

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГБОУ ВО Иркутский государственный аграрный университет  
имени А.А. Ежевского

Кафедра Агроэкологии, агрохимии, физиологии и защиты растений

Клименко Н.Н.  
Кузнецова Е.Н.

# ***МИКРОБИОЛОГИЯ***

***УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ***  
***для лабораторных занятий***  
***студентов агрономического факультета***  
***направлений подготовки: 35.03.04 «Агрономия»,***  
***35.03.03 «Агрохимия и агропочвоведение»***  
***очной и заочной форм обучения***

Иркутск – 2018 г.

УДК 579(075.8)  
К 492

Печатается по решению научно-методического совета ФГБОУ ВО Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского, протокол № от 00.04.2018 г.

Учебное пособие для лабораторных занятий со студентами 2-го курса агрономического факультета направлений подготовки: 35.03.04 «Агрономия», 35.03.03 «Агрохимия и агропочвоведение» очной и заочной форм обучения.

Составители: Клименко Н.Н., Кузнецова Е.Н.

Иркутск: ФГБОУ ВО Иркутский ГАУ, 2018 г., 147 страниц

Учебное пособие содержит в сжатой форме разделы курса, а также методики для выполнения лабораторных работ по предмету «Микробиология» и «Почвенная микробиология». Подбор лабораторных работ соответствует требованиям учебной программы для направлений подготовки: 35.03.04 «Агрономия», 35.03.03 «Агрохимия и агропочвоведение» очной и заочной форм обучения.

Рекомендуется в качестве дополнительного материала при подготовке к текущей и промежуточной аттестации, проведении лабораторных занятий у студентов агрономического факультета направлений подготовки: 35.03.04 «Агрономия», 35.03.03 «Агрохимия и агропочвоведение» очной и заочной форм обучения.

Рецензенты:

Руководитель филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Иркутской области,  
д.с.-х. н А.В. Полномочнов

Доцент кафедры земледелия и растениеводства, к.б.н. Е.В. Бояркин

© ФГБОУ ВО Иркутский ГАУ, 2018 г.

## Содержание

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	5
<b>1. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ ЭКОЛОГИИ ЖИВЫХ СУЩЕСТВ .....</b>	8
Лабораторная работа №1 <i>Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории. Устройство микроскопа и техника микроскопирования.....</i>	13
<b>2. МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ..</b>	22
<b>2.1 Строение бактериальной клетки, ее формы и типы движения.....</b>	22
Лабораторная работа №2 <i>Техника приготовления живых культур микроорганизмов и фиксированных окрашенных препаратов</i>	29
<b>2.2 Общие представления о систематике микроорганизмов....</b>	32
<b>2.3.1 Характеристика царства VIRA.....</b>	34
<b>2.3.2 Характеристика царства PROCARYOTAE.....</b>	38
<b>2.3.3 Характеристика царства MYCOTA.....</b>	42
Лабораторная работа №3 <i>Питательные среды для микроорганизмов. Методы стерилизации. Подготовка посуды и питательных сред для стерилизации.....</i>	53
Лабораторная работа №4 <i>Определение численности микроорганизмов в почве и воздухе методом питательных пластин.....</i>	58
<b>3. ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ БРОЖЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, НЕ СОДЕРЖАЩИХ АЗОТА.....</b>	63
<b>3.1 Характеристика процесса брожения.....</b>	63
<b>3.1.1 Спиртовое брожение.....</b>	64
<b>3.1.2 Молочнокислое брожение.....</b>	66
<b>3.1.3 Пропионовокислое брожение.....</b>	66
<b>3.1.4 Маслянокислое брожение.....</b>	68
Лабораторная работа №5 <i>Спиртовое брожение.....</i>	71
Лабораторная работа №6 <i>Маслянокислое брожение углеводов....</i>	74
<b>3.2 Характеристика процесса дыхания</b>	76
<b>3.2.1 Характеристика процесса анаэробного дыхания</b>	79
<b>4. ИЗУЧЕНИЕ ПРЕВРАЩЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ ОРГАНИЧЕСКИХ И МИНЕРАЛЬНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ.....</b>	81
<b>4.1 Превращение соединений азота, серы и других элементов.....</b>	81

Лабораторная работа №7 Аммонификация мочевины.....	95
Лабораторная работа №8 Нитрификация.....	98
Лабораторная работа №9 Денитрификация.....	102
<b>5. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА.....</b>	<b>105</b>
<b>6. МИКРООРГАНИЗМЫ И АНТРОПОГЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....</b>	<b>122</b>
<i>6.1 Микрофлора почвы .....</i>	<i>122</i>
Лабораторная работа №10 Микробные земледобritельные препараты.....	127
<b>ВОПРОСЫ К КОЛЛОКВИУМАМ.....</b>	<b>137</b>
Колоквиум №1 «Морфология и систематика микроорганизмов».....	137
Колоквиум №2 «Влияние условий внешней среды на рост и развитие микроорганизмов.....	137
Колоквиум №3 «Питание микроорганизмов и превращение микроорганизмами соединений углерода.....	138
Колоквиум №4 «Превращение микроорганизмами соединений N, P, S, Fe, K».....	139
<b>Список рекомендуемой литературы.....</b>	<b>140</b>
<b>Список использованных источников .....</b>	<b>141</b>
<b>Глоссарий.....</b>	<b>145</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Микробиология – одна из ведущих естественных наук, определяющих фундамент знаний специалистов сельского хозяйства, и одна из составляющих дисциплин биотехнологии, приобретающей на современном уровне научно-практического прогресса все большее значение [16].

Знания в области микробиологии формируют мировоззрение специалистов сельского хозяйства и имеют большое значение для практической деятельности. В связи с этим возникает необходимость глубокого анализа характера микробиологических процессов, идущих в почвах, занятых сельскохозяйственными культурами, знания основных функций, присущих микроорганизмам, умения ориентироваться и оценивать возможные последствия антропогенного воздействия на характер микрофлоры и деятельность микроорганизмов с тем, чтобы правильно прогнозировать наиболее из них перспективные и наиболее успешно направлять процессы в желаемую сторону [6].

В процессе изучения микробиологии – науки о жизни мельчайших живых существ, населяющих биосферу земли студент знакомится со строением, функциями, распространением, размножением микроорганизмов в различных условиях среды и их использованием в интересах человека [15].

Микробиологи научились использовать широкие возможности клеток микроорганизмов и заставили их работать для получения микробного белка, незаменимых аминокислот, микробиологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, биостимуляторов и других продуктов [20].

Микроорганизмы широко распространены в природе, особенно их много в почве. Они повышают плодородие, структуру, накапливают необходимые для растений вещества. В современных условиях стало возможным искусственно обогащать почву некоторыми видами полезных микробов, внося с семенами бактериальные удобрения: ризоторфин, ризолигнин, азотобактерин и другие [9].

Современная наука разрабатывает целенаправленные приемы регулирования

микробиологических процессов, протекающих в почве, в частности предложены методы управления биологической нитрификацией, денитрификацией путем использования ингибиторов [11].

Почвенная микрофлора играет большую роль в ликвидации антропогенного воздействия на микробные ценозы почвы и ее биологическую активность. Разрушает и превращает в безвредные вещества химические поллютанты и не регулируемые органические отходы [11]

Широкое применение в биологической защите растений нашли микробиологические препараты, отличающиеся избирательностью действия, отсутствием фитотоксичности, безопасностью действия при использовании они не загрязняют окружающую среду. Это: бактериальные и вирусные препараты, энтомопатогенные грибы, антибиотики, родентициды [12].

Микроорганизмы служат удобной моделью для исследований явлений наследственности и изменчивости, так как обладают высокой скоростью роста и размножения и доступностью культивирования. В перспективе предстоит большая работа по селекции для создания высокопродуктивных штаммов микроорганизмов с привлечением методов генной инженерии [10].

Цель настоящего учебного пособия – ознакомить студентов с наиболее важными вопросами современной микробиологии, выработать у них научный подход к экспериментам в области сельскохозяйственной микробиологии, научить их сопоставлять процессы, идущие в лабораторных условиях, с процессами, идущими в природе, анализировать и творчески обсуждать собственные результаты исследований.

Учебное пособие по проведению лабораторно-практического курса по микробиологии написано в соответствии с требованиями учебной программы и предназначено для студентов агрономического факультета направлений подготовки: 35.03.04 «Агрономия», 35.03.03 «Агрехимия и агропочвоведение» очной и заочной форм обучения.

Пособие включает в себя как теоретическую часть, предназначенную для

закрепления полученных знаний, подготовки к семинарским занятиям и коллоквиумам, так и практическую часть. В практической части, предложены лабораторные работы, выполнение которых позволит сформировать у студентов общекультурные, общепрофессиональные и профессиональные компетенции. Сформированные компетенции позволят выпускникам обладать видами профессиональной деятельности, к которым готовится бакалавр.

## 1. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ ЭКОЛОГИИ ЖИВЫХ СУЩЕСТВ

Особенность и сложность изучения экологии микроорганизмов объясняется самой природой этих живых существ. Древнее происхождение, малые размеры, высокая скорость размножения, лабильность обменных процессов, горизонтальная передача генов наряду с вертикальной (как у других организмов), наличие защитных структур, высокое значение отношения поверхности клетки к ее объему и т. п. [1].

**Антоний ван Левенгук** (1632-1723) – голландский естествоиспытатель, конструктор первых микроскопов, описавший мельчайшие организмы – «анималькулы». С 1680 г. постоянный член английского Королевского общества, основоположник описательного периода развития микробиологии. Первое описание простейших и бактерий дано в «Письме о Protozoan» в 1676г. [38].

**Луи Пастер** (1822-1895) – французский ученый, основоположник физиологического периода развития микробиологии, открыл биологическую природу брожения, выделил возбудителей спиртового, молочнокислого, маслянокислого брожения, тем самым указав на роль микроорганизмов в превращении органических веществ в природе. Разработал вакцины для профилактики сибирской язвы, холеры кур, бешенства [38].

**Роберт Кох** (1843-1910) – немецкий врач-микробиолог, разработал плотные питательные среды и выделил чистые культуры возбудителей сибирской язвы, туберкулеза, холеры и других заболеваний, усовершенствовал методы микроскопического исследования микробов, установил причинно-следственную связь в возникновении инфекционных болезней, лауреат Нобелевской премии (1905) [38].

**Дмитрий Иосифович Ивановский** (1864-1920) – российский

ученый, открывший фильтрующиеся фитопатогенные вирусы, вызывающие мозаичную болезнь растений табака, основоположник вирусологии (1892). Много внимания уделял проблемам почвенной микробиологии: фиксации азота, распаду белков, клетчатки [38].

Понятие *вида* как совокупности микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по биологическим свойствам, является условным. Как правило, в биоценозе вид представлен *штаммом*, который в лабораторных условиях выделяется в виде *культуры*, выращенной на питательной среде. *Клон* – культура, полученная из одной клетки. Таким образом, *штамм* – культура одного и того же вида, выделенная из разных объектов и отличающаяся незначительными изменениями свойств от других штаммов. Например, разные штаммы одного и того же вида *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) могут отличаться степенью чувствительности к антибиотикам [21].

Кроме типового вида, встречаются популяции, отличающиеся от типичных видовых характеристик, например, антигенными свойствами (серовары), биохимическими признаками (биовары), отношением к фагам (фаговары), патогенностью (патовары) [21].

Высокой изменчивостью видовых характеристик отличаются наиболее примитивные формы жизни – вирусы, полностью зависимые в репродукционном процессе от хозяина, а значит, и его генетических маркеров, условий обитания, стратегии вирусного генома [21].

**Илья Ильич Мечников** (1845-1916) – русский зоолог, физиолог и микробиолог, разработал клеточную (фагоцитарную) теорию иммунитета, изучал вопросы антагонизма у микробов, основоположник отечественной геронтологии, лауреат Нобелевской премии в области физиологии и медицины за разработку фагоцитарной теории иммунитета (1908) [38].

**Александр Флеминг** (1881-1955) – английский врач, микробиолог, в 1924 г. открыл лизоцим – естественный фактор защиты человека и

животных от инфекций, в 1928 г. открыл первый антибиотик – пенициллин (продуцент – *Penicillium notatum*), лауреат Нобелевской премии 1945 г. в области физиологии и медицины за открытие пенициллина [38].

Экология микроорганизмов как синтетическая дисциплина предполагает изучение вопросов общей микробиологии, касающихся морфологии, физиологии, особенностей роста, питательных потребностей, условий обитания микроорганизмов, а также вопросов их распространения, биогеохимической деятельности, взаимодействия друг с другом и макроорганизмами, использования в хозяйственной деятельности человека. Эта дисциплина отличается от экологии растений и животных разнообразием биохимических процессов, осуществляемых микробами, непосредственным взаимодействием их с геосферой и первичностью микроорганизмов в истории нашей планеты. Прокариоты – первые обитатели Земли, и это обстоятельство объясняет то, что все живое на планете связано с невидимым миром микроорганизмов, с созданной ими за миллиарды лет до появления эукариот биосферой [22].

**Василий Леонидович Омелянский** (1867-1928) – российский ученый, изучавший почвенные микроорганизмы: нитрифицирующие, азотфиксирующие, пектино- и целлюлозоразрушающие, метанообразующие; инициатор изучения микробиологии в университетах, автор первых учебников и практикумов по почвенной микробиологии [38].

**Зинаида Виссарионовна Ермольева** (1898-1974) – российский академик, микробиолог, создатель науки об антибиотиках в СССР, под её руководством получен отечественный пенициллин – крустозин, выделены и внедрены в практику препараты лизоцима, интерферона, многие комбинированные препараты, в том числе пролонгированного действия.

У истоков развития экологии микроорганизмов стоят, прежде всего, исследователи почвенной микробиологии, поскольку почва, согласно высказыванию всемирно известного почвоведом В. В. Докучаева, является

матерью микроорганизмов. Основной вклад в изучение биоразнообразия микробного населения почвы внесли российская и голландская (дельфтская) школы микробиологов, разработавших нестандартные подходы к выделению разнообразных эколого-трофических групп микробов. Возглавляли эти школы С. Н. Виноградский и М. Бейеринк [38].

**Сергей Николаевич Виноградский (1856-1953)** – всемирно известный российский микробиолог, основоположник почвенной микробиологии, получивший образование в Киевском, Санкт-Петербургском, Страсбургском, Цюрихском университетах. Открыл явление хемосинтеза («минерального дыхания») сначала на примере серных (1887), затем – нитрифицирующих бактерий (1893), анаэробные фиксаторы молекулярного азота были названы в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*. Классифицировал почвенную микрофлору по эколого-трофическому принципу. Основной труд – «Микробиология почвы. Проблемы и методы» (1952). С. Н. Виноградский – член-корреспондент Российской академии наук и академий наук многих стран мира, долгое время возглавлял Агробактериологический отдел в институте Л. Пастера в Париже [38].

**Мартин Виллем Бейеринк (1851-1931)** – голландский микробиолог, основатель дельфтской школы бактериологов. М. Бейеринку принадлежит заслуга в выделении аэробных свободно живущих бактерий (род *Azotobacter*, 1902) и симбиотических азотфиксаторов (*Bacterium radicicola*, 1887), известных сейчас как клубеньковые бактерии. Им были разработаны обогатительные среды для выделения сульфатредукторов, денитрификаторов и светящихся бактерий, изучались различные процессы брожения. Выдвинутые этими учеными гипотезы о том, что «все есть всюду» и «среда отбирает», позволили разработать метод накопительных обогатительных культур и выделить из объектов окружающей среды микробные популяции с уникальными свойствами, тем самым расширив

представления биологов о механизмах превращения вещества и энергии в природе [38].

Исследователи в области медицинской, ветеринарной, технической, общей микробиологии, биологии почв и воды в разное время вносили свой вклад и в развитие экологии микроорганизмов. Традиции С. Н. Виноградского и М. Бейеринка были продолжены в нашей стране крупными учеными Е. Н. Мишустиным, Н. А. Красильниковым, Г. А. Заварзиным, Е. Н. Кондратьевой, Д. И. Никитиным, В. М. Горленко, М. В. Ивановым, сотрудниками кафедры биологии почв МГУ под руководством профессоров Д. Г. Звягинцева, И. Ю. Чернова, кафедры микробиологии под руководством профессоров Н. С. Егорова и А. И. Нетрусова, сотрудниками кафедры микробиологии Тимирязевской сельхозакадемии и других вузов и научно-исследовательских институтов.

**Николай Александрович Красильников (1896-1973)** – российский академик, основатель кафедры биологии почв МГУ им. М. В. Ломоносова, занимался проблемами систематики бактерий (Определитель бактерий и актиномицетов, 1949), разработал эволюционные принципы систематики актиномицетов [38].

**Евгений Николаевич Мишустин (1901-1991)** – российский академик, основоположник почвенной микробиологии в СССР, установил эколого-географические закономерности распространения микробов в почвах различных типов, внес вклад в изучение санитарной микробиологии почв, круговорота азотсодержащих соединений в почве [38].

**Георгий Александрович Заварзин (1933-2011)** – советский и российский микробиолог, профессор, доктор биологических наук, академик РАН. С 1991 г. был заведующим лабораторией и отделом микробных сообществ Института микробиологии РАН. Его научные интересы лежали в области функционального разнообразия бактерий и их геохимической роли. Им сформулированы основные концепции природоведческой

микробиологии, он имеет около 280 печатных научных работ, среди них 7 монографий [38].

**Дмитрий Григорьевич Звягинцев** (1932) – заведующий кафедрой биологии почв МГУ им. М. В. Ломоносова, заслуженный профессор, доктор биологических наук, академик РАЕН. Научные интересы Д. Г. Звягинцева лежат в области микробиологии, экологии и почвоведения, имеет около 400 печатных научных работ, среди них монографии и учебники [38].

**Сельман Ваксман** (1888-1973) – американский биохимик, микробиолог, изучал вопросы почвенной и водной микробиологии. В США в середине прошлого века С. Ваксман издал монографию «Почвенная микробиология» (1952), посвящена биологии и экологии бактерий и грибов. В соавторстве им открыты антибиотики: актиномицин, клавицин, стрептомицин, гризеин, неомицин и др. Лауреат Нобелевской премии (1952) [38].

## **Лабораторная работа №1**

***Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории.***

***Устройство микроскопа и техника микроскопирования.***

Микробиологическую лабораторию содержат в чистоте и ежедневно проводят ее дезинфекцию. Воздух в лаборатории дезинфицируют проветриванием (40-60 мин) и с помощью облучения ультрафиолетовыми лучами, источником которых являются бактерицидные лампы. В зависимости от степени загрязненности воздуха для стерилизации воздуха бактерицидные лампы включаются на 1-8 ч.

Все поверхности в микробиологической лаборатории (стены, мебель) обрабатывают растворами дезинфицирующих средств (водные растворы; формалина 0,5-3%; изопропилового/этилового спирта 70%; фенола 3-5%).

Тщательно дезинфицируют поверхность стола, на котором проводится

работа с микроорганизмами. Его обрабатывают непосредственно перед началом работы, и после ее окончания.

В лабораторию запрещается входить в верхней одежде и класть на рабочие столы посторонние предметы (сумки, портфели и т.п.), кроме тетради и карандаша. Студент допускается к работе только при наличии халата; волосы должны быть подобраны.

Запрещается выходить в халате за пределы лаборатории, надевать на халат верхнюю одежду. В лаборатории запрещаются курение, прием пищи, хождение по лаборатории, резкие движения, громкие и посторонние разговоры (особенно во время посева микроорганизмов).

Каждый студент работает в микробиологической лаборатории на постоянном рабочем месте, выполняя задания **индивидуально**. За ним закрепляется постоянное оборудование, за которое он несет ответственность. Рабочее место студента во время занятий должно содержаться в полном порядке.

При работе с культурами микроорганизмов необходимо соблюдать все правила микробиологической техники:

1. на используемую посуду (пробирки, колбы, чашки Петри) перед посевом нужно нанести перманентным маркером надпись, содержащую родовое и видовое название культуры, дату посева, фамилию студента и номер группы;

2. при работе с культурами микроорганизмов, особенно с грибами, нельзя допускать попадания клеток и спор микроорганизмов в воздух, для предотвращения образования микробного аэрозоля;

3. все предметы, контактировавшие с культурами микроорганизмов, после использования должны быть немедленно обеззаражены: *петли, иглы, пинцеты* обжигают в пламени спиртовки; *предметные и покровные стекла, пипетки, шпатели, стеклянные палочки* погружают в дезинфицирующий раствор. **Класть на стол перечисленные предметы категорически**

запрещается!

4. в случае попадания исследуемого материала или культуры микроорганизмов на кожу, стол, одежду, обувь необходимо немедленно сообщить об этом преподавателю и под его руководством провести дезинфекцию.

Запрещается тушить спиртовку или загоревшие пробирки, дую на них. Спиртовки тушат специальными колпачками, загоревшиеся пробирки помещают в пробирки или колбы для прекращения доступа воздуха к огню. Также запрещается поджигать спиртовку от спиртовки, лишь спичками или зажигалкой.

Необходимо соблюдать все правила безопасности при работе с химическими реактивами и красителями.

Ни в коем случае в отсутствие и без ведома преподавателя не включать, не выключать электроприборы и аппаратуру.

В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место. После микроскопии вытереть масло с объектива микроскопа, поднять тубусодержатель микроскопа, надеть на микроскоп защитный чехол. По указанию преподавателя засеянные на занятии пробирки, колбы или чашки Петри помещаются в термостат. Отработанная посуда сдается для дальнейшего обеззараживания. Руки следует обработать дезинфицирующим раствором и тщательно вымыть с мылом.

На каждое занятие назначаются дежурные. Во время занятий они следят за выполнением студентами правил работы и поведения в лаборатории. По окончании занятий дежурные принимают у студентов рабочее место в исходном состоянии.

Каждый студент ведет журнал лабораторных работ. Отчет по лабораторной работе должен содержать следующее: название работы, дата ее постановки и окончания, цели и объекты исследования, условия проведения опыта, включая методы анализов, полученные результаты,

наблюдения и выводы.

Полученные цифровые данные оформляются в виде таблиц, графиков, диаграмм. Данные, полученные при микроскопировании, состоят из: названия культуры (род и вид латыни); увеличения микроскопа; зарисовки объекта микроскопирования карандашом (простым или цветным), на каждом рисунке обозначаются отдельные его части, при окраске объекта указывается цвет [9, 20, 35].

### ***Устройство микроскопа***

Изучение клеток микроорганизмов невидимых невооруженным глазом возможно только при помощи микроскопов. Эти приборы позволяют получать увеличение изображения исследуемых объектов в сотни раз (световые микроскопы), и десятки и сотни тысяч раз (электронные микроскопы).

При помощи световых микроскопов изучают морфологию клеток микроорганизмов, их рост и развитие, ведут наблюдение за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах.

С помощью электронного микроскопа исследуют субмикроскопическое строение клеток микроорганизмов, выявляют формы мельчайших микроорганизмов, ведут их учет.

Микроскоп состоит из двух частей: **механической и оптической**.  
Общий вид микроскопа представлен на рисунке 1.

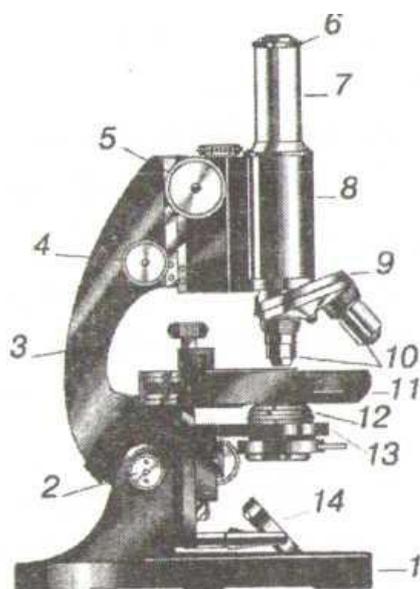
**К механической части** относятся штатив, предметный столик, тубус.

*Штатив* имеет основание в виде подошвы (1) и *тубусодержатель* (3) в форме дуги.

*Предметный столик* (11) имеет в центре отверстие для прохождения лучей света. На поверхности столика имеются две клеммы, зажимающие препарат. Столик может перемещаться в горизонтальной плоскости при

помощи винтов, находящихся справа и слева, что позволяет последовательно рассмотреть весь препарат.

В верхней части тубусодержателя находится гнездо для крепления наклонного тубуса (моно- или бинокулярного) и вращающийся вокруг своей оси *револьвер* (9). В верхнюю часть тубуса вставляют сменные *окуляры* (6); сам тубус можно повернуть вокруг вертикальной оси и закрепить винтом. Револьвер имеет внизу отверстия, в которые ввинчиваются *объективы* (10). Вращением револьвера по часовой стрелке объективы устанавливаются на фокус.



1 - штативная подставка; 2 - шарнир для наклона; 3 тубусодержатель; 4 - ручка микрометрической регулировки; 5 - ручка грубой регулировки; 6 - окуляр; 7 - держатель окуляра; 8 - тубус; 9 - револьверная головка; 10 - объективы; 11 - предметный столик; 12 - конденсор; 13 - нижний держатель; 14 - зеркало.

Рисунок 1 – Микроскоп с одним окуляром и двумя сменными объективами на револьверной головке [9]

Вся верхняя часть штатива – тубусодержатель, вместе с тубусом и револьвером – может передвигаться по вертикали на 50 мм с помощью

механизма, смонтированного в основании штатива. Этот механизм приводят в действие вращением *макровинта* (5) и *микровинта* (4). При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель опускается, против часовой стрелки – поднимается. Макровинт служит для грубой, предварительной фокусировки исследуемого объекта, микровинт – для тонкой, более четкой установки на фокус (при использовании объективов 40х, 90х). Один оборот микровинта соответствует перемещению тубуса на 0,1 мм (100 мкм).

**Оптическая часть** включает осветительный аппарат, объектив, окуляр.

*Осветительный аппарат* предназначен для наилучшего освещения препарата. В него входят *зеркало* (14) и *конденсор* (12). Зеркало укреплено у основания штатива, оно направляет световые лучи через конденсор в объектив микроскопа. Зеркало подвижно и имеет две стороны: плоскую и вогнутую. При работе с конденсором и при дневном освещении пользуются плоской стороной зеркала, при работе без конденсора и при слабом освещении пользуются вогнутой стороной.

Конденсор состоит из нескольких линз, он собирает параллельные лучи от зеркала или другого источника света в одной точке – фокусе. Конденсор вместе с оправой может перемещаться вертикально на 20 мм специальной рукояткой. Чем ниже опускается конденсор, тем слабее освещение аппарата, и наоборот. Обычно конденсор опускают вниз при работе с неокрашенными препаратами (сухие объективы), и поднимают вверх до упора при работе с окрашенными препаратами (иммерсионные объективы).

В конденсор вмонтирована *ирисовая диафрагма*, позволяющая регулировать количество лучей света. При малом увеличении (объектив 8х) диафрагма должна быть практически закрытой. При ярком освещении диафрагму также прикрывают. При больших увеличениях ее открывают,

пока не получится четкое изображение объекта. Под конденсором находится откидная оправа для светофильтра.

*Объектив* (10) дает действительное увеличенное и обратное изображение изучаемого объекта. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Увеличивает объект наружная - фронтальная - линза. Другие линзы называются коррекционными и служат для устранения оптических недостатков изображения. Увеличение объектива всегда обозначено на его оправе. Микроскоп МИКМЕД-1 имеет объективы, увеличивающие в 4, 9, 10, 20, 40 (сухие) и в 60, 90, 100 (погружные или иммерсионные) раз.

Когда препарат изучается с помощью сухих объективов («сухие системы»), то часть световых лучей сильно отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. Такое отклонение происходит вследствие разницы показателя преломления стекла (1,52) и воздуха (1). При использовании иммерсионных объективов обязательно погружение фронтальной линзы в однородную жидкую среду. В данном случае не происходит изменения направления лучей: показатель преломления воды - 1,3; глицерина - 1,4; кедрового масла - 1,51. Таким образом, использование иммерсионных систем позволяет более точно рассмотреть изучаемый объект [9, 35].

### *Техника микроскопирования*

Перед началом работы на предметный столик поместить препарат и закрепить его клеммами. Установить объектив 8х: легкий упор и щелчок пружины свидетельствуют о том, что объектив установлен по оптической оси. **Наблюдая сбоку(!)**, макровинтом опустить объектив на расстояние 0,5 см от препарата.

Конденсор микроскопа поднять вверх до упора и полностью закрыть

его диафрагму. Используя плоскую сторону зеркала, повернуть его и направить лучи от источника света на объектив, чтобы в поле зрения микроскопа появилось светлое пятно.

Далее добиться получения изображения светлого пятна с четко очерченными краями. Этого достигают, слегка опуская конденсор и приоткрыв ирисовую диафрагму (в случае неокрашенных препаратов); или полностью открыв диафрагму конденсора, при этом конденсор постоянно находится наверху (в случае окрашенных препаратов).

Яркость регулировать либо изменением степени накала лампы осветителя, либо применением светофильтра. **Никогда не следует использовать конденсор и его диафрагму для регулирования яркости изображения, так как это изменяет разрешающую способность микроскопа!**

Глядя в окуляр, очень медленно поднять тубус макровинтом до появления контуров изображения. Четкости изображения добиваются с помощью микровинта. **При этом не следует делать полных оборотов микровинта!**

Подходящий для исследования участок препарата установить в центре поля зрения, передвигая предметный столик боковыми винтами. Поднять тубус и вращением револьвера поставить объектив с увеличением 40х. Далее порядок работы тот же.

При работе с иммерсионными объективами на покровное стекло, лежащее на препарате (фиксированном и окрашенном) нанести небольшую капельку иммерсионного масла (не убирая препарат с предметного столика). Глядя сбоку, макровинтом опустить тубус: объектив должен погрузиться в масло, но не должен касаться стекла препарата. **Опускать объектив нужно очень осторожно, чтобы не повредить фронтальную линзу!** Глядя в окуляр, очень медленно поднять тубус макровинтом до появления контуров изображения. Четкости изображения добиваться с

помощью микровинта.

По окончании работы с иммерсией поднять тубус, снять препарат и осторожно протереть фронтальную линзу объектива сухой фланелевой салфеткой. **Оставлять масло на объективе недопустимо!** Масло засыхает и приводит к накоплению пыли, к повреждению оптики микроскопа.

При микроскопировании нужно держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно, так как глаза при этом меньше утомляются. По окончании микроскопирования следует поднять тубус, убрать с предметного столика препарат, опустить конденсор, надеть на микроскоп футляр.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

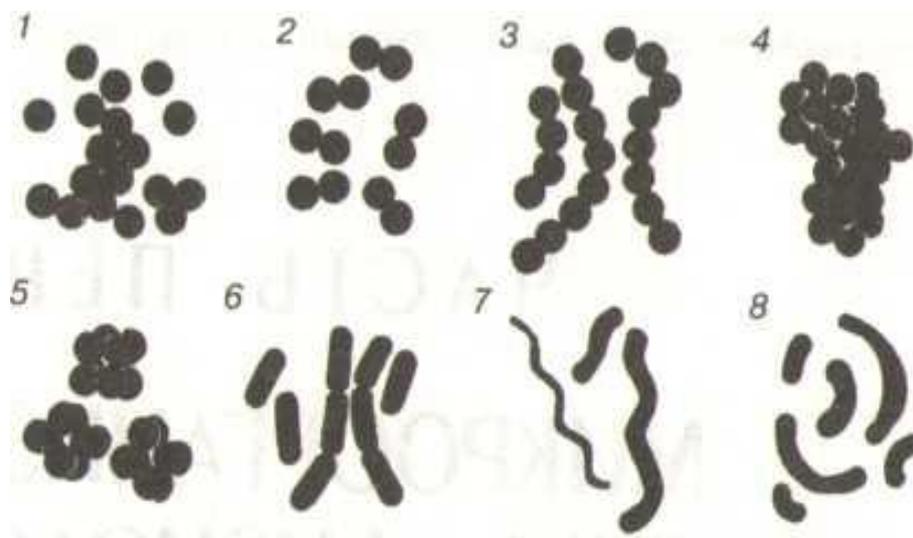
1. Правила и техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории?
2. Из каких частей состоит микроскоп?
3. Какие элементы входят в оптическую часть микроскопа?
4. Окуляр и его увеличение?
5. Объектив. Какие увеличения имеет объектив микроскопа?
6. Объективы сухие и иммерсионные?
7. Для чего используют кедровое (иммерсионное масло) при работе с иммерсионным объективом?
8. Какое увеличение имеет иммерсионный объектив?
9. Как определяется общее увеличение микроскопа?
10. Разрешающая способность микроскопа. От каких частей микроскопа она зависит (окуляра, объектива или конденсора)?
11. Конденсор, его назначение?
12. У каких частей микроскопа выше разрешающая способность (иммерсионных или сухих)?

13. Техника микроскопирования?
14. Роль отечественных и зарубежных ученых в развитии микробиологии и экологии микроорганизмов?

## МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

### *Строение бактериальной клетки, ее формы и типы движения*

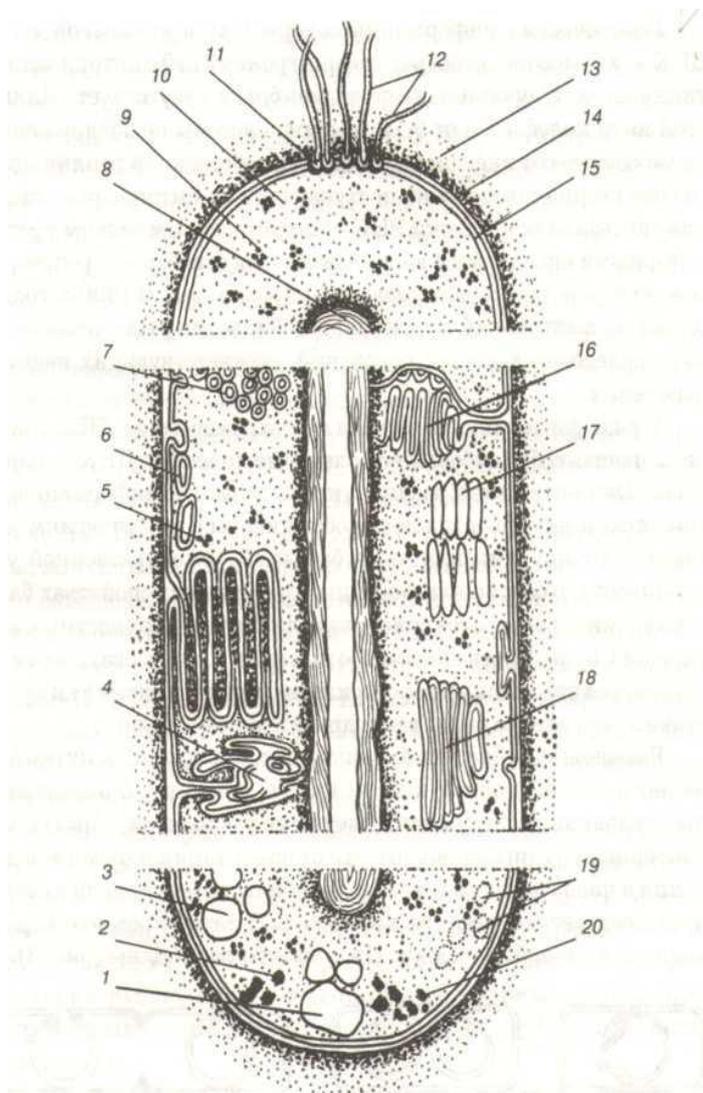
Клетки прокариот (бактерий) намного меньше эукариотических. Многие из них имеют палочковидную форму, кроме этого встречаются шаровидные, извитые формы, а также описанные почвенными микробиологами стебельковые, почкующиеся бактерии, имеющие звездчатую и другие причудливые формы (рис. 2). Диаметр клеток бактерий может составлять 0,2-1,5 мкм, длина – 0,5-10 мкм у палочковидных и до 500 мкм – у спиралевидных.



1 – микрококки; 2 – диплококки; 3 – стрептококки; 4 – стафилококки; 5 – сарцины; 6 – палочковидные бактерии; 7 – спириллы; 8 – вибрионы.

Рисунок 2 – Формы, одноклеточных бактерий [39]

Компартментизация (дифференциация) бактериальной клетки менее выражена по сравнению с эукариотической клеткой (рис. 3). В клетке бактерий отсутствуют такие автономные структуры, как ядро, митохондрии, хлоропласты.



1 – гранулы поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты; 2 – жировые капли; 3 – включения серы; 4 – трубчатые тилакоиды; 5 – пластинчатые тилакоиды; 6 – пузырьки; 7 – хромато-форы; 8 – нуклеоид; 9 – рибосомы; 10 – цитоплазма; 11 – базальное тельце; 12 – жгутики; 13 – капсула; 14 – клеточная стенка; 15 – цитоплазматическая мембрана; 16 – мезосома; 17 – газовые вакуоли; 18 – ламеллярные структуры; 19 – полисахариды; 20 – гранулы полифосфата.

Рисунок 3 – Строение бактериальной клетки [1]

Генетическая информация содержится в кольцевой нити ДНК – хромосоме, непосредственно граничащей с цитоплазмой, типичная для эукариот ядерная мембрана отсутствует. Длина этой нити колеблется от 0,25 до 3 мм. Гистоны не обнаружены, хромосома несет информацию как для собственной репликации за счет предшественников, поступающих из цитоплазмы, так и для синтеза белков клетки РНК – полимеразным белком с регуляторными сигналами в виде белков – активаторов и репрессоров, которые также поступают из цитоплазмы. В 1990-х годах одним из достижений молекулярной биологии было установление последовательностей оснований, соответствующих некоторым генам [27].

У ряда бактерий обнаружена и внехромосомная ДНК, представляющая собой небольшие кольцевые молекулы ДНК – плазмиды. Они могут нести различную генетическую информацию, в том числе о способности клетки обмениваться генетическим материалом с другими клетками бактерий, о лекарственной устойчивости, о бактериоциногении, о патогенных свойствах бактерий (синтез энтеротоксинов, гемолизина, поверхностных антигенов) и др. Часть плазмид относится к конъюгативным и передается от клеток-доноров к клеткам-реципиентам как представителям одного вида, так и других видов и родов [1].

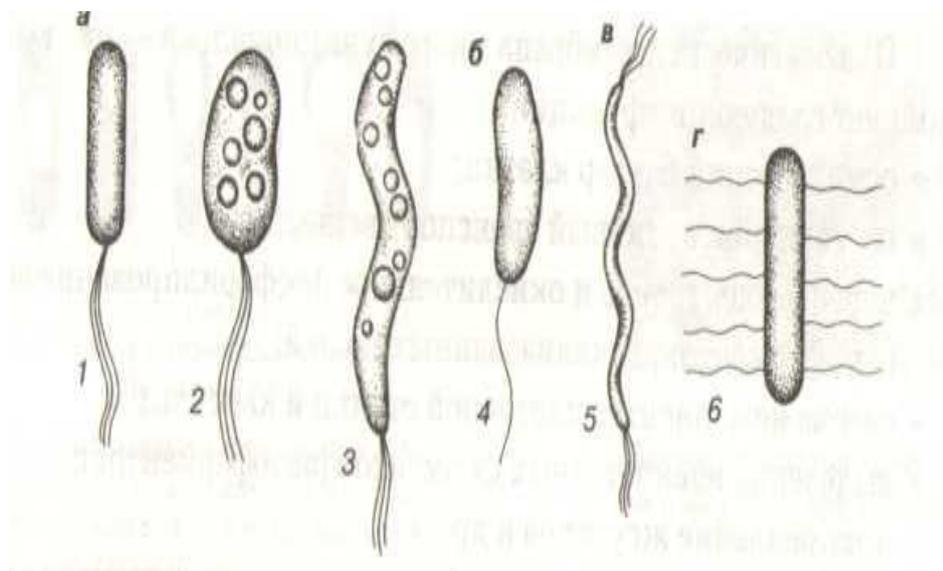
Размножение бактерий происходит, как правило, путем бинарного деления одной клетки на две дочерние. В определенных условиях после деления клетки не расходятся, образуя характерные группы в зависимости от ориентации плоскостей деления и числа делений (рис. 2). Делению бактериальной клетки предшествует репликация хромосомы, а затем хромосомы расходятся в дочерние клетки. Прокариоты гаплоидны [26].

Большинство клеток бактерий покрыты клеточной стенкой, представленной пептидогликаном, или муреином, – гетерополимером, состоящим из белковых и углеводных компонентов и характерным только

для прокариот. Снаружи от клеточной стенки некоторые организмы покрыты капсулой.

Передвижение бактерий обеспечивают специальные структуры – жгутики, состоящие из фибриллярных белков.

Клетки, имеющие один жгутик и монополярное жгутикование, называют *монотрихами*, несколько жгутиков на одном полюсе – *лофотрихами*, имеющие биполярное жгутикование – *амфотрихами* и имеющие жгутики по бокам или всей поверхности – *перитрихами* (см. рис. 4). Пучок жгутиков сбоку клетки расположен *латерально*. Жгутики различают по своей толщине (12-18 нм), длине (до 20 мкм), амплитуде витка. Вращаясь, жгутики проталкивают клетку в жидкой среде. У спирохет они совершают до 3000 оборотов в минуту, а скорость движения холерного вибриона достигает 12 мм/мин (см. рис. 5).



а – монополярное политрихальное; б – монополярное монотрихальное; в – биполярное политрихальное; г – перитрихальное.  
1 – *Pseudomonas* 2 – *Chromatium*; 3 – *Thiopyrillum*; 4 – *Vibrio*, 5 – *Spirillum*; 6 – *Prjteus*.

Рисунок 4 – Основные типы жгутикования у различных родов микроорганизмов [39]

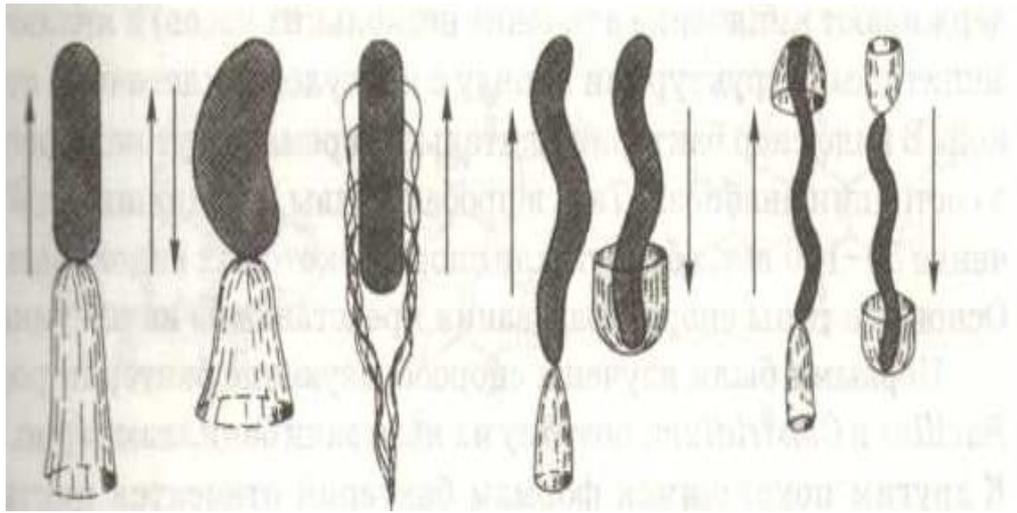


Рисунок 5 – Основные типы движения бактерий [21]

Кроме жгутиков, на поверхности клеток могут встречаться тонкие (3-25 нм), длинные (до 12 мкм) нити – фимбрии и пили, выполняющие различные функции, в том числе адсорбции клеток на субстратах, передачи генетической информации при конъюгации клеток (F-пили) и др.

Основные морфологические группы бактерий – шаровидные, палочковидные, извитые – представлены на рисунке 2. Кроме того, как говорилось ранее, существуют и другие формы бактерий, например, неправильную изменчивую форму клеток или булавовидную имеют коринеформные бактерии, а у микобактерий наблюдается тенденция к ветвлению клеток, ярко выраженная у стрептомицетов и некоторых других родов актиномицетов [28].

Рибосомы бактерий, как и других организмов, служат местом синтеза клеточного белка. Они несколько меньше рибосом эукариот. Это имеет решающее значение при использовании антибиотиков в борьбе с инфекциями, вызванными бактериями. Их рибосомы под влиянием антибиотиков прекращают нормально функционировать, в то время как рибосомы организма хозяина полноценно выполняют свою функцию.

В связи с отсутствием автономных органелл, в клетке прокариот

плазматические мембраны формируют ряд структур, которые выполняют, например, функции митохондрий (мезосомы) или хлоропластов (тилакоиды).

Образование подобных структур в виде складчатых стопок, трубок, пузырьков происходит в процессе выпячивания внешней мембраны в цитоплазму клетки.

Плазматическая мембрана прокариот по своему строению сходна с таковой эукариот и состоит из двойного липидного слоя, включающего и фосфолипиды, в который встроены интегральные белки. Периферийные белки прикреплены к поверхности мембраны [10].

Плазматическая мембрана многофункциональна – она выполняет следующие функции:

- осмотический барьер клетки;
- пассивный и активный транспорт веществ;
- перенос электронов и окислительное фосфорилирование за счет ферментов, локализованных на ней;
- синтез компонентов клеточной стенки и капсулы;
- выделение внеклеточных ферментов (экзоферментов);
- прикрепление жгутиков и др.

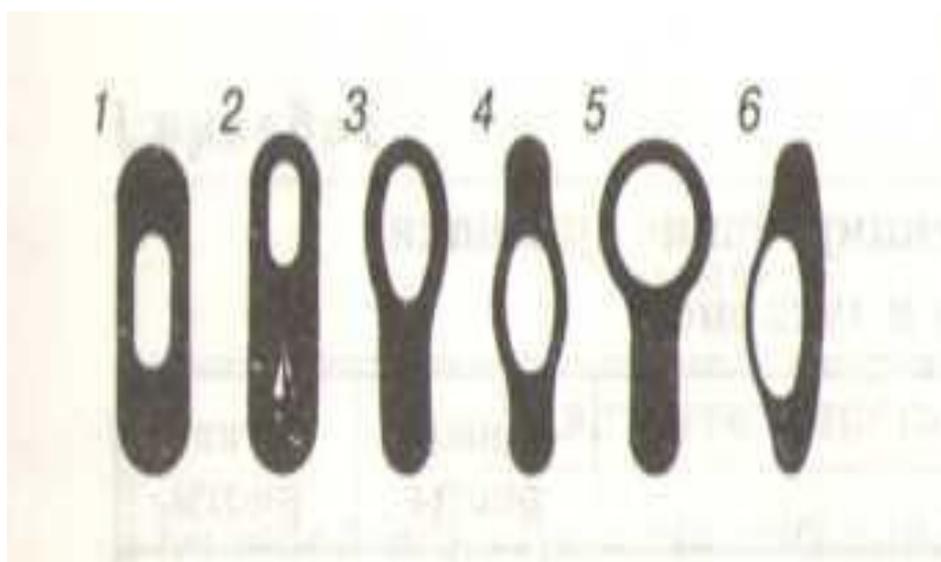
Особенно разнообразны и многочисленны эти структуры у фотосинтезирующих бактерий, а также бактерий, ведущих хемосинтез, в связи с особенностями энергетического обмена клеток.

Небольшая группа бактерий способна к образованию эндоспор, которые формируются по одной в клетке в определенных условиях. Споры достаточно термостабильны (некоторые выдерживают кипячение в течение нескольких часов) и являются защитными структурами наряду с капсулой и клеточной стенкой. В виде спор бактерии длительное время могут находиться в состоянии анабиоза. Так, в пробах почвы, хранившихся в течение 50-100 лет, обнаружили споры некоторых видов бацилл. Основные

типы спорообразования представлены на рисунке 6 [39].

Первыми были изучены спорообразующие бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*, поэтому их называли бациллами. К другим покоящимся формам бактерий относятся цисты и микроспоры, формирующиеся из целой вегетативной клетки, а не ее части, в отличие от эндоспор.

С изменениями условий жизни бактериальной клетки связано и такое явление, как плеоморфизм – изменение формы клетки, например от палочковидной до шаровидной, ветвление клетки, изменение характера (угла) деления клеток и т. п., что также отличает прокариотическую клетку как саморегулирующуюся систему, меняющуюся под влиянием внешних факторов [25].



1 – бацилярный центральный; 2 – бацилярный терминальный; 3,5 – плектридальный; 4 – клостридальный; 6 – латеральный.

Рисунок 6 – Типы спорообразования у бактерий [39]

В определенных условиях среды, как правило, при дисбалансе субстратов, в бактериальных клетках откладываются запасные вещества – полисахариды (гликоген), жиры и жироподобные соединения, в том числе

поли-β-оксималяная кислота, полифосфаты и сера. Жиры и углеводы служат источниками энергии и углерода, полифосфаты – резервом фосфора, а сера является потенциальным донором электронов для серобактерий [39].

Окраска бактериальных клеток обусловлена наличием пигментов, которые, в свою очередь, являются, как правило, продуктами вторичного метаболизма, образующимися из обычных метаболитов или структурных компонентов клетки. Желтую и оранжевую окраску клеткам придают флавины, ксантины и каротиноиды, красную каротиноиды, пульхерримин, продигиозин, сине-фиолетовую – индигоидин, виолацеин, феназиновые пигменты.

Пигменты играют защитную роль, предохраняя микрофлору от действия видимого и ближнего ультрафиолетового света. В то же время некоторые из них являются фотосенсибилизаторами, катализируя фотоокисление компонентов клетки молекулярным кислородом. Ряд пигментов обладает антибиотическими свойствами [15].

## **Лабораторная работа №2**

### ***Техника приготовления живых культур микроорганизмов и фиксированных окрашенных препаратов.***

При изучении микроорганизмов под микроскопом используют две группы методов приготовления препаратов:

1. Исследование живых клеток микроорганизмов методом «раздавленной» капли.

2. Фиксированные препараты микроорганизмов, обычно окрашенные.

В обоих случаях возможно окрашивание объекта красителями, в качестве которых могут служить метиленовый синий и нейтральный красный.

*Методы «раздавленной» капли* применяют для выявления подвижности

клеток микроорганизмов, наблюдения за их размножением, образованием и прорастанием спор, установления реакции микроорганизмов на химические соединения и физические факторы воздействия, изучения размеров клеток, характера их расположения и определения запасных веществ в клетке.

*Фиксированные препараты*, как правило, используют при работе с патогенными микроорганизмами для безопасности. Их рассматривают под микроскопом, окрашенными. Под фиксацией подразумевают такую обработку живого объекта, которая дает возможность прервать в нем все жизненные процессы, сохранив тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше окрашиваются.

#### **Ход работы при приготовлении «раздавленной» капли:**

1. Обезжирить предметное стекло (протереть сухим мылом, затем тщательно протереть салфеткой).
2. Простерилизовать бактериологическую петлю над пламенем спиртовки.
3. На предметное стекло бактериологической петлей нанести каплю суспензии дрожжевых клеток или настоя свиного навоза.
4. Накрыть каплю покровным стеклом, не допуская образования пузырьков воздуха.
5. Микроскопировать при увеличении объектива сначала 8×, затем 40× при опущенном конденсоре.
6. Зарисовать формы микроорганизмов.

#### **Ход работы при приготовлении фиксированного препарата:**

1. Обезжирить предметное стекло (протереть сухим мылом, затем тщательно протереть салфеткой).
2. Простерилизовать бактериологическую петлю над пламенем спиртовки.

3. Приготовить мазок (нанести на предметное стекло небольшое количество суспензии и растереть при помощи бактериологической петли на площади 4 см<sup>2</sup>).

4. Фиксация мазка: высушить мазок на воздухе (при помощи плавного движения предметного стекла в потоке воздуха);

5. Провести 3-4 раза нижней стороной предметного стекла над пламенем горелки (до тех пор, пока при соприкосновении предметного стекла с тыльной стороной ладони не будет ощущаться легкого жжения).

6. Окрашивание препарата:

- поместить предметное стекло на препаратодержатель;

- нанести на мазок несколько капель красителя (фуксина или метиленового синего) и выдержать 3-5 минут;

- смыть избыток красителя водой и подсушить мазок.

7. Микроскопирование:

- микроскопировать последовательно: при малом 8×, а затем при большом 40× увеличении объектива с использованием конденсора.

8. Зарисовать формы микроорганизмов.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Чем отличаются эукариоты от прокариот?
2. Формы, размеры и размножение бактериальной клетки?
3. Почему микроскопические грибы сначала смотрят при малом увеличении, затем только при большом (и обычно с сухой системой микроскопа)?
4. Какой препарат называется фиксированным?
5. Способы фиксации препаратов?
6. Какие цели преследует фиксация препарата?
7. Способы окрашивания препарата.
8. Какие красители используются при окрашивании?

9. В чем преимущество фиксированного препарата перед живым?
10. Какие препараты лучше окрашиваются: живые или фиксированные? Почему?
11. Техника приготовления препарата методом «раздавленной капли».

## ***2.2 Общие представления о систематике микроорганизмов***

Понятие биоразнообразия основывается на классификации – разбиении известных организмов на классы эквивалентности. Характер классификации зависит от набора признаков изучаемых объектов и от очередности их применения. В связи с этим, в зависимости от устанавливаемых приоритетов, может быть несколько классификаций при одном и том же наборе объектов.

В настоящее время понятие «систематика», по мнению ряда авторов, является широким, включающим другие понятия. *Систематика* (таксономия) – наука, занимающаяся вопросами классификации, номенклатуры и идентификации микроорганизмов. Задачей классификации является объединение микроорганизмов с общими свойствами в определенные группы (таксоны). *Номенклатура* – система наименований, применяемых в определенной области знаний. *Идентификация* – отнесение микроорганизмов к определенному таксону (виду) на основании конкретных признаков [21].

Наиболее крупные таксоны в традиционной классификации клеточных организмов выделены на основании цитологических различий прокариот и эукариот. Изучение многочисленных признаков требует анализа корреляции между ними, при этом молекулярно-биологические различия доядерных и истинноядерных организмов становятся

приоритетными [14].

Учитывая, что современные классификации микроорганизмов искусственны и предназначены для решения определенных задач, понятно стремление исследователей к установлению филогении, или генеалогии, – основе научной классификации по порядку или последовательности происхождения организмов.

В настоящее время в классификации живых объектов доминирует типологический способ. При этом способе изучаемые объекты сравнивают с эталоном и на этом основании их объединяют в один класс эквивалентности. Первый опознанный организм с новыми признаками признается типовым, и с ним сравнивают другие объекты [21].

Современная номенклатура бинарна и была разработана К. Линнеем. Еще философы-схоласты, признавая неисчерпаемость объекта понятием, выделили две категории в свойствах объекта: существенные – *essential* и случайные – *accidentia*. Существенные были отнесены к родовым, а случайные зависимые – к видовым категориям. Правила номенклатуры регламентированы кодексами номенклатуры: зоологическим, ботаническим, бактериологическим. В настоящее время разрабатывается единый кодекс номенклатуры – Биокодекс. В порядке нисходящей последовательности от более крупных таксонов к более мелким различают следующие ранги биологической номенклатуры: царство (*Regnum*), отдел (*Phylum, Divisio*), класс (*Classis*), порядок (*Ordo*), семейство (*Familia*), род (*Genus*), вид (*Species*) (проект Биокодекса статья 3.1). Кроме этого, с учетом variability некоторых видовых признаков, а также отсутствия возможности установления эквивалентности всех признаков сравниваемых объектов существуют такие категории, как подвид, разновидность (*Varietas*) и штамм, раса (*Forma*) [25, 28].

### 2.3.1 Характеристика царства VIRA

В переводе с латинского «вирус» означает «яд» и до открытия микроорганизмов это название применялось ко всем болезнетворным агентам. Задолго до разработки методов выделения и изучения вирусов английский врач Э. Дженнер в 1798 г. эффективно применил вакцинацию против оспы – опасной вирусной инфекции. Тем самым было положено начало развития новой науки иммунологии. *Иммунология* – наука, изучающая молекулярные и клеточные механизмы реагирования организма на чужеродные вещества, называемые антигенами.

Открытие вирусов как особой группы живых существ принадлежит Д. И. Ивановскому, который в 1892 г. установил инфекционность экстракта, полученного из пораженных мозаикой растений табака, даже после его фильтрации через бактериальный фильтр. В 1935 г. В. Стенли показал, что вирусные частицы подвергаются кристаллизации и состоят в основном из белка. Позже в них было установлено и наличие РНК. Первые описания касались вирусов – возбудителей болезней человека, животных и растений: ящура (1898), желтой лихорадки (1907), Ауески (1903), натуральной оспы (1907), полиомиелита (1909) и т. д.

В 1915 и 1917 гг. Ф. Туорт и Ф. д'Эрель впервые описали бактериофаги, поражавшие клетки бактерий, а впоследствии были изучены вирусы грибов (микофаги), актиномицетов (актинофаги), насекомых (энтомофаги) и других организмов [21].

В настоящее время известно, что вирусы не имеют клеточного строения, состоят из одного типа нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), одно- или двуцепочечных, покрытых белковым капсидом, состоящим из белков-капсомеров. В связи с таким составом вирусных частиц их называют *нуклеопротеидами*. В зависимости от укладки нуклеиновых кислот и белков различают несколько типов симметрии вирусов: спиральная, кубическая

(полиэдрическая), сферическая, сложная (двойная) и др. Размер вирусов варьирует от 8-10 нм (энтеровирусы, вирус полиомиелита) до 300 нм и более (вирус оспы, герпеса), вирусы растений могут быть намного крупнее).

Все вирусы являются облигатными (строгими) внутриклеточными паразитами, так как не способны размножаться вне организма хозяина. Попадая в клетку хозяина, вирус интегрирует свою нуклеиновую кислоту в хромосому этой клетки и на рибосомах начинается синтез вирусных белков, в том числе капсомеров. Реплики вирусной нуклеиновой кислоты и белки в процессе сборки формируют новые вирусные частицы, которые уже в большом количестве выходят из пораженной клетки и проникают в новые [21].

Однако реакция клеток на вирусную инфекцию может быть различной: это может быть опухолевая трансформация, вирулентная инфекция, латентная (скрытая) инфекция, индуктивный цитопатический эффект. Наряду с полноценными вирусными частицами (вирионами) известны так называемые субвирусные агенты: **прионы** – мелкие белковые инфекционные частицы, кодируемые геномом хозяина, вызывают ряд заболеваний, в том числе энцефалопатии животных (КРС, кошек, норок); **вириоды** – субвирусные агенты, лишенные белковой оболочки, представленные замкнутыми молекулами РНК, размножаются с помощью клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы, вызывают заболевания растений (карликовость хмеля, веретеновидность клубней картофеля и др.); **сателлиты** – субвирусные агенты, состоящие из нуклеиновой кислоты (чаще однонитевой РНК), мультипликация которой зависит от коинфицирования клетки хозяина вирусом-помощником, вызывают ряд заболеваний животных и растений.

В 1973 г. в Лондоне на международном съезде вирусологов вирусы, объединяемые сейчас в царство *Vira*, были разделены на две группы: ДНК- и РНК-содержащие. Международный комитет по таксономии вирусов

сформулировал основные критерии, используемые в классификации вирусов:

- тип нуклеиновой кислоты, ее структура;
- наличие липопротеиновой оболочки;
- стратегия вирусного генома;
- размер, морфология вириона, тип симметрии, число капсомеров;
- антигенные свойства;
- круг восприимчивых хозяев;
- патогенность (патологические изменения в клетках);
- география распространения;
- способ передачи.

Учитывая, что до 60% всех известных инфекционных заболеваний вызываются вирусами, что история вирусологии насчитывает немного более 100 лет и многие методы изучения возбудителей ещё не разработаны. Классификация вирусов остаётся также далеко не совершенной, искусственной и в большинстве случаев сводится к характеристике порядков, семейств, подсемейств, родов и отдельных видов. Известно, сейчас более 4000 вирусов и они отнесены к 164 родам, объединенным в 71 семейство, входящее, в свою очередь, в несколько порядков. Недостаточно изучены ещё вирусы растений, насекомых и микроорганизмов. Так, вирусы растений относятся к 26 группам, немногие из которых объединены в семейство *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*.

Вирусные инфекции растений отличаются от вирусных инфекции животных и микроорганизмов: вирус проникает в клетки растений, через повреждения клеточной оболочки при её механическом травмировании или в результате прокалывания ротовыми органами членистоногих, и растение, инфицированное вирусом, становится постоянным его носителем [21].

Некоторые растения могут поражаться субвирусными агентами –

вириодами, содержащими РНК, но лишенными оболочки (вириод бледности плодов огурца – *Cucumber pale fruit viroid*, вириод карликовости хмеля – *Hop stunt viroid* др.). К другим субвирусным агентам, как уже говорилось, относят сателлиты и прионы, подробно изучаемые в курсе вирусологии.

Более подробно изучены и систематизированы вирусы животных, вызывающие ряд инфекционных заболеваний и у человека [5].

В номенклатуре вирусов отражены таксономические категории. Так, окончание *-ales* соответствует порядку; *-idea* – семейству; *-inae* – подсемейству; *-us* – роду. Например, семейство *Picornaviridae* (малые, РНК-содержащие вирусы) содержит более 200 серотипов вирусов животных и человека, в том числе возбудителей полиомиелита человека (род *Enterovirus*) и возбудителей зооантропозного заболевания – ящура (род *Aphthovirus*).

Для облегчения восприятия свойств вирусов используется кодированная запись – криптограмма, где указывается тип нуклеиновой кислоты / количество нитей; молекулярная масса нуклеиновой кислоты, в млн. Дальтона (D) /процент содержания ее в вирионе; форма вириона /форма капсида; хозяин /переносчик. Например, криптограмма вируса ящура следующая: R/1:2,8/30:S/S:V/0. Она означает, что вирус содержит однонитевую РНК (1) весом 2,8 млн. D (30%), форма вириона и капсида сферическая (S), поражаются позвоночные животные (V), переносчик отсутствует (0).

Для возникновения любого инфекционного заболевания необходимы следующие условия: микроб должен быть достаточно вирулентным; необходимо внедрение определенного количества возбудителя; возбудитель должен проникнуть через конкретные ворота инфекции и достигнуть восприимчивых клеток и тканей; организм хозяина должен быть восприимчив к данному возбудителю болезни; должны быть определенные условия среды, при которых происходит взаимодействие микроба и хозяина

[3, 5].

Входными воротами возбудителей вирусных инфекций человека и животных могут быть слизистые оболочки дыхательных путей и пищеварительного тракта (грипп, чума плотоядных), поврежденная кожа при укусах (бешенство, инфекционная анемия лошадей). Растения поражаются вирусами при механических повреждениях, нарушении целостности их тканей вредителями [5].

### ***2.3.2 Характеристика царства PROCARYOTAE***

Название царства отражает общее для всех его представителей свойство – отсутствие настоящего дифференцированного ядра, что характерно для бактерий. Клетки этих организмов намного меньше клеток грибов, растений и животных, их отличия описаны выше.

Вирусы могут быть использованы человеком для борьбы с вредными насекомыми (энтомофаги) и возбудителями болезней (бактерио- и микофаги). С другой стороны на полезных микроорганизмах они могут привести к остановке производственных процессов и экономическому ущербу. Длительное изучение бактериофага лямбда, поражающего кишечную палочку, помогло раскрыть механизмы конъюгации, трансдукции, лизогении и других процессов [21].

Систематика бактерий – постоянно развивающаяся область знаний. В последние десятилетия выделено много новых таксонов, описанных в периодическом издании «International Journal Systematic Bacteriology». Все сведения по таксономии прокариот представлены в 4-томном 9-м издании «Определителя бактерий Берджи». Кроме этого, был издан «Краткий определитель бактерий» для идентификации бактерий. Следует отметить, что четыре отдела в царстве прокариот выделены на основании наличия и

строения клеточных стенок [21].

Так, первый отдел – *Gracilicutes* – объединяет бактерии с тонкой (до 20 нм) клеточной стенкой, содержащей муреин и липополисахариды; второй отдел – *Firmicutes* – объединяет бактерии с толстой клеточной стенкой (до 100 нм), содержащей муреин и тейхоевые кислоты, а также ряд жирных кислот, специфичных для отдельных родов; третий отдел – *Tenericutes* – объединяет бактерии, лишенные клеточной стенки, покрытые цитоплазматической мембраной; четвертый отдел – *Mendosicutes* – объединяет бактерии с тонкой клеточной стенкой, содержащей протеин, псевдомуреин и ряд других компонентов, которые не встречаются у представителей 1-го и 2-го отделов [21].

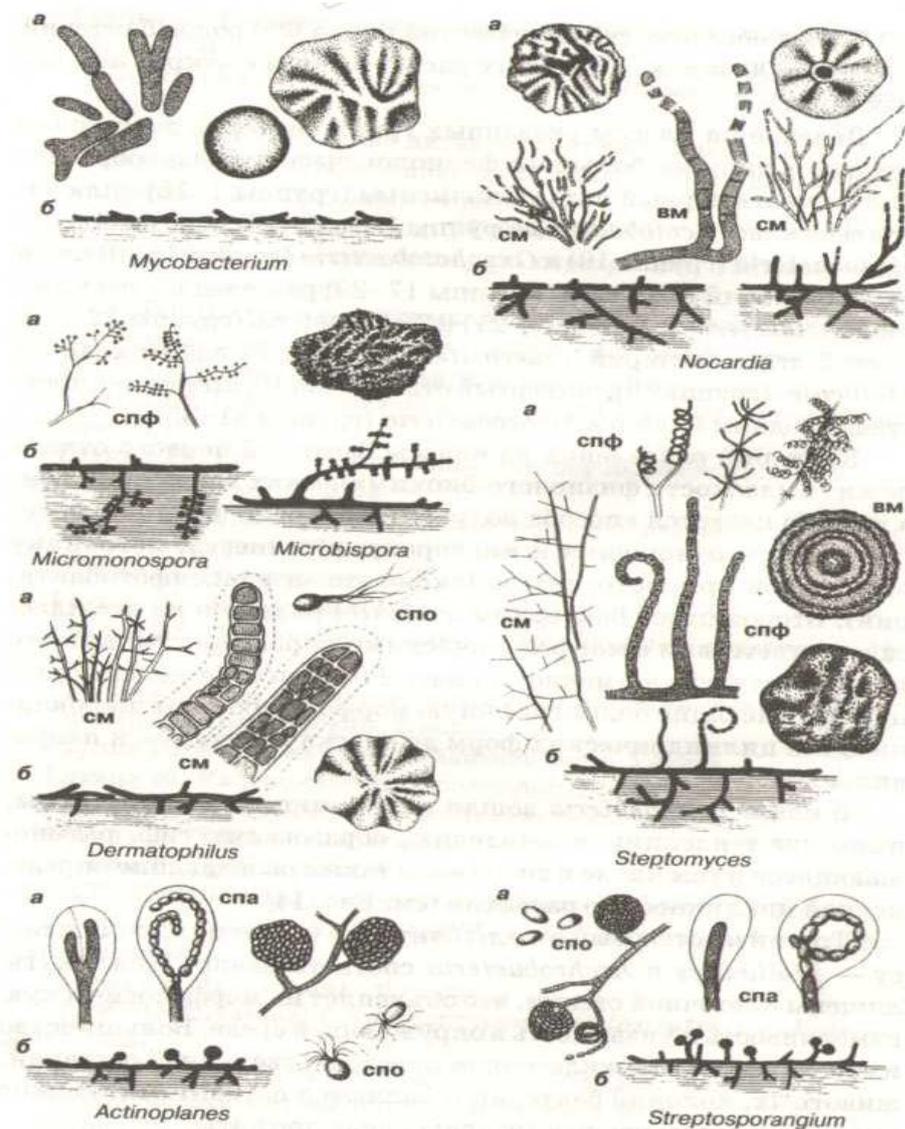
Таким образом, сейчас известно около 600 родов бактерий и более 5000 видов, и число их растет в связи с открытием новых форм.

Деление на классы указанных групп бактерий достаточно условно в силу их большого физиологического разнообразия. Тем не менее, первый отдел *Gracilicutes* (группы 1-16) включает в себя класс *Scotobacteria* (группы 1-9,12-16), классы *Anoxyphotobacteria* (группа 10) и *Oxyphobacteria* (группа 11). Второй отдел бактерий *Firmicutes* (группы 17-29) разделен на два класса. *Firmicutes* (группы 17-21) и *Tallobacteria* (группы 22-29). Третий отдел бактерий *Tenericutes* представлен одним классом *Mollicutes* (группа 30), четвертый отдел *Mendosicutes* также представлен одним классом *Archeobacteria* (группы 31-35) [21].

Критерий разделения на классы бактерий первого отдела лежит в плоскости физиолого-биохимических характеристик, а именно касается способа получения энергии (ското- и фотобактерии) и отношения к кислороду, а точнее, к источнику электронов при фотосинтезе (оксифото- и аноксифотобактерии). Второй отдел бактерий *Firmicutes* разделен на два класса в соответствии с морфологическими характеристиками его представителей, а именно: в класс *Firmbacteria* вошли организмы,

имеющие более типичную морфологию – от шаровидных или цилиндрических форм до слегка изогнутых и неправильных [27, 32].

В класс *Tallobacteria* вошли актиномицеты – организмы, имеющие тенденцию к ветвлению, образованию гиф, размножающиеся, в том числе и спорами, а также обладающие определенной цикличностью развития (см. рис. 7).



а — форма колоний, характерная для данного рода; б — разрез через заросшую бактериями поверхность агара. Показана типичная форма роста субстратного мицелия (см) и воздушного мицелия (вм), спорофоры (спф), спорангии (сна), а также лишённые жгутиков и обладающие жгутиками споры (спо).

Рисунок 7 – Представители различных родов актиномицетов [39]

Третий и четвертый отделы бактерий имеют по одному классу *Mollicutes* и *Archeobacteria* соответственно. Молликуты лишены клеточной стенки, что объясняет их морфологическую изменчивость и уязвимость в окружающей среде. Большинство их развивается в межклеточном пространстве тканей растений, животных, колоний бактерий и являются паразитами. Редкие виды микоплазм распространены как сапрофиты.

Класс *Archeobacteria* (археи) включает бактерии, мало отличающиеся по морфологии и цитологии от эубактерий, но имеющие ряд хемотаксономических (строение мембран, клеточной стенки, РНК-полимераз, 16SpРНК и др.) и физиологических (метаногенез, гало- и термофилия) признаков, позволяющих отнести их к экстремофилам, обитающим в необычных эконишах, где жизнь большинства организмов невозможна.

Согласно «Определителю Берджи», родовая и видовая дифференциация бактерий базируется на изучении физиолого-биохимических или, как принято говорить, эколого-трофических характеристик. Исследуется сама возможность утилизации микроорганизмами того или иного субстрата в тех или иных условиях [14, 21].

Проблемы эволюции и происхождения различных живых форм являются приоритетными в теоретической биологии. Не сохранив на Земле столь очевидного и впечатляющего материала для палеонтологии, как, например, скелеты животных, микроорганизмы оставили много материала, косвенно подтверждающего их деятельность на протяжении миллиардов лет. Разработка единой теории эволюции организмов затруднена по многим причинам.

Ученые стремятся найти достойные аргументы для той или иной гипотезы. Например, существуют альтернативные гипотезы происхождения вирусов: с одной стороны, вирусы – продукты регрессивной эволюции,

потомки клеточных форм жизни, перешедшие к паразитизму, с другой – вирусы имеют эндогенное происхождение.

Изучение структурных и функциональных характеристик микроорганизмов дополняют сведения об их генетическом родстве. Данные о генотипе микроорганизмов получают путем анализа выделенных из них нуклеиновых кислот и определения нуклеотидного состава ДНК.

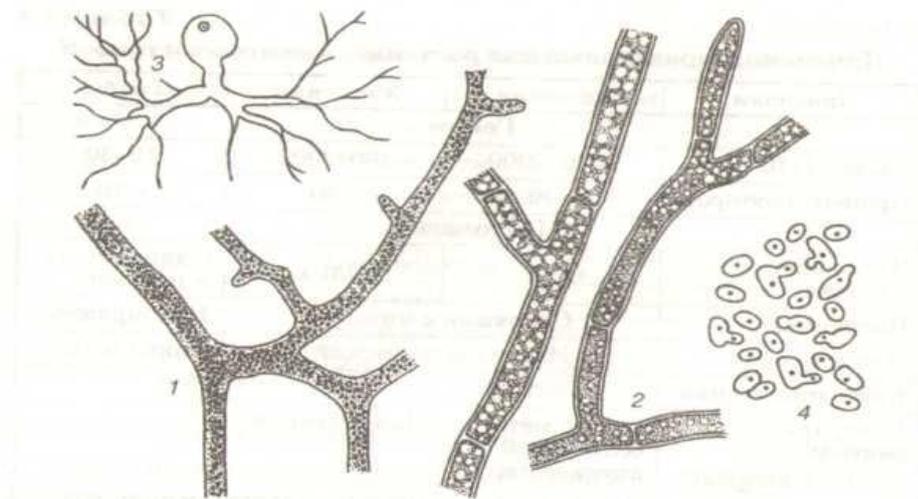
Высокая степень гибридизации ДНК разных организмов (80% и более) говорит о гомологии первичной структуры ДНК и близком генетическом родстве. Попытки построения филогенетического дерева прокариот пока не увенчались успехом. Однако сопоставление всех организмов по последовательности оснований гена малой рРНК (16S для прокариот и 18S для эукариот) позволило выделить три группы организмов, имеющих статус таксона высшей категории (*Imperium*). Множество клеточных форм жизни распределяются между тремя империями: *Eukaryota*, *Archeobacteria*, *Eubacteria* [21].

В чистую культуру выделены порядка 5000 видов бактерий. В природе их значительно больше, и они представлены некультивируемыми формами, присутствие которых в различных биотопах стало очевидным благодаря использованию молекулярно-генетических методов исследования [12].

### **2.3.3 Характеристика царства МУСОТА**

В отдельное царство объединены организмы, сочетающие в себе растительные, животные и специфические признаки. Вегетативное тело большинства грибов – мицелий, состоящий из нитей – гиф, позволяющий максимально оккупировать субстрат и всасывать органические и минеральные вещества (осмотрофный тип питания). Существуют различные

типы мицелия (см. рис. 8). Высокомолекулярные субстраты утилизируются благодаря их гидролизу экзоферментами, выделяемыми грибами.



1 – неклеточный мицелий; 2 – клеточный мицелий; 3 – одноклеточный таллом с ризомицелием; 4 – почкующиеся клетки, псевдомицелий.

Рисунок 8 – Типы мицелия [7]

Клетки многих грибов многоядерны, так как цитокinesis у них не сопряжен с кариокinesis. Более того, ядра часто не однородны по составу, что объясняет такое специфичное для цитологии грибов явление, как гетерокариоз, в значительной степени определяющий высокую адаптивность грибов к условиям среды. Циклы развития этих организмов отличаются сложностью, сменой гаплоидных и диплоидных фаз, большим разнообразием способов размножения (вегетативный – фрагментами гиф, бесполой – спорами, половой – спорами, несущими информацию родительских форм).

Грибы объединены в царство *Mycota* и представляют собой большое число независимо возникших или давно разошедшихся эволюционных линий.

Отдел *Mухомycota* (слизевики) объединяет организмы, вегетативная

фаза которых представлена плазмодием, который, в свою очередь, при спороношении преобразуется в спорангий (спорангии) с покоящимися спорами, покрытыми целлюлозными (реже хитиновыми) оболочками [8].

Деление на классы учитывает строение плазмодия, прорастание спор и др.

Класс *Myxomycetes* (истинные миксомицеты) включает в основном сапротрофы, состоящие из плазмодия с большим числом диплоидных ядер. В процессе плодоношения плазмодий преобразуется в группу спорангиев, внутри которых идет редукционное деление ядер и обособление одноядерных спор. Во влажной среде споры преобразуются в зооспоры со жгутиками, которые, попарно сливаясь, формируют диплоидные клетки. Диплоидная клетка теряет жгутики, митотически делится и превращается в многоядерный плазмодий.

Класс *Dictyosteliomycetes* (клеточные миксомицеты) включает миксомицеты, вегетативная фаза которых представлена отдельными клетками (миксамебами), обитающими в органическом субстрате (навозе). Источниками питания являются бактерии, размножение миксамеб происходит делением. При голодании клетки формируют колонку с расширенным верхом (спорангием), покрытым целлюлозной оболочкой, внутри которого амебы превращаются в неподвижные споры. Последние в благоприятных условиях снова превращаются в амебы. Жизненный цикл этих микроорганизмов имеет определенное сходство с жизненным циклом миксобактерий.

Класс *Plasmodiophoromycetes* (паразитические миксомицеты) включает грибы, развивающиеся как облигатные внутриклеточные паразиты высших растений. Например, *Plasmodiophora brassicae* – возбудитель килы семейства капустных. Плазмодии в клетках корня растения распадаются на одноядерные споры, покрытые хитином, которые, попадая в почву после гибели корней, прорастают в двужгутиковые зооспоры, прикрепляющиеся к

корневым волоскам и заражающие растения.

Отдел *Heterocontae* объединяет грибоподобные организмы, по своим характеристикам напоминающие разножгутиковые водоросли. Их подвижные клетки имеют два жгутика различного строения или один перистый. Половой процесс – оогамия; синтез лизина происходит через диаминопимелиновую кислоту; высокое содержание целлюлозы в клеточной стенке; запасной углевод –  $\beta$ -глюкан ламинарин. Трубочатые кристы митохондрий, близкий нуклеотидный состав ядерных, рибосомальных и митохондриальных генов с гетероконтными водорослями – все это наводит на предположение о том, что грибы этого отдела произошли от потерявших хлоропласты и перешедших к гетеротрофному питанию золотистых и желто-зеленых водорослей [33].

Существует мнение о том, что биотические связи организмов могли сохраниться на протяжении их эволюции. Например, связь грибов с растениями – самые примитивные грибы (хитридио- и оомицеты) паразитируют на самых примитивных растениях. Возможно, что грибы появились на суше под покровом растений, как их паразиты или симбионты. Связи грибов с животными не столь многочисленны и многогранны. Взаимовыгодный симбиоз грибов и водорослей (мико- и фикобионтов) демонстрируют лишайники, которые в ходе эволюции приспособились к экстремальным природным условиям.

Класс *Labyrinthulomycetes* (сетчатые миксомицеты) включают грибы, образующие веретеновидные одноядерные клетки, выделяющие слизь, застывающую в виде трубочек. Ветвление и слияние трубочек приводит к образованию сетчатых колоний. У некоторых видов обнаружены разножгутиковые зооспоры со стигмой, что говорит о родстве с золотистыми водорослями. Первое описание этих организмов дал русский ботаник, один из основоположников отечественной микробиологии Л. С. Ценковский в

1867 г. Грибы этого класса паразитируют на морских водорослях и траве, вызывая их гибель, однако могут питаться в лабораторных условиях клетками бактерий и дрожжей.

Класс *Hyphochytriomycetes* включает немногочисленные грибы, биология которых изучена недостаточно. Подвижные клетки этих организмов имеют один перистый жгутик. В основном это паразиты водорослей, грибов и беспозвоночных.

Класс *Oomycetes* объединяет несколько порядков, наиболее многочисленными из которых являются порядки *Saprolegniales* и *Peronosporales*. Для грибов первого порядка характерны хорошо развитый мицелий без перегородок, оогамный половой процесс, предпочтение белковых субстратов, которыми могут оказаться группы беспозвоночных и рыб в связи с обитанием большинства видов в воде [33].

Пероноспоры включают как водные, так и наземные виды, паразитирующие на растениях. Переход от водного образа жизни к наземному связан с изменением механизма бесполого размножения. Так, у сапролегниевых из зооспорангия выходят зооспоры, распространяемые водным током, а у высших пероноспорных – лишённые клеточной оболочки зооспоры в воздушной среде могли бы погибнуть. В связи с этим прорастание происходит в два этапа: зооспорангий отрывается и разносится ветром, брызгами дождя. Попадая во влажную среду, он иногда прорастает (в зависимости от условий) разными способами: при пониженной температуре образуются зооспоры, подвергающиеся инцистированию и прорастающие в ткань растений; при повышенной температуре зооспор не образуется, а зооспорангий превращается в проросток – инфекционный агент. Пероноспоры вызывают фитофтороз картофеля и томатов, ложную мучнистую росу многих сельскохозяйственных растений (рис. 9) [31].

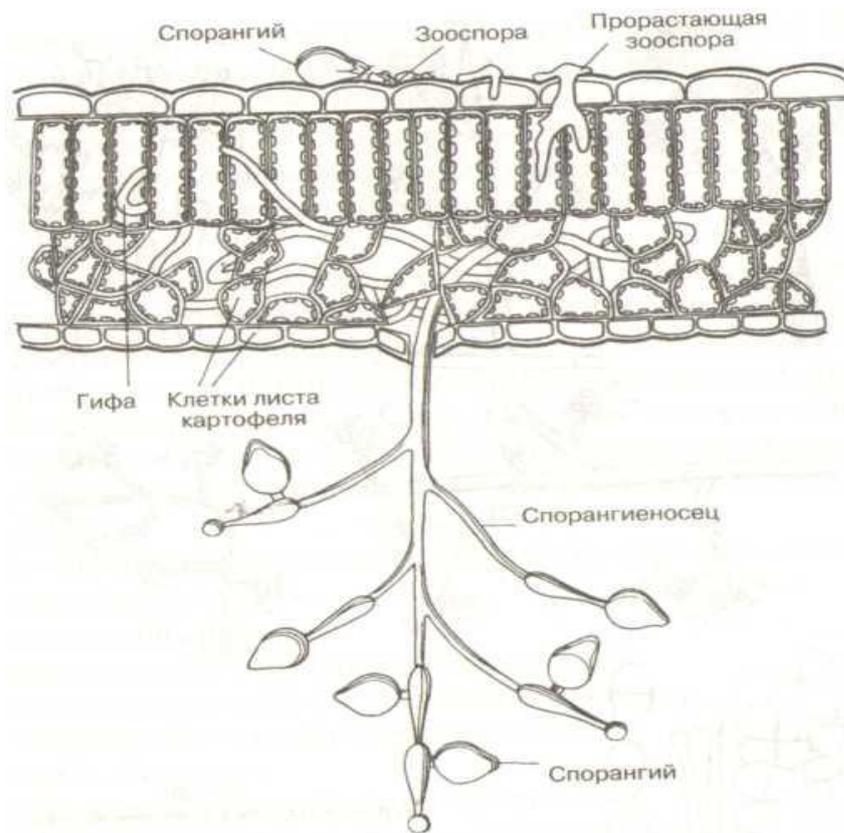


Рисунок 9 – Пероноспорный гриб *Phytophthora infestans*, возбудитель фитофтороза картофеля [31]

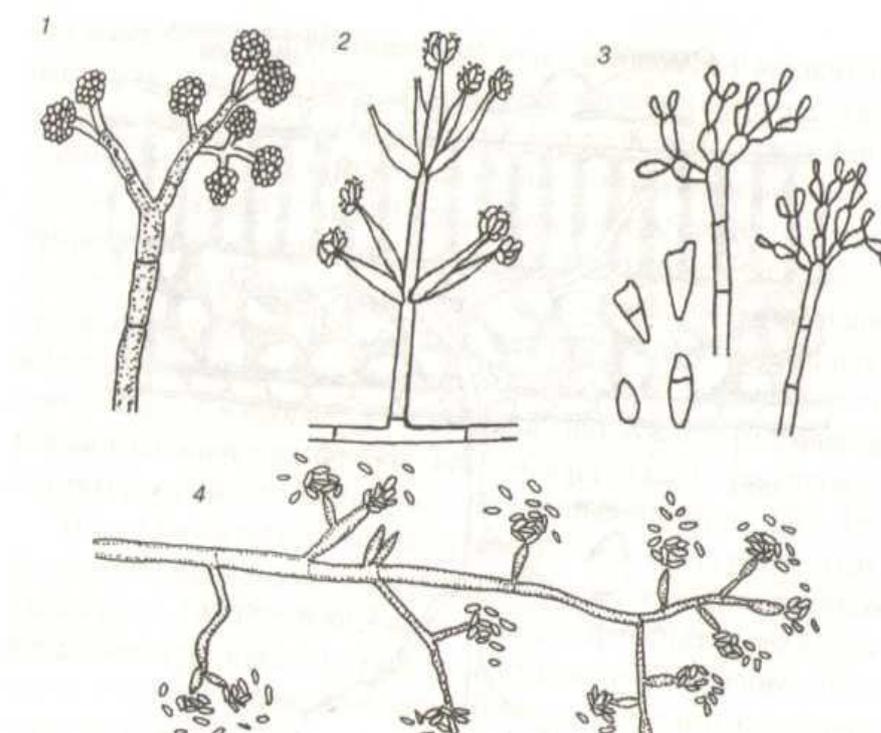
Отдел *Eumycota* (истинные грибы) объединяет грибы со следующими признаками: клеточная стенка содержит в основном хитин и глюкан, синтез лизина проходит через 2-аминоадипиновую кислоту, кристы митохондрий плоские, питание осмотрфное. Основные признаки классов этого отдела описаны во многих учебных пособиях, однако в них не всегда имеется характеристика класса *Trichomyctes*. Гифы трихомицетов (одно- или многоклеточные) формируют спорангии, макро- или микроконидии. В отсутствие спорангиев таллом распадается на артроспоры. Половой процесс начинается со слияния клеток нитей, а заканчивается образованием покоящейся зиготы. Трихомицеты обитают в кишечнике насекомых, ракообразных [33].

Как уже говорилось, царство грибов объединяет более 100 тыс. видов

самых разнообразных по происхождению, строению, образу жизни организмов, и классификация их претерпевает постоянные изменения и уточнения.

Например, согласно Н. П. Черепановой, грибы объединяют в царство *Mycota*, которое представлено 8 отделами и 18 классами. Широко распространенный гриб мукор относится к зигомицетам, а аспергилл и пеницилл – к аскомицетам.

Последний отдел стоит отдельно от остальных, так как характеризуется тем, что в процессе эволюции его представителями был утрачен половой процесс и размножение происходит только бесполом путем: конидиями или вегетативным почкованием (рис. 10).



1 – под *Botrytis*; 2 – под *Verticillium*; 3 – под *Cladosporium*; 4 под –*Trichoderma*.

Рисунок 10 – Представители несовершенных грибов, утративших в ходе эволюции половую стадию [7]

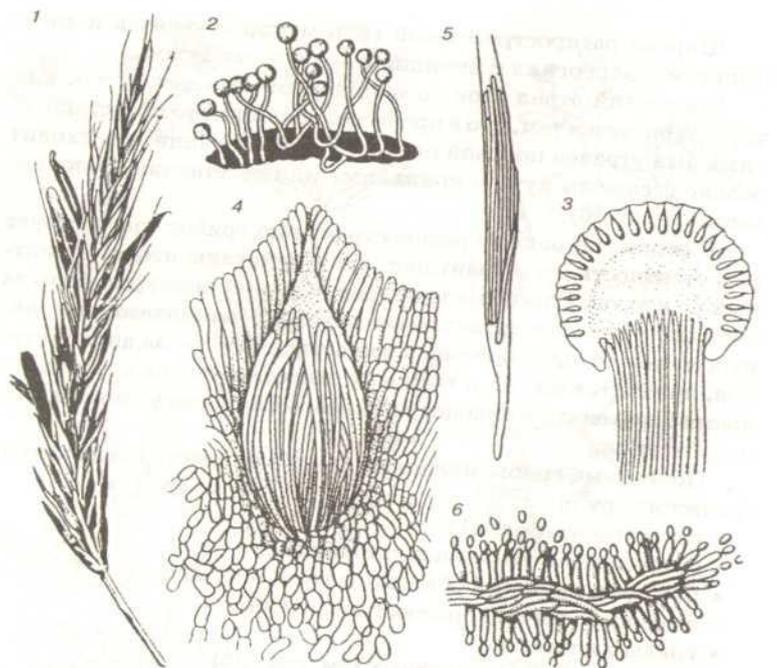
В целом, широкому распространению грибов способствует резистентность и толерантность их к действию неблагоприятных факторов. Способность грибов успешно конкурировать за экониши с другими организмами обусловлена синтезом вторичных метаболитов: токсичных веществ, в том числе антибиотиков, пигментов и т. п., а также их способностью на длительное время переходить к анабиозу в неблагоприятных условиях среды обитания.

Почвенные грибы можно разделить на шесть экологотрофических групп:

- сапротрофы ;
- патогены растений факультативные;
- патогены растений облигатные (см. рис. 11);
- симбиотрофы-микоризообразователи;
- грибы-хищники;
- грибы-паразиты животных.

Факультативные паразиты развиваются как в организме хозяина, так и вне его, а облигатные – только в организме хозяина. В свою очередь, патогены и микоризообразователи относят к биотрофам, так как они связаны с живыми растениями. Кроме этого, по характеру экониши выделяют почвообитающие грибы, грибы-ксилотрофы (*обитатели древесины*), грибы-филлопланы (*обитатели надземных зеленых органов растений*), водные грибы (*первично-водные – древние группы грибов и вторично-водные, разрушающие растительный субстрат, попадающий в воду*), сычужные грибы (*обитатели желудков травоядных жвачных животных*), копротрофные (*обитают в навозе животных*) и лишенизированные грибы (*входят в состав лишайников*) [21].

Грибы, как известно, опасны тем, что образуют ядовитые вещества – микотоксины. Микотоксины – низкомолекулярные вторичные метаболиты, продуцируемые, в том числе микроскопическими плесневыми грибами.



1 – колос ржи со склероциями; 2 – склероции, проросший головчатыми стромами; 3 – разрез стромы с перитециями; 4 – отдельный перитеций в строме; 5 – сумка с аскоспорами; 6 – конидиальная стадия «сфацелия».

Рисунок 11 – Паразитический гриб спорынья *Claviceps purpurea* [31]

Микотоксины являются природными загрязнителями разных объектов. Они образуются при хранении во многих пищевых продуктах, под действием развивающихся в них микроскопических грибов. Микотоксины отличаются по химическому строению, токсичности и механизму действия. Общим признаком всех микотоксинов является токсичность преимущественно относительно эукариотических организмов.

Наиболее часто применяется классификация микотоксинов по молекулярному строению, согласно которой различают афлатоксины, трихотеценовые микотоксины, охратоксины, фумонизин, зеараленон и его производные, монилиформин, алкалоиды спорыньи, циклопиазоновую кислоту, патулин, цитринин и т. п. Детоксикация микотоксинов происходит в результате действия ферментов, обладающих оксидоредуктазной,

гидролитической и трансферазной активностью. Карбоксилэстеразы катализируют гидролиз сложноэфирных связей, а эпоксигидролазы – 12,13-эпокси группы в молекулах трихотеценовых микотоксинов. Подобные ферменты имеет, например, кишечная микрофлора. На питательных средах микромицеты образуют колонии разной окраски, обусловленной цветом спор и мицелия [19].

Особую группу грибов составляют **дрожжи** – в основном одноклеточные эукариотные организмы. На основании полученных исследователями данных о наличии и характере полового процесса дрожжи относят к трем классам *Ascomycetes* (аскоспоровые), *Basidiomycetes* (базидиомицетовые), *Deuteromycetes* (несовершенные, у которых половой процесс отсутствует). Насчитывают около 100 родов дрожжей и примерно 600 видов, что составляет около 0,5% от известных видов грибов [8].

Среди разных групп дрожжей можно выделить различные жизненные формы и природные комплексы. К первым, например, относят фитобионты – обитатели живых растений, сапробионты – обитатели отмершего органического материала, педобионты – постоянные обитатели почв. Природные комплексы дрожжей: эпифитный, подстилочный, почвенный, зоомикробный. Дрожжи встречаются на поверхности растений, плодов, ягод, зерна, в воздухе и почве. Это одноклеточные неподвижные организмы диаметром 8-10 мкм. Клетки их круглой, овальной или несколько удлиненной формы. Содержат хорошо заметное под микроскопом ядро. В клетках встречаются различные включения: капли жира и волютина, сильно преломляющие свет, гликоген, зерна белковых веществ [30].

Дрожжи размножаются обычно бесполом путем: почкованием (*Saccharomyces*) и реже делением (*Schizosaccharomyces*), но могут размножаться и спорами. Последние образуются без предварительного слияния двух клеток, или им предшествует половой процесс. Среди дрожжевых грибов есть и такие, которые не образуют спор. Дрожжи

подразделяют: спорообразующие и не спорообразующие. Высокая скорость размножения дрожжей объясняется, в том числе способностью к почкованию. Широкая колонизация ими наземных органов растений и устойчивость к радиации обусловлена образованием дрожжами пигментов.

Есть дрожжи, которые могут вызывать лишь окисление углеводов, они не способны к спиртовому брожению. В качестве источника азота используют пептоны, аминокислоты и аммонийные соли. Лучше всего развиваются при кислой или слабокислой реакции (pH 4-6). Устойчивы к высоким концентрациям сахара (до 70%) и спирта (до 14%) в среде.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Почему вирусы называют нуклеопротеидами?
2. Какие виды симметрии есть у вирусов?
3. Каковы размеры вирусных частиц?
4. Кто является основоположником науки вирусологии?
5. Какие критерии используют в классификации вирусов?
6. Как называют вирусы бактерий, грибов, актиномицетов, насекомых?
7. Почему вирусы называют облигатными паразитами?
8. Что такое криптограмма?
9. Каковы принципы классификации бактерий на отделы (по Берджи)?
10. Назовите основные таксоны в систематике прокариот.
11. Почему актиномицеты называют переходной (нетипичной) группой организмов?
12. Какие группы бактерий считают наиболее древними?
13. Чем обусловлены трудности классификации бактерий?
14. Какова иерархия таксонов согласно морфо-физиолого-

биохимической и генетической классификаций?

15. Назовите признаки грибов, общие с растениями и животными.
16. Назовите специфические признаки грибов.
17. Что лежит в основе классификации грибов на три отдела?
18. На какие эколого-трофические группы разделены почвенные
19. грибы?
20. Какие признаки учитывают при классификации грибов?
21. Какие экологические ниши занимают грибы?
22. К каким систематическим группам относят дрожжи?
23. Какие жизненные формы формируют дрожжи?
24. Какие свойства грибов (морфологические, цитологические, физиологические) позволяют грибам занимать разнообразные экологические ниши и выживать в неблагоприятных условиях?
25. Что такое микотоксины?
26. Какие биологические механизмы детоксикации микотоксинов вам известны?
27. Объясните значение терминов «сапрофиты», «ксилофиты», «копротрофы», «паразиты факультативные», «паразиты облигатные».
28. Перечислите разные природные комплексы дрожжей.
29. Чем обусловлена устойчивость дрожжей к действию радиации?

### **Лабораторная работа №3**

***Питательные среды для микроорганизмов. Методы стерилизации.***

***Подготовка посуды и питательных сред для стерилизации.***

Микроорганизмам для роста, развития и размножения необходимы питательные элементы.

В состав клеток микроорганизмов входят органические (С, О, Н, N),

зольные элементы (P, S, K, Ca, Fe, Mg) и микроэлементы (B, Mn, Mo, Cu, Zn и Co), которые в малых дозах стимулируют рост клеточной массы, а в больших тормозят его. В связи с этим различны и требования микроорганизмов к источникам питания.

В сухом веществе клеток содержится, %: C – 50, N – 10-13, H – 8, O – 20, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 4, K<sub>2</sub>O – 3, SO<sub>3</sub> – 1, MgO – 0,8, CaO – 1, FeO<sub>3</sub> – 0,08, микроэлементов – следы.

Чтобы установить значение отдельных питательных элементов для развития микроорганизмов готовят несколько вариантов питательных сред с исключением того или иного элемента, или с добавлением микроэлемента. По росту микроорганизма на питательных средах судят о значении исключаемого или добавляемого элемента или микроэлемента.

Питательные среды для микроорганизмов делятся:

1. по составу;
2. по физическому состоянию;
3. по назначению.

**По составу питательные среды подразделяются на:**

***Натуральные среды*** имеют неопределенный химический состав, так как они состоят из продуктов растительного или животного происхождения, используемые в виде настоев, или экстрактов (овощи, фрукты, их отвары, солод, дрожжи, части растений, молоко, мясо, животные ткани, куриное яйцо и т.д.). Натуральные среды мало пригодны для изучения физиологии микроорганизмов, так как в них трудно учесть потребление микроорганизмами отдельных компонентов среды и образование продуктов обмена микробных клеток. Их используют для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей.

***Синтетические среды.*** В их состав входят только известные

химически чистые соединения в точно указанных концентрациях. Они используются для изучения обмена веществ микроорганизмов.

**Полусинтетические среды.** В их состав наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Они используются для получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

**По физическому состоянию среды разделяют:**

**Жидкие** – используют для накопления биомассы или продуктов обмена микроорганизмов.

**Плотные** – готовят из жидких, добавляя 1,5 – 2,5% агар-агара или 10-15% желатины. Используют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, в диагностических целях.

**Сыпучие** – разваренное пшено, отруби, пропитанные питательным раствором – используют в промышленной микробиологии.

**По назначению различают следующие среды:**

**Универсальные** – благоприятны для выращивания многих видов микроорганизмов (мясо-пептонный бульон (МПБ); мясо-пептонный агар (МПА); мясо-пептонная желатина (МПЖ)).

С.Н. Виноградским и М. Бейеринком введены в микробиологическую практику **элективные (или избирательные) среды**, которые создают условия для преимущественного развития одного вида или группы родственных микроорганизмов и не пригодны для развития других. Элективные среды используют для выделения микроорганизмов из природных мест обитания или производственных субстратов, получения накопительных культур.

**Дифференциально-диагностические или индикативные** – для идентификации чистых культур на основе изучения их биохимических свойств.

## Методы стерилизации питательных сред и других объектов.

Методы стерилизации (обеспложивание, *Sterilis* – бесплодный) основаны на двух принципах:

а) можно убрать клетки микроорганизмов и их споры в питательных средах, посуде, на инструментах и других предметах (термическая и лучевая – холодная стерилизация).

б) можно отделить клетки микроорганизмов, применяя метод фильтрования – холодная стерилизация.

### 1. Холодная стерилизация:

а) фильтрованием (мембранные фильтры, фильтры Зейтца, свечи Шамберляна);

б) ультрафиолетовыми лучами (когда среды не выдерживают обработку нагреванием).

### 2. Термическая стерилизация:

а) прокаливание на пламени (фламбирование) мелких металлических предметов (петли, иглы, шпатели, пинцеты, скальпели, ножницы) непосредственно перед употреблением.

б) стерилизация сухим жаром стеклянной посуды, сухих материалов (некоторых реактивов, ваты и др.) Режим стерилизации 2 часа при 165-170°C, повышение температуры приводит к разрушению бумаги и ватных пробок.

в) стерилизация текучим паром – тиндализация (дробная стерилизация введена английским ученым Тиндалем) для стерилизации сред (молоко, среды с летучими веществами) качество которых меняется при температуре более 100°C. Сущность: нагревание среды при нормальном давлении до 100°C (по 30-40 мин.) в течение 3-4 дней. В промежутках между прогреваниями дают прорасти жизнеспособным спорам, помещая среды в термостат при температуре 30°C. Тиндализация осуществляется в кипятильнике Коха в парах кипящей воды. Практическое значение метода ограничено в связи с большой затратой времени.

г) пастеризация – однократный прогрев материала при температуре ниже 100°C. Предложен Пастером для уничтожения не образующих спор микроорганизмов и не обеспечивает стерильности субстрата. Пастеризация при 60°C проводят в течение 30 мин., 70°C – в течение 15 мин., 80°C – 10 мин., при 90°C материал сразу охлаждают после нагревания.

Широко применяется в пищевой промышленности для обработки продуктов, теряющих при кипячении питательные и вкусовые качества (молоко, фруктовые соки, пиво, вино, уксус).

д) стерилизация насыщенным паром (автоклавирование) – наиболее универсальный, надежный и широко распространенный метод стерилизации. Длительность и температура автоклавирования определяется составом питательной среды. При 0,5 атм. в течение 30 мин. Стерилизуют легко разрушающиеся среды (содержащие сахара, витамины, сусло пивное, дрожжевой автолизат, желатиновые среды, молоко и пр.) при 1 атм. 20-30 мин. – мясо-пептонные среды. При 1 или 2 атм. в течение 2 часов – почву, которая с трудом стерилизуется и в ней при более низких режимах могут оставаться термостойкие споры.

Показаниям манометра в физических атмосферах соответствует определенная температура:

Давление, атм.	Температура, °C
0,5	112
1,0	121
1,5	128
2,0	134

Применение соответствующего метода стерилизации определяется физическими свойствами материала и целью исследования.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Для чего готовятся питательные среды?
2. Какие среды называются естественными и синтетическими?
3. Чем характеризуются селективные питательные среды?
4. Что такое пептон?
5. Что такое желатин и агар-агар?
6. На какие группы делят питательные среды по консистенции? Наличием какого вещества она определяется?
7. Назовите методы стерилизации и дайте их характеристику?
8. При каких условиях стерилизации бактерии погибают, а споры сохраняют свою жизнеспособность?
9. Что такое бактерицидный эффект? Примеры?
10. Что такое бактериостатический эффект? Примеры?
11. Чем отличаются споры и цисты? Какое время они сохраняют свою жизнеспособность?

### Лабораторная работа №4

#### *Определение численности микроорганизмов в почве и воздухе методом питательных пластин*

Почва обильно населена микроорганизмами и является основным источником их распространения, так как в ней имеются все необходимые условия для развития микроорганизмов. Она защищает микроорганизмы от губительного действия прямых солнечных лучей, снабжена в достаточной степени влагой, O<sub>2</sub>, органическими и минеральными веществами.

Воздух в отличие от почвы не является средой для обитания микроорганизмов, а лишь служит средой их переноса. В воздух бактерии

попадают вместе с поднявшейся пылью и, если не успевают быстро осесть, погибают от действия солнечных лучей. Поэтому микрофлора воздуха довольно случайна, так как зависит от микрофлоры почвы, над которой он находится. Количество микроорганизмов зависит от погоды (в дождливую меньше), времени года (летом больше) и места взятия проб (в помещении, на улице, на скотном дворе, в горах и т.д.)

По данным Войткевича А. Ф. в Арктике в  $1\text{ м}^3$  воздуха содержится от 1 до 10 клеток микроорганизмов, в морском воздухе 1-2 клетки, воздух городского парка – 200, улицы в городе – 5000, жилого помещения – 20000, скотного двора 1-2 млн. клеток.

### **Количественный учет микроорганизмов в почве методом питательных пластин**

В связи с интенсивным размножением микроорганизмов на питательной среде и затруднением в подсчете образующихся колоний метод питательных пластин применяют в сочетании с методом последовательного разведения.

#### **Ход работы:**

1. На стерильное часовое стекло стерильным шпателем берут навеску почвы в 1 г. Навеску почвы переносят в колбу на 250 мл с 99 мл стерильной воды. Смесь взбалтывают 5 минут, не смачивая пробки.

2. Стерильной пипеткой Мора берут 1мл суспензии, содержащей 0,01 г суспензии почвы, и перенося в пробирку с 9 мл стерильной воды. Пипетку неоднократно промывают водой в пробирке, чтобы смыть все клетки с ее стенок.

3. Из пробирки 1 мл суспензии переносят во 2-ю пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды. Пипетку неоднократно промывают водой в пробирке.

4. Из 2-й пробирки берут 1 мл суспензии и переносят в 3-ю пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды. Пипетку неоднократно смывают водой в пробирке. Разведение проводят последовательно до тех пор пока концентрация почвы в последней пробирке не составит 0,000001 (рис. 12).

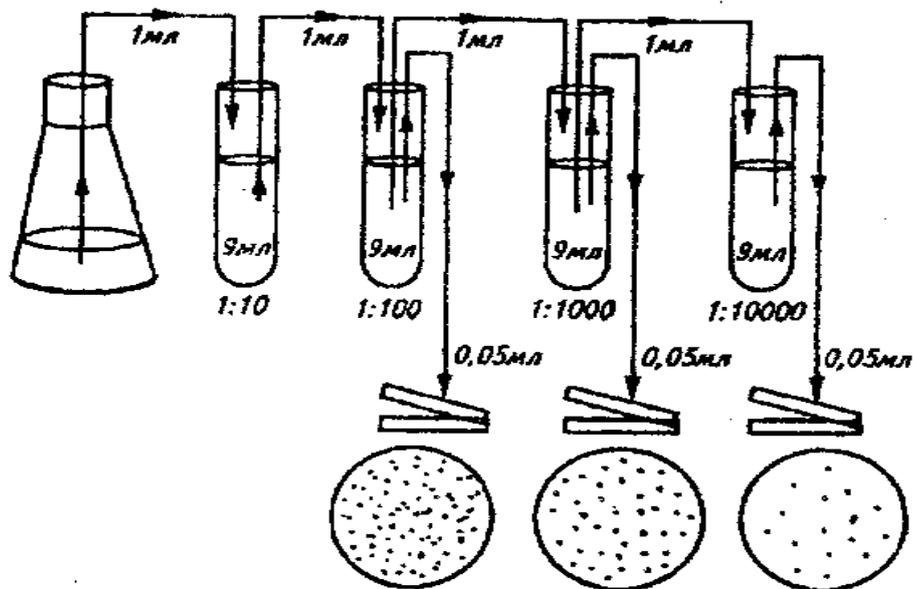


Рисунок 12 – Схема разведений из суспензии и посева на чашки Петри [9]

5. Из последнего разведения берут 1 мл суспензии и переносят в стерильную чашку Петри. Затем в нее вливают 20 мл заранее приготовленного МПА (температура агара должна быть примерно 45°C).

6. Осторожным круговым движением чашки, не смачивая крышки, агар перемешивают с суспензией. Чашки с застывшим агаром переворачивают вверх дном, чтобы избежать попадания на поверхность агара конденсационной воды с крышки и помещают в термостат при 28-30 °С на 5-7 дней.

7. Через 7 дней подсчитывают число колоний. Чтобы установить количество бактерий в 1 г почвы, число колоний в чашке Петри умножают на степень разведения.

8. Сделать вывод о количестве микроорганизмов в 1 г почвы.

## **Учет микрофлоры воздуха методом «оседания» Коха**

Наиболее простым, но недостаточно точным является метод Коха, заключающийся в оседании микроорганизмов на агаровую пластинку. Этим методом обнаруживают микроорганизмы, загрязняющие воздух различных помещений. Он заключается в том, что чашку Петри с питательной средой оставляют на определенное время открытой (поверхностный посев), а затем закрывают крышкой и ставят в термостат при температуре 37 °С, чтобы каждая клетка, попавшая на среду, образовала в результате размножения колонию. О степени загрязнения воздуха судят по количеству выросших колоний.

### **Ход работы:**

1. В стерильную чашку Петри залить 20 мл питательной среды МПА.
2. После застывания среды чашку Петри помещают в исследуемое помещение и оставляют в открытом состоянии 5 минут.
3. Чашку помещают в термостат при температуре 28-30°С на 5-7 дней.

### **Результаты опыта:**

Подсчет выросших колоний провести через определенное время после посева (для бактерий – через 2-3 суток, для грибов и дрожжей – 5-7 суток, для актиномицетов – 7-15 суток). Колонии считать, не открывая чашки Петри, и повернув их кверху дном. Каждую сосчитанную колонию пометить точкой с нижней стороны чашки Петри маркером или карандашом по стеклу. Записать общее количество колоний (А), выросших после посева.

### **Учет микроорганизмов в почве:**

При разведении 1 г почвы 1:10<sup>5</sup>. Для посева взяли объем суспензии равный 1 мл. Тогда количество микроорганизмов в 1мл исследуемой суспензии (N) будет составлять:

$$N = A \times 100000/1 \text{ млн. клеток в 1 мл исходной суспензии.}$$

Количество микроорганизмов, приходящихся на 1 г исследуемого материала:

$$I = N \times 100$$

### Учет микроорганизмов в воздухе:

Зная площадь дна чашки Петри ( $S=\pi R^2$ ), подсчитывают количество колоний, выросших на МПА, а затем делают пересчёт на  $1\text{ м}^3$  воздуха. По Омелянскому на поверхности среды размером  $100\text{ см}^2$  в течение 5 минут при спокойном состоянии воздуха оседает количество микроорганизмов, содержащихся в  $10\text{ л}$  воздуха ( $0,01\text{ м}^3$ ). По расчетам, сравнивая результаты анализа воздуха различных аудиторий, определить степень загрязнения воздуха. Результаты занести в таблицу 4.1.

Таблица 4.1 – Определение степени загрязнения воздуха в разных аудиториях

№ аудитории	Количество микроорганизмов в $1\text{ м}^3$ воздуха	Степень загрязнения воздуха

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какой посев называется глубинным? Как он проводится?
2. Какой посев называется поверхностным? Как проводится?
3. Какие среды используют для глубинного и поверхностного посева?
4. Почему нельзя сделать высев пробы почвы в питательную среду без предварительных разведений?
5. Как приготовить разведение почвы, навоза или других субстратов и как сделать высев суспензии в чашки Петри? Нарисовать схему.
6. При какой температуре следует разливать МПА в чашки Петри, в которые уже внесена суспензия соответствующего разведения анализируемого образца?
7. При какой температуре инкубируют чашки Петри с посевом в термостате?
8. Через сколько дней вырастают колонии микроорганизмов на МПА в чашках Петри после посева? Через сколько дней их лучше подсчитывать?
9. Что представляет собой отдельная выросшая колония? Откуда она

появляется?

10. Как определить количество бактерий в 1 г или одном мл субстрата?

11. Как рассчитывается количество бактерий в 1 м<sup>3</sup> воздуха?

12. Что такое морфологические признаки бактерий? Перечислить их.

13. Культуральные признаки микроорганизмов. Перечислите их.

14. Какое количество бактерий содержат: морской воздух, городской парк, арктический воздух, жилое помещение, скотный двор?

### **3. ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ БРОЖЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, НЕ СОДЕРЖАЩИХ АЗОТА**

#### **3.1 Характеристика процесса брожения**

Из трех возможных способов получения энергии гетеротрофными организмами брожение является наиболее древним и простым, очевидно, возникшим в условиях отсутствия кислорода в земной атмосфере. Регенерация АТФ осуществляется путем субстратного фосфорилирования в процессе расщепления органического субстрата, при этом продукты расщепления (органические вещества) служат одновременно донорами и акцепторами водорода. Универсальным переносчиком водорода является никотинамидаденин динуклеотид (НАД) или его фосфорилированная форма (НАДФ).

Сбраживание углеводов и других веществ часто начинается с гликолиза, проходящего по фруктозобисфосфатному пути с образованием пировиноградной кислоты. В зависимости от того, какие продукты преобладают или являются наиболее характерными, различают спиртовое, молочнокислое, пропионовокислое, муравьинокислое и маслянокислое брожение [4].

Пируват занимает центральное место в промежуточном метаболизме анаэробов. Лишь при молочнокислом брожении он является конечным акцептором водорода и превращается в лактат. В остальных случаях он преобразуется в другие продукты метаболизма (рис 13).

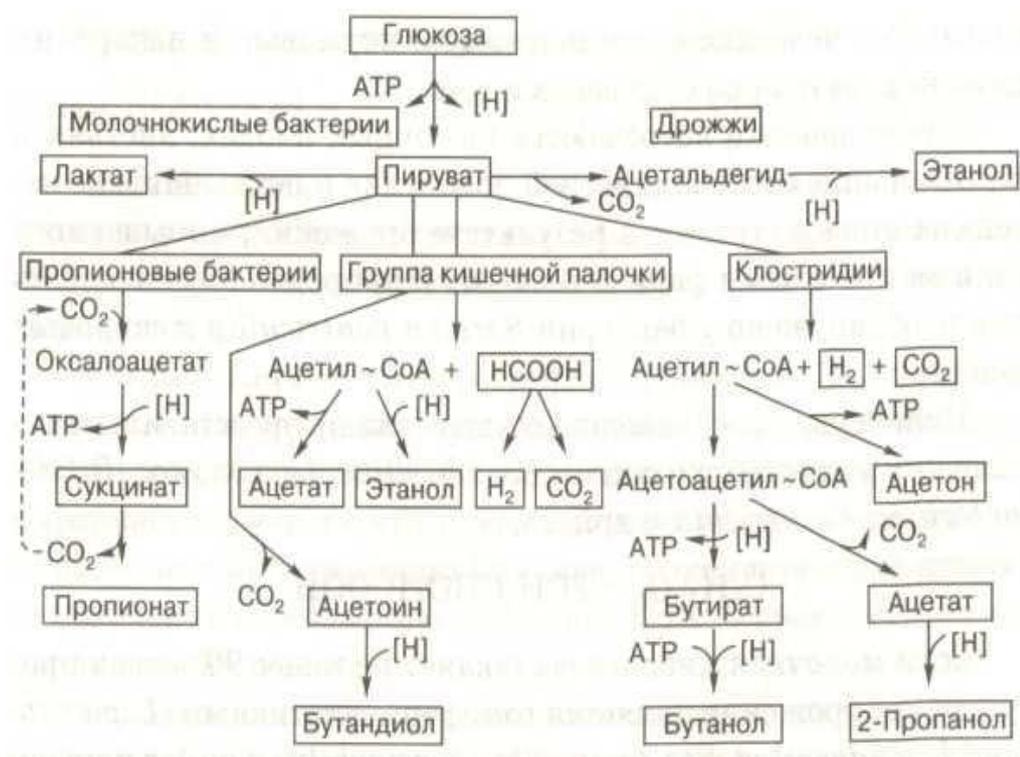


Рисунок 13 – Обобщающая схема важнейших типов брожения [39]

### 3.1.1 Спиртовое брожение

Спиртовое брожение лежит в основе винокурения, виноделия, пивоварения. В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль биологических разрыхлителей теста. При брожении образуется СО<sub>2</sub>, который увеличивает объем теста при выпечке хлеба. В хлебе появляется пористость. Превращение углеводов в спирт и углекислоту осуществляют одноклеточные грибы – дрожжи – представители рода *Sacharomyces*, которые принято делить на

расы:

- пекарские (*S.cerevisiae*, *S.minor*);
- винные (*S. vini*);
- пивные (*S.carisbergensis*, *S.cerevisiae*)
- спиртовые (*S.cerevisiae*).

Дрожжи винные и пивные вызывают низовое брожение (t до 15°C) без бурного процесса, дрожжевая клетка находится на дне бродящей жидкости. Хлебные дрожжи – верховое брожение (t до 25°C) с образованием пены, с бурным выделением CO<sub>2</sub>. Дрожжевые клетки при этом находятся на поверхности бродящей жидкости.

Сбраживание моно- и дисахаридов происходит по суммарному уравнению:



Наряду с основными продуктами брожения в незначительных количествах образуются побочные продукты: глицерин, уксусный альдегид, уксусная и янтарная кислоты, смесь высших спиртов (сивушные масла). В аэробных условиях дрожжи проводят полное окисление углеводов до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O и, таким образом, являются факультативными анаэробами.

Полное окисление сопровождается выделением большого количества энергии и накоплением большой биомассы, что используется человеком для получения кормовых и пекарских дрожжей, различных заквасок и т. п.

Дикие дрожжи встречаются на сочных плодах, листьях и растительных остатках, лесной подстилке и почве. Многие немецкие вина получают в результате брожения, вызываемого дикими дрожжами рода *Kloeckera*. В природе спиртовое брожение обнаружено у бактерий *Sarcina ventriculi* и мукоровых грибов [9, 13, 23].

### 3.1.2 Молочнокислое брожение

Молочнокислое брожение осуществляют представители нескольких родов: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* и другие. Уравнение брожения выглядит следующим образом:



Если молочная кислота составляет не менее 90% всех продуктов, то брожение является гомоферментативным (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, *Str. lactis*, *Str. thermophilus* и др.), в противном случае – гетероферментативным, сопровождающимся выделением дополнительно этилового спирта, уксусной кислоты, углекислого газа (*L. brevis*, *L. fermentum*, *Str. citrovorum* и др.). Молочнокислое брожение широко используется в пищевом производстве при получении кисломолочных продуктов, в квашении овощей, силосовании.

Распространение молочнокислых бактерий в окружающей среде определяется их потребностями в питательных субстратах и способом получения энергии только в процессе брожения. Поэтому такие организмы встречаются в молоке, на растениях или их остатках, в кишечнике и слизистых оболочках животных и человека. Высокая кислото- и спиртоустойчивость отдельных популяций позволяет им доминировать в указанных объектах, но, попадая в почву или воду, они лишаются необходимых факторов роста и быстро погибают [24, 16].

### 3.1.3 Пропионовокислое брожение

Пропионовокислое брожение осуществляют бактерии, имеющие общие свойства с возбудителями молочнокислого брожения – аспорогенные, неподвижные, грамположительные (отдел *Firmicutes*) палочки,

микроаэротолерантные, получающие энергию в процессе брожения. Вместе с тем для них характерны изменения формы (булавовидная, кокковидная и др.), особенно в неблагоприятных условиях обитания. Это представители рода *Propionibacterium*.

Суммарное уравнение брожения следующее:



Восстановление лактата или пирувата до пропионата проходит под контролем специфичных ферментов, при этом заслуживает внимания участие трех кофакторов (биотина, СоА и ко- фермента В<sub>12</sub>).

Биотин участвует в гетеротрофной фиксации СО<sub>2</sub> пропионовокислыми бактериями, карбоксилировании пирувата с образованием дикарбоновых кислот, СоА активизирует эти кислоты, а кофермент В<sub>12</sub> участвует в ключевой реакции превращения сукцинил-СоА в метилмалонил-СоА, декарбоксилирование которого приводит к образованию пропионил-СоА предшественника пропионовой кислоты.

Эти бактерии не встречаются в молоке, не выделяются из почвы и воды. Естественным местообитанием (экологической нишей) для них остаются рубец и кишечник жвачных животных, кишечник птиц, особенно его слепые отростки, кишечник многих млекопитающих и человека. Находясь в метабиотических отношениях с молочнокислыми бактериями, они восстанавливают лактат до пропионата, который, в свою очередь, как и другие жирные кислоты, включается в обменные процессы макроорганизма. Искусственной эконишей для бактерий могут служить твердые сычужные сыры, попадающие в молоко вместе с сычужными ферментами, так называемые классические пропионовокислые бактерии участвуют в созревании сыров.

В настоящее время по крайней мере четыре вида рода *Propionibacterium* относят к кожным, так как эконишей для них служит кожