропущенного через прибор воздуха, л;

1000 – искомый объем воздуха, л.

$X$  – количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> исследуемого воздуха.

Импактор «Флора-100», современная модель прибора для улавливания бактерий из воздуха, работает в автоматическом режиме и превосходит прибор Кротова по техническим характеристикам (3.5).

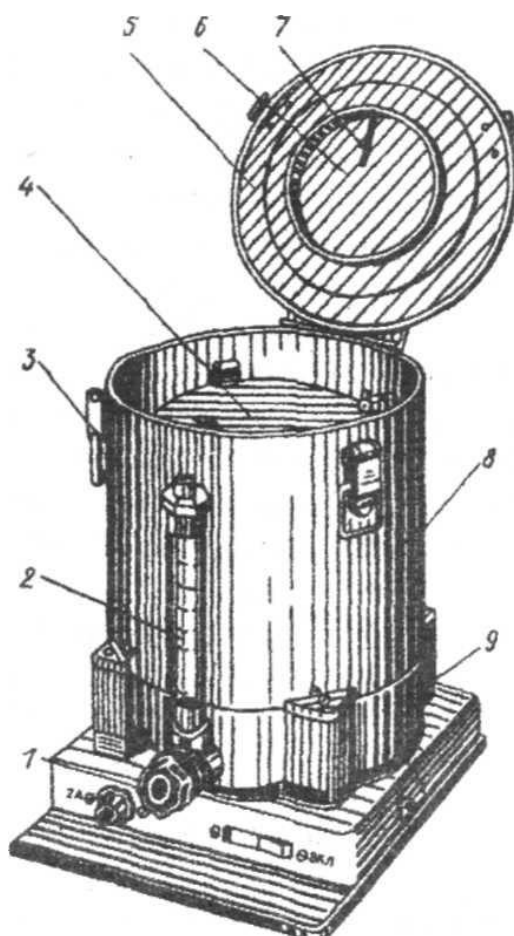


Рис. 2. Аппарат Кротова:

*1 – вентиль ротаметра; 2 – ротаметр; 3 – накидные замки;  
4 – вращающийся диск; 5 – крышка; 6 – диск; 7 – клиновидная щель;  
8 – корпус; 9 – основание*

### **Посев воздуха с помощью бактериоуловителя Речменского**

Бактериоуловитель Речменского (рис. 3.) состоит из стеклянного цилиндра с резервуаром, содержащим стерильную жидкость (физиологический раствор, бульон). При прохождении воздуха происходит образование аэрозоля и обсеменение жидкости микроорганизмами воздуха. Прибор работает по принципу пульверизатора. Скорость отбора проб воздуха 10-20 л/мин. По окончании работы жидкость из приемника забирают стерильной пипеткой (2 мл) и затем высей-

вают на питательные среды с последующим культивированием и подсчетом выросших колоний.

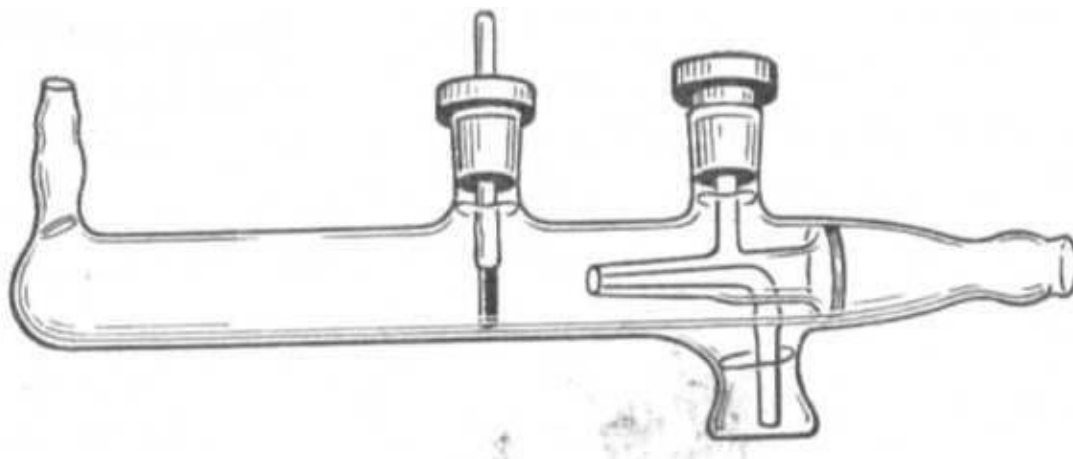


Рис. 3. Бактериоуловитель Речменского

### **Посев воздуха с использованием приборов, содержащих мембранные фильтры (Петрянова, «Микрофил» и др.)**

Мембранные фильтры обладают способностью задерживать все микроорганизмы воздуха, поэтому их устанавливают на пути воздушной струи в специальных приборах. Фильтры после контакта с воздухом прижимают к поверхности питательных сред в чашках Петри, и осевшие на них микроорганизмы переносятся в чашку с питательной средой. Культивируют в термостате и подсчитывают количество выросших колоний.

### **Импактор воздуха микробиологический Флора-100 (рис.4)**

Предназначен для контроля микробной обсемененности (бактериологического анализа) воздуха чистых помещений в медицине (операционных комнатах, родильных домах, станциях переливания крови), фармацевтической и пищевой промышленности, а также для проведения мониторинга службами санэпиднадзора. **Импактор Флора-100** в автоматическом режиме отбирает заданный объем воздуха (от 20 до 9999) литров со скоростью 200 л/мин и осаждает содержащиеся в нем микроорганизмы на чашку Петри (стеклянную или пластмассовую) с плотной питательной средой. После подрачивания определяют счетную концентрацию микроорганизмов (колониеобразующие единицы в кубическом метре

анализируемого воздуха, КОЕ м-3). Линейная скорость анализируемого воздуха автоматически поддерживается на уровне, позволяющем осаждать с 50% эффективностью частицы диаметром не, менее 1.4 мкм (D50). Вес прибора – не более 2.5 кг. Управление импактором (задание параметров отбора) осуществляется со стандартной десятикнопочной клавиатуры. Контроль параметров (заданный отбираемый объем воздуха, текущий отобранный объем), а также возможные неисправности индицируются на пятиразрядном световом индикаторе. Питание прибора осуществляется от сети 220 В, 50 Гц или от бортовой сети, или аккумуляторной батареи 27 – 12 В.

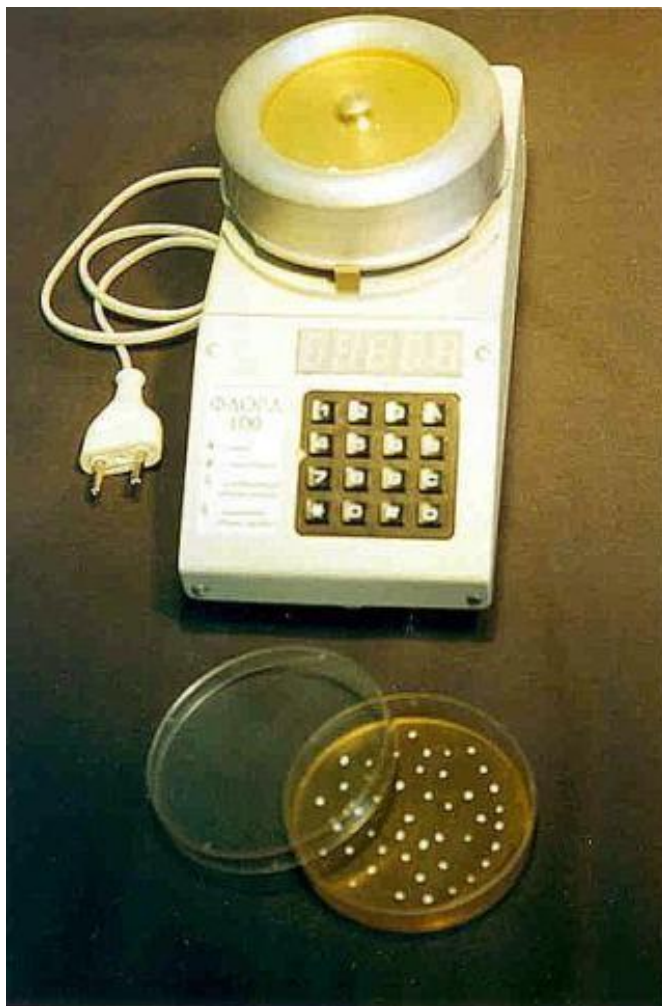


Рис. 4 Флора-100 импактор воздуха микробиологический (пробоотборник, пробоотборное устройство, аспиратор).



## Методика подсчета колоний на чашках Петри. Метод прямого подсчета

**Колонии** – это потомство, выросшее из одной микробной клетки, попавшей на питательную среду. Подсчитав количество колоний, мы определим, сколько было в воздухе микроорганизмов в момент его контакта с питательной средой (рис. 5).

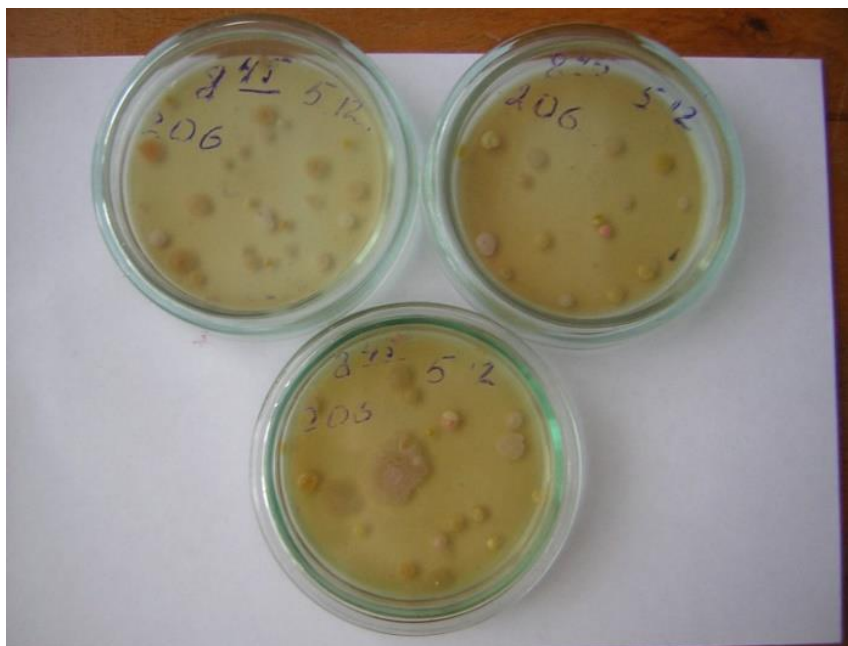


Рис.5. Колонии микроорганизмов воздуха, растущие на чашках Петри с МПА.

### *Вопросы для самопроверки*

1. Назовите основные методы общей микробиологии, необходимые для изучения морфологии и физиологии микроорганизмов.
2. Особенности методов изучения микроорганизмов почвы.
3. Питательные среды для изучения аммонификаторов почвы.
4. Определение биологической активности почвы.
5. Методы изучения микроорганизмов почвы, предложенные С.Н. Виноградским.
6. Определение коли-титра и коли-индекса воды.
7. Приборы для определения микроорганизмов воздуха.

## **РАЗДЕЛ 3. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫХ СРЕД ОБИТАНИЯ**

### **План**

1. Экология микроорганизмов воздуха.
2. Экология микроорганизмов воды.
3. Экология микроорганизмов почвы.
4. Экология микроорганизмов тела животных и человека.

Четвертый раздел программы курса – Экология микроорганизмов различных сред обитания.

Как известно, под термином экология подразумевается взаимодействие микроорганизмов между собой и со средой их обитания. При этом на микроорганизмы воздействуют многочисленные абиотические и биотические факторы, казалось бы, создающие невозможные условия для существования. Тем не менее, микроорганизмы вездесущи и живут в самых невероятных с нашей точки зрения условиях. Они населяют почву, воду пресных и соленых водоемов, воздушную среду, находятся на наружных покровах животных, человека, насекомых, растений, заселяют сообщающиеся с внешней средой полости нашего тела. В рубце у жвачных находятся необыкновенные по своим возможностям в расщеплении клетчатки анаэробные микроорганизмы.

### **1. Экология микроорганизмов воздуха.**

Рассмотрение экологии микроорганизмов начинается с микроорганизмов атмосферы (газообразной оболочки Земли, состоящей из тропосферы, стратосферы и ионосферы). На нижней границе стратосферы, на высоте 15-35 км, свободный кислород превращается в озон, образующий защитный экран планеты. Роль микроорганизмов в формировании газового состава атмосферы оказалась важной. Создание кислородной атмосферы произошло в результате дисбаланса между продукцией и деструкцией органического вещества. Атмосфера стала временной средой обитания микроорганизмов из-за лимитирующие

факторов этой среды. Способы попадания микроорганизмов в воздух могут быть самыми разными. Микробиота воздуха открытых пространств и микробиота воздуха закрытых помещений – это отличающиеся по видовому составу микроорганизмы. Оценка качества воздуха и его безопасности для человека возможна по микробиологическим показателям.

В помещениях, где находятся люди или животные, воздух является средой, в которую при дыхании выделяются микроорганизмы, обитающие в верхних дыхательных путях, и через воздух они передаются при разговоре, кашле, чихании от одного человека или животного всем, находящимся в этом помещении.

Существует термин – **воздушно-капельные инфекции**, подтверждающий значение воздуха в передаче инфекционных заболеваний. В воздухе животноводческих помещений можно обнаружить кишечную палочку, стафилококки, грибы, протей и другие микроорганизмы, что свидетельствует о возможности аэрогенного заражения животных патогенными микроорганизмами. Кроме того, из воздуха может произойти обсеменение молока, которое носит название постсекреторного обсеменения, что приведет к развитию **пороков молока** и его порче гнилостными бактериями, маслянокислыми бактериями, кишечной палочкой, плесневыми грибами, дрожжами. Попадание микроорганизмов в воздух связано с раздачей кормов, особенно силоса, уборкой навоза и проведения других работ в помещении.

На пищевых производствах воздух может стать причиной попадания в продукцию патогенных микроорганизмов при наличии больных людей среди персонала предприятия, а также причиной порчи продукции при плохом санитарном состоянии оборудования и рабочих поверхностей. Поэтому допускаться к работе могут только сотрудники, имеющие санитарные книжки, подтверждающие их здоровье и отсутствие бактерионосительства.

## **2. Экология микроорганизмов воды.**

Средой обитания для микроорганизмов внутренних водоемов являются

водная толща и иловые отложения. В водной массе преобладают планктонные формы и формы, прикрепляющиеся для поддержания клеток во взвешенном состоянии. Подвижные формы передвигаются с помощью жгутиков. Неподвижные виды или содержат газовые вакуоли, или имеют чрезвычайно малые размеры и ничтожную массу, препятствующие быстрому оседанию. Среди микрофлоры иловых отложений также имеются подвижные жгутиковые формы, однако для бентосных микроорганизмов характерна способность прикрепляться к субстрату или передвигаться скольжением. Особенно широко представлены скользящие формы на поверхности ила, имеющего контакт с кислородной зоной.

Как водная толща, так и иловые осадки стратифицированы по физико-химическим свойствам. Они содержат неодинаковое количество питательных субстратов и поэтому представляют собой чрезвычайно сложную динамическую систему, открывающую возможность для развития разнообразных видов микроорганизмов. Жизнь водоема – это непрерывная цепь превращения органических и минеральных веществ, как образующихся в самом водоеме, так и привносимых извне. Микроорганизмы обеспечивают цикличность круговорота всех главных элементов и осуществляют энергетическую взаимосвязь процессов, происходящих в разных экологических зонах единой экосистемы. Группы микроорганизмов в силу физиологических особенностей (типа обмена, специфичности используемого субстрата, конкурентных и метабологических взаимоотношений) занимают строго определенные экологические зоны. В водоеме можно найти почти всех представителей систематических и физиологических групп бактерий. Их можно подразделить на *аллохтонные*, поступающие извне, и на *автохтонные*, которые составляют собственную микробиоту экосистемы. Последние приспособлены к экологическим условиям конкретного водоема. В водоемах с экстремальными условиями среды обитания существуют высоко приспособленные экстремофильные, преимущественно прокариотные реликтовые сообщества микроорганизмов.

Разработка прямых методов исследования микробиоты водоемов в сравнении с методом посева на питательные среды показала громадный разрыв резуль-

татов при учете численности бактерий. Современные молекулярно-биологические методы диагностики природных сообществ подтверждают присутствие в морях и озерах большого количества пока не культивируемых форм микроорганизмов.

### **Характеристика водоемов как среды обитания микроорганизмов**

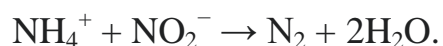
Микроорганизмы водоемов очень разнообразны, все зависит от вида водоема, почвы вокруг него и многих других разнообразных факторов. Особенности водных микроорганизмов. Значение микроорганизмов в первичной продукции водоемов и минерализации органических веществ. Основные физиологические группы микроорганизмов, участвующих в превращениях веществ в водоемах и круговорот биогенных элементов. Микробиоценозы пресных водоемов. Понятие об аутохтонных и аллохтонных микроорганизмах. Аутохтонная микробиота – совокупность микроорганизмов, постоянно живущих и размножающихся в воде. Микробный состав воды напоминает микробиоту почвы, с которой вода соприкасается (придонные и прибрежные почвы). В состав специфической водной микрофлоры входят *Micrococcus candicans*, *M. lutans* и другие. В составе специфической водной микробиоты и *M. roseus*, *Sarcina lutea*, *Bacterium aquatilis communis*, *Pseudomonas fluorescens*, различные виды *Proteus* и *Leptospira*. Среди анаэробов в незагрязненных в *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *Chromobacterium violaceum*, а также представители рода *Clostridium*. Аллохтонная микробиота – случайно попавшие в воду микроорганизмы, сохраняющиеся в ней лишь некоторое время. К ним относятся, например, возбудители кишечных инфекций (сальмонеллы, эшерихии, шигеллы, иерсинии, клебсиеллы и др.). Поэтому важна оценка санитарного состояния воды.

Одной из важных функций воды является ее способность к самоочищению, но самоочищающая способность воды намного ниже, чем у почвы и вследствие этого патогенные бактерии не только длительно сохраняются, но могут и размножаться в воде. Самоочищение водоемов обуславливается рядом факторов: скоростью течения воды, что ведет к падению концентрации органических ве-

ществ; доступностью для солнечного света, что приводит к бактерицидным эффектам; времени инсоляции, и другими.

В чистой воде преобладают кокки, в загрязненной – бактерии, в том числе споровые, и отмечается отсутствие или малое количество свободного кислорода. Для обеззараживания воды разработаны следующими методами: отстаивание с применением коагулянтов (сернокислый глинозем, сернокислая закись Fe) и активного ила; аэрация, хлорирование в аэротенках; биологическая очистка на полях орошения; высушивание и термическая обработка; воздействие  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – лучами.

В последние годы появились интересные исследования анаммокс-бактерий (*anaerobic ammonium oxidation* – анаэробное окисление аммония), открытых в 1999 г., которые участвуют в круговороте азота. В ходе анаммокса нитрит-ион и ион аммония превращаются непосредственно в молекулярный азот:



В масштабах планеты этот процесс даёт начало 30-50% молекулярного азота, образующегося в океанах. В ходе анаммокса утилизируются соединения фиксированного азота в усваиваемой растениями форме и переводятся в неусваиваемую молекулярную форму, поэтому этот процесс ограничивает первичную продуктивность океана. Эти бактерии относятся к типу планктомицетов (тип грамтрицательных бактерий, отличающихся уникальной клеточной структурой). Планктомицеты характеризуются наличием сложной системы замкнутых мембран. В частности, у некоторых представителей нуклеоид находится в ядерном тельце, окружённом двойной мембраной. Описано 5 родов бактерий: *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* (все пресноводные виды), а также *Scalindua* (морские представители). Для бактерий, осуществляющих анаммокс, характерно несколько черт: в их клетках всегда содержится единственная аннаммоксосома – окружённый мембраной компартмент, в котором и происходит процесс анаммокса. Кроме того, их мембраны содержат особые ладдерановые липиды, обнаруженные лишь у этих организмов. Особый интерес представляет образование гидразина как промежуточного соединения (это

вещество используется как ракетное топливо и ядовито для большинства организмов). Наконец, эти бактерии отличаются поразительно низкой скоростью роста: время удвоения численности составляет 7-22 дней. Они способны осуществлять превращения субстратов анаммокса даже при очень низкой их концентрации (менее микромолярных); они отличаются очень высоким сродством к аммонии и нитриту. Клетки, осуществляющие анаммокс, содержат очень много белков типа цитохрома с, которые составляют до 30 % всех клеточных белков. К их числу относятся и ферменты, осуществляющие ключевые катаболические реакции анаммокса; они придают клеткам характерный красный цвет. Изначально считалось, что анаммокс происходит только при температурах 20-43 °С, однако в недавнее время анаммокс был описан в горячих источниках при температурах 36-52 °С и в гидротермальных источниках вдоль Срединно-Атлантического хребта при температурах 60-85 °С.

Анаммокс-бактерии можно использовать – размножать в биореакторах и затем с их помощью очищать воду в реальных условиях очистных сооружений.

Большой интерес представляют «черные и белые курильщики» на дне океана, с которыми в воду поступает из недр Земли сокоминерализованная, разогретая до 350 °С вода. Наиболее глубокие курильщики из обнаруженных располагаются на глубине 5000 м в Каймановой впадине. Гидротермальные источники являются своеобразными «оазисами жизни» в глубинной афотической зоне океана, существующих не на основе фотосинтеза, а хемосинтезирующих бактерий. В 2016 году опубликованы исследования, согласно которым последний общий предок всех живых организмов (LUCA Last Common Universal Ancestor) мог быть жителем именно гидротермального источника, примерно 3,8 млрд лет назад.

В открытых водоёмах на неблагополучных по инфекционным болезням территориях, с которыми контактируют больные животные, обнаруживают возбудителей природно-очаговых инфекций. В донных отложениях прудов и озёр нередко обитают возбудители ботулизма, злокачественного отека, эмфизематозного карбункула. Патогенные микроорганизмы водоемов могут включаться в

пищевые цепи и по ним передаваться разным группам животных, птиц и рыб.

Нужно отметить, что огромное количество микроорганизмов мирового океана остаются пока не изученными и предстоит многое сделать, чтобы понять их роль в жизни планеты. Одноклеточные зеленые водоросли в фитопланктоне океанов составляют 60% всех органических веществ, образовавшихся на нашей планете путем фотосинтеза. Значение водорослей было огромным, когда жизнь на нашей планете только зарождалась. Именно эти низшие растения активно производили кислород и насыщали им атмосферу Земли. Условия существования микроорганизмов в сравнительно небольших озерах существенно отличаются от таковых в масштабных по площади и глубоководных морях и океанах. Поэтому микробиология озер, морей и океанов обычно рассматривается отдельно. Объектами исследования водных микробиологов являются также реки, подземные воды и термальные источники. Все эти водные экосистемы весьма специфичны и имеют различные микробные сообщества.

**Экология почвенных микроорганизмов.** Методы оценки биологической активности почвы.

Специфика почвы как среды обитания микроорганизмов состоит в том, что почвы могут иметь разный состав, влажность, pH, температуру, географическое положение. Поэтому рассматриваются и сравниваются как правило микроорганизмы одинаковых типов почв, а типов почв – достаточно большое количество; только в нашей стране это тундровые глеевые почвы, формирующиеся на равнинах Крайнего Севера России в зоне многолетней мерзлоты, подзолистые, дерново-подзолистые, мерзлотно-таежные, северные лесные, черноземы, каштановые, бурые почвы полупустынь. Микробиота почвы включает все известные группы микроорганизмов: споровые и споронеобразующие бактерии, актиномицеты, грибы, спирохеты, археи, цианобактерии, микоплазмы, вирусы, простейшие, микроскопические водоросли. В разных почвах отмечено присутствие цианобактерий родов *Gleocapsa*, *Nostoc*, *Phormidium*; разнообразных водорослей – зеленых – *Chlorella*, *Chlorhormidium*, *Chlamydomonas*; желтозеленых – *Pleurochloris* диатомовых – *Navicula*, *Pinnularia*, *Nitzschia*, *Hantzschia*, *Eunotia*. Среди



дрожжей отмечены представители следующих родов дрожжей: *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Candida*, *Trichosporon*, *Rodotorula*. Можно заметить наличие ложного мицелия у *Candida* sp.

Просматривая под микроскопом почву можно увидеть сумки со спорами у дрожжей родов *Lipomyces*, *Debaryomyces*, *Williopsis*., выявить капсулы у почвенных дрожжей *Lipomyces* или *Cryptococcus* методом негативного контрастирования.

Функции почвенных бактерий многообразны. Почвенные микроорганизмы играют важную роль в деструкции отмершей органики, в формировании плодородия почвы, а также в сохранении в почве патогенных микроорганизмов. По функциональным особенностям, видовому составу и биохимической активности микроорганизмы почвы можно разделить на следующие группы: связаны с азотным питанием растений, взаимодействуют с растениями в виде клубеньков, вызывают заболевания растений, получают энергию за счет химических реакций и т.д.

Наибольшее количество микроорганизмов встречается в хорошо удобряемых пахотных и влажных почвах, что непосредственно влияет на плодородие почвы.

Особенности почвенных микроорганизмов – расположение их по слоям, т.е. в зависимости от глубины залегания. В верхних слоях находятся устойчивые к высушиванию грибы и актиномицеты, а в нижних – споровые анаэробные бациллы.

### **3. Экология микроорганизмов почвы.**

**Микробиота зимогенная (аллохтонная) почв** (термин С.Н. Виноградского) – совокупность микроорганизмов, господствующих в почвах, в которые поступают свежие органические вещества. Популяции быстро развиваются, размножаются, их задача – минерализация органических веществ, а при использовании питательных веществ – отмирают.

**Микробиота автохтонная** представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в сообществе независимо от количества питательных веществ

в среде. Это так называемые К-стратеги – микроорганизмы, растущие с постоянной невысокой скоростью, независимой от концентрации питательных веществ.

В эту группу микроорганизмов входят олиготрофы, которые могут и не осуществлять минерализации гумуса. Микроорганизмы автохтонной микробиоты почвы – природное сообщество микроорганизмов неудобренной почвы. Количество организмов и их разнообразие определяются естественным содержанием в ней органического вещества.

Автохтонной микробиотой обычно называют все те почвенные микроорганизмы, которые проходят в почве полный цикл развития и встречаемость которых не зависит от поступления в почву питательных веществ. Это организмы, для которых почва представляет естественную среду для жизни и развития.

Таким образом, будет более подробно изучена роль микроорганизмов в почвообразовательных процессах и в плодородии почв, ее зимогенная и автохтонная микробиота, методы оценки биологической активности почвы.

### **Микробно-растительные взаимодействия. Влияние эпифитной и ризосферной микробиоты на рост растений.**

Микроорганизмы почвы непосредственно взаимодействуют с растениями, при этом наибольшее их количество находится в зоне корня. Рассматриваются взаимоотношения эпифитной и ризосферной микробиоты, а также фитопатогенов на рост растений.

Таким образом, изучая микроорганизмы различных сред обитания мы лучше понимаем место и роль микроорганизмов в биосфере, в биотических круговоротах веществ, обеспечивающих устойчивость биосферы.

## **4. Экология микроорганизмов тела животных и человека.**

В процессе эволюции между организмом теплокровных животных и микроорганизмами сложились взаимовыгодные (симбиотические) отношения. Микробы присутствуют на кожных покровах и слизистых оболочках, в верхних дыхательных путях, в ротовой полости, в мочеполовой системе, в желудочно-кишечном тракте. Все эти микробы представляют собой постоянную микробио-

ту животного, которая может несколько меняться в зависимости от условий жизни и кормления животных, а также от особенностей питания и существования человека, но в целом микробиота представлена определенными видами.

Рассмотрим микробиоту рубца жвачных, в котором находится около 3 кг микроорганизмов. Развитию микробов в рубце способствуют постоянная температура (37-39 °C), постоянная pH (5,8...7,3) за счет бесперебойного поступления буфера-слюны (около 70 л в сутки) и перемешивание корма. Образуется природный ферментер, в котором созданы все условия для развития микроорганизмов. Микроорганизмы продуцируют целлюлазу – фермент, расщепляющий основной компонент грубых кормов животных – целлюлозу, и без микробов усвоение целлюлозы было бы невозможно. Руминококки рубца и палочковидные формы сбраживают в анаэробной среде целлюлозу до янтарной, уксусной, молочной и муравьиной кислот. Эти органические кислоты всасываются в организм животного и служат основными предшественниками составных частей молока. В процессе брожения в рубце образуются до 700 л газа в сутки, состоящего из углерода, диоксида, метана, аммиака, сероводорода, азота, водорода, которые способствуют созданию анаэробных условий в рубце.

Микробы не только разрушают целлюлозу, но и сами размножаются. Образующаяся микробная масса в рубце затем переваривается и используется животными как дополнительный источник белка. Наличие микроорганизмов в рубце дает возможность скармливать жвачным животным мочевины (карбамид), так как микробы используют ее для построения своего белка, т.е. переводят азотистое соединение, недоступное животному, в белок, перевариваемый и усваиваемый животным.

Кишечник животных содержит большое количество микроорганизмов, составляющих до 40% сухого вещества толстого отдела и прямой кишки. В 1 г здесь находится до 3 млрд. микробных клеток. Постоянными обитателями толстого кишечника являются бифидобактерии (до 85%), молочнокислые палочки, энтерококки, кишечные палочки. Роль нормальной микробиоты для макроорганизма огромна – это синтез витаминов, аминокислот, всасываемых организмом

животного, антибиотиков, препятствующих развитию посторонней, патогенной микрофлоры, синтез ферментов, участвующих в пищеварительных процессах животного. Нормальная микрофлора выполняет также защитную функцию, так как формирует естественный иммунитет, резистентность животных. У безмикробных животных обычно недоразвита лимфоидная ткань, понижено содержание антител в крови, меньше масса внутренних органов, снижена сопротивляемость к инфекциям.

**Микробиота тела человека.** Значение и роль нормальной микробиоты, получившей сейчас название микробиом, для организма разнообразна. Прежде всего нормальная микробиота по сравнению с другими микробами, попадающими в кишечник, более конкурентоспособна. Последнее может быть обусловлено продукцией веществ, ингибирующих рост других видов (бактериоцины или колицины у кишечной палочки), созданием неблагоприятных значений pH, а также селективными преимуществами. Так, бифидо- и лактобактерии создают кислую среду, поскольку первые синтезируют аскорбиновую и молочную, а вторые – молочную кислоту. Давно известен выраженный антагонизм кишечных палочек и лактобактерий к шигеллам и сальмонеллам, бифидо- и лактобактерий к стафилококку, протее, клостридиям, энтеропатогенным эшерихиям.

Нормальная кишечная биота способствует формированию защитноадаптационных механизмов организма. Так, кишечная палочка индуцирует формирование нормальных антител, которые вступают во взаимодействие с возбудителями бактериальных кишечных инфекций, относящихся к семейству энтеробактерий.

В экспериментах отсутствие нормальной кишечной микробиоты у животных – гнотобионтов, приводит к недоразвитию ретикулоэндотелиальной системы, в особенности лимфатической ткани пищеварительного тракта (мезентеральных и илеоцекальных лимфатических узлов), что сопровождается нарушением формирования клеток, продуцирующих иммуноглобулины. У гнотобионтов обновление эпителия подвздошной кишки протекает в 2 раза медленнее.

Различные микроорганизмы кишечной микробиоты принимают участие в

метаболических превращениях ряда веществ, в частности холестерина, желчных кислот, билирубина, жирных кислот, витаминов. Так, холестерин превращающая активность была выявлена у кишечных палочек.

Первичные желчные кислоты (холевая и хенодезоксихолевая) трансформируются во вторичные (литохолевую, изолиитохолевую, дезоксихолевую) исключительно под влиянием микробов. Эти процессы протекают главным образом с участием анаэробов бактериодов. Из аэробной микрофлоры в них принимают участие только некоторые штаммы энтерококков и золотистого стафилококка. Поэтому при нарушенной микроэкологии обнаружить вторичные желчные кислоты в кале не удастся, что может служить косвенным доказательством дисбактериоза.

Кроме того, сами по себе желчные кислоты выступают в роли регулятора состава микрофлоры, оказывая выраженное в разной степени бактерицидное действие, особенно на бактериоиды.

В последнее десятилетие особое внимание было уделено изучению бифидобактерий, на основе которых создано множество пробиотических препаратов.

Бифидобактерии – грамположительные, строгие анаэробы, не образующие спор, имеют форму немного изогнутых палочек длиной 2-5 мкм, концы клеток бифидобактерий могут быть раздвоены, утончены или утолщены в виде шаровидных вздутий. Расположение клеток одиночное, парами, V-образное, иногда цепочками или розетками. Бифидобактерии в процессе жизнедеятельности вырабатывают ряд органических кислот. В основном, это органические кислоты (уксусная и молочная в молярном отношении 3:2), а также муравьиная и янтарная. Бифидобактерии синтезируют аминокислоты, витамины группы В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>9</sub>, В<sub>12</sub>), К, РР.

Несомненна положительная роль бифидобактерий для организма человека.

Род *Bifidobacterium* входит в семейство *Bifidobacteriaceae*, порядок *Bifidobacteriales*, класс *Actinobacteria*, тип *Actinobacteria*, домен *Бактерии*. Основные виды этого рода: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cu-*

*niculi*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. psychraerophilum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. simiae*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum*, *B. urinalis*.

Ранее отдельными видами считались также *B. infantis*, *B. suis*, *B. lactis*. По современной классификации *B. longum infantis*, *B. longum longum*, *B. longum suis* считаются подвидами вида *B. longum*, а *B. animalis animalis* и *B. animalis lactis* – подвидами вида *B. animalis*.



Большая часть бифидобактерий колонизирует толстую кишку, являясь ее основной пристеночной и просветной микробиотой. *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum longum* в общей сложности достигают  $10^8$ - $10^{11}$  колониеобразующих единиц на 1 г содержимого толстой кишки. Они образуют большинство кишечной микробиоты и обеспечивают колонизационную резистентность, ферментативную, антитоксическую, иммунную, метаболическую и другие функции толстой кишки. Непосредственно контактируя с клетками кишечника – энтероцитами, бифидобактерии (как и лактобактерии) стимулируют механизмы защиты организма человека, в том числе увеличение скорости регенерации слизистой оболочки, влияют на синтез антител к родственным, но обладающим патогенными свойствами микроорганизмам, активируют фагоцитоз, а также синтез лизоцима, интерферонов и цитокинов.

До момента рождения желудочно-кишечный тракт плода стерилен. Во время родов новорожденный колонизирует пищеварительный тракт через рот, проходя по родовым путям матери. Бактерии – кишечную палочку и стрептококки, можно обнаружить в пищеварительном тракте новорожденного через несколько часов после рождения. Различные штаммы бифидобактерий и бактероиды появляются в ЖКТ спустя 10 дней после рождения. Дети, рожденные путём

кесарева сечения, имеют значительно более низкое содержание бактерий, чем появившиеся естественным путем. Только у детей, находящихся на вскармливании материнским грудным молоком, в микробиоте кишечника преобладают бифидобактерии, с чем связан меньший риск развития инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

**Бактероиды (*Bacteroides*)** – род грамотрицательных анаэробных бактерий, наиболее типичные нормальные обитатели кишечника человека, составляющие около половины всей его микробиоты. Бактероиды неподвижны, полиморфны, часто имеют форму палочки с закругленными концами размером 1-3 на 0,5-0,8 мкм, строгие анаэробы. Род *Bacteroides* объединяет более 10 видов (*B. acidifaciens*, *B. biacutis*, *B. distasonis*, *B. gracilis*, *B. fragilis*, *B. oris*, *B. ovatus*, *B. putredinis*, *B. pyogenes*, *B. stercoris*, *B. suis*, *B. tectus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*). Виды, входящие в состав рода *Bacteroides*, по морфологическим и биохимическим признакам, продукции жирных кислот, способности поражать те или иные органы и ткани подразделяются на группы, например, *fragilis*, *melaninogenicus-oralis*, *asaccharolyticus*.

Клиническое значение имеют виды *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*. Их могут относить к условно-патогенным бактериям из-за наличия факторов патогенности в виде некоторых ферментов, способствующих проникновению бактериоидов в клетки кишечника, а также потому, что их изолируют при воспалительных процессах в кишечнике.

**Микробиом человека.** В настоящее время появилось понятие микробиом человека. Микробиом человека представляет собой совокупность всех микробов, населяющих организм человека, включая такие его участки как кожа, молочные железы, половые органы, легкие, слизистые оболочки, биологические жидкости, желчевыводящие пути и желудочно-кишечный тракт. Согласно современным представлениям, «микробиом» включает в себя единый микробно-тканевый комплекс, который образуют микроколонии бактерий, грибы, вирусы, простейшие и продуцируемые ими метаболиты, а также слизь (муцин), эпителиальные клетки слизистой оболочки и их гликокаликс, клетки стромы слизистой



оболочки (фибробласты, лейкоциты, нейроэндокринные клетки, клетки микроциркуляторного русла и прочее) (рис.6).

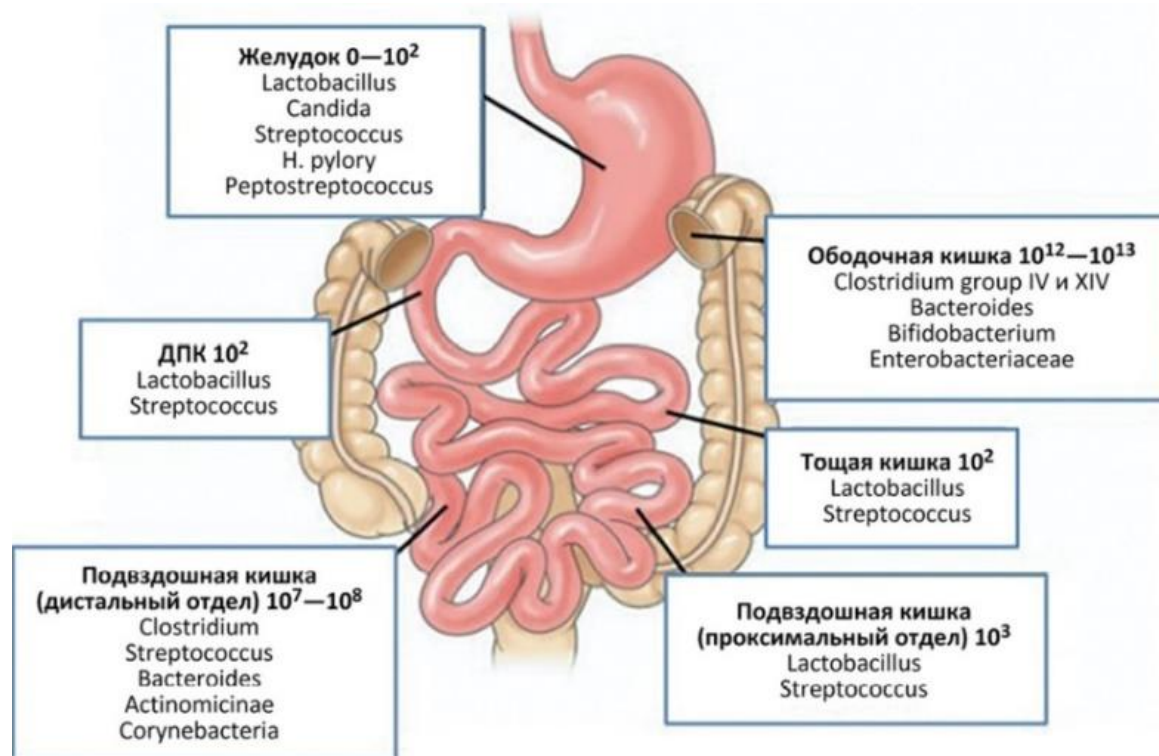


Рис. 6. Основные представители кишечной микробиоты

До последнего времени изучение состава и функциональной активности микробиоты человека было крайне ограничено в связи с невозможностью культивирования подавляющего большинства микроорганизмов на питательных средах. Однако развитие таких технологий, как секвенирование 16S рибосомальной РНК, а также полногеномное секвенирование позволило (в рамках двух проектов по изучению микробиома человека Human Microbiome Project и Metagenomics of Human Intestinal Tract) получить колоссальную по своим масштабам и значению информацию о составе и метаболической активности микробиоты. На сегодняшний день считается, что соотношение микробных клеток к клеткам человека составляет 1:1, а суммарное количество клеток в составе микробиоты человека равно  $10^{13}-10^{14}$ . Эти данные основаны на оценке общего количества бактериальных клеток в толстой кишке (примерно  $10^{13}$ ), в которой отмечена наивысшая плотность бактериальной колонизации.



Важным вопросом при изучении микробиома человека является геном микроорганизмов (в связи с их огромным разнообразием и принадлежностью к разным родам, видам и прочее), который содержит, по меньшей мере, в 50-100 (а по некоторым оценкам в 200) раз больше генов по сравнению с геномом организма-хозяина. Генетическое разнообразие, которое приносит в организм человека микробиота, обуславливает возникновение дополнительных ферментативных путей метаболизма, влияя на функционирование организма и на процессы адаптации.

Микробиом не только дополняет человеческий генный пул, но и демонстрирует значительно бóльшую пластичность и изменчивость по сравнению с человеческим геномом. Это означает, что состав микробиоты может быстро изменяться, реагируя на иммунную агрессию организма-хозяина, инфекции, новые компоненты пищевого рациона, прием антибиотиков, многие другие факторы. Способность микробиоты быстро приспосабливаться к изменяющимся условиям внешней среды путем изменения своего состава и ферментативной активности в свою очередь обеспечивает лучшую адаптацию человеческого организма к неблагоприятным факторам.

Сложно переоценить роль микробиоты в развитии и функционировании иммунной системы организма-хозяина. Существует точка зрения, известная как «гигиеническая теория». Она предполагает, что рост аллергических и аутоиммунных заболеваний, наблюдаемый в последние десятилетия во многих странах, можно объяснить нарушением формирования микробного разнообразия у современных детей как следствие улучшения гигиенических условий, чрезмерного использования дезинфицирующих средств и антибиотиков. Ограничение контакта с микроорганизмами в ранние периоды развития кишечника человека приводит впоследствии к неспособности организма поддерживать необходимый уровень иммунологической толерантности и развитию аллергических и аутоиммунных заболеваний.

У здорового человека 90% кишечных бактерий представлены двумя основными типами (*phyla*) – *Firmicutes* и *Bacteroidetes*.

### *Вопросы для самопроверки*

- 1. Назовите основных представителей микроорганизмов почвы разных типов (чернозема, почв пустыни, глинистых).*
- 2. Отличия микроорганизмов различных водоемов. Понятие автохтонная и аллохтонная микробиота.*
- 3. Микробиота воздуха и ее значение для человека и животных.*
- 4. Микроорганизмы рубца жвачных, их значение для животного и для окружающей среды.*
- 5. Микробиота кишечника человека, основные представители.*

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате освоения курса «Микробиота различных сред обитания» магистр будет обладать способностью применять базовые представления об основах общей, системной и прикладной экологии, принципы оптимального природопользования и охраны природы, мониторинга, оценки состояния природной среды и охраны живой природы. Своевременное вмешательство человека в спасение природы от антропогенного воздействия как нельзя более актуально в настоящее время.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Коростелева, Л.А. Основы экологии микроорганизмов: учебное пособие / Л.А. Коростелева, А.Г. Кощаев. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1400-0. – Текст электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/168485>
2. Экологическая микробиология: учебно-методическое пособие / М.И. Чернявская и др. – Минск: БГУ, 2016. – 63 с. – ISBN 978-985-566-268-7. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/180399>
3. Санитарная микробиология: учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.Х. Волков, А.К. Галиуллин, А.И. Ибрагимова. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 252 с. – ISBN 978-5-8114-1094-1. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/169095>
4. Ильяшенко, Н.Г. Микроорганизмы и окружающая среда: учеб. пособие / Н.Г. Ильяшенко, Л.Н. Шабурова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: ИНФРА-М, 2019. – 195 с. – ISBN 978-5-16-012636-4. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1031519>
5. Виноградский, С.Н. Летопись нашей жизни. – Москва: Макс Пресс, 2013. – 805 с. – ISBN 978-5-317-04500-5
6. ГОСТ Р 11952-2012. Устройства водоочистные. Общие требования к эффективности и методы ее определения: государственный стандарт Российской Федерации: введен впервые / Федеральное агентство по техническому регулированию. – Изд. официальное. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 24 с.
7. Заварзин, Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии: книга. – Москва: Наука. – 2003. – 348 с.
8. Ильяшенко, Н.Г. Микроорганизмы и окружающая среда: учебное пособие / Н.Г. Ильяшенко, Л.Н. Шабурова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: ИНФРА-М, 2017. – 195 с. (ЭБС Инфа-М).

9. Кайбышева, В.О. Микробиом человека: возрастные изменения и функции / В.О. Кайбышева, М.Е. Жарова, К.Ю. Филимендикова, Е.Л. Никонов // Доказательная гастроэнтерология. – 2020. – № 9(2). – С. 42-55.

10. Коростелёва, Л.А. Основы экологии микроорганизмов: учебное пособие / А.А. Коростелева, А.Г. Кощев. – Санкт-Петербург: Лань, 2013. – 239 с. – ISBN 978-5-8114-1400-0

11. Рассказы о великом бактериологе С.Н. Виноградском / сост.: Ю.А. Мазинг, Т.В. Андриюшкевич, Ю.П. Голиков; пер. С. Борисова под ред. Ю. А. Мазинга. – Санкт-Петербург: Росток, 2002. – 320 с. – (Фундаментальная наука). – ISBN 5-94668-008-0.

12. Шлегель, Г.Г. История микробиологии. – Москва: изд-во УРСС, 2002.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ОСНОВОПОЛОЖНИКИ МИКРОБИОЛОГИИ.....	5
1. Значение работ С.Н. Виноградского в области почвенной микро- биологии.....	5
2. Работы М. Бейеринка.....	11
3. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.....	12
РАЗДЕЛ 1. МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСФЕРА.....	16
1. Определение понятия биосфера по В.И. Вернадскому.....	16
2. Место и роль микроорганизмов в биосфере.....	17
РАЗДЕЛ 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКА- ЗАТЕЛЕЙ СОСТОЯНИЯ ПРИРОДНОЙ И АНТРОПОГЕННОЙ СРЕ- ДЫ.....	34
1. Методы общей микробиологии.....	34
2. Методы изучения почвенной микробиоты.....	35
3. Исследование микроорганизмов воды.....	39
4. Исследование микроорганизмов воздушной среды.....	44
РАЗДЕЛ 3. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫХ СРЕД ОБИТАНИЯ.....	51
1. Экология микроорганизмов воздуха.....	51
2. Экология микроорганизмов воды.....	52
3. Экология микроорганизмов почвы.....	58
4. Экология микроорганизмов тела животных и человека.....	59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	67
ЛИТЕРАТУРА.....	68

Составитель

Литвина Лидия Алексеевна

**Краткий обзор курса дисциплины**  
**Микробиота различных сред обитания**

**Учебное пособие**

Печатается в авторской редакции  
Оператор электронной верстки Н.Е. Карачева

Подписано в печать \_\_\_\_ г.  
Формат 60×84 1 /16. Объем \_\_\_\_ уч.-изд. л., 4,4 усл. печ. л.  
Тираж \_\_\_\_ экз. Изд.№ \_\_\_\_. Заказ № \_\_\_\_.

---

Отпечатано в Издательском центре «Золотой колос»  
630039, РФ, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, офис 106  
Тел. факс (383) 267-09-10. E-mail: 2134539@mail.ru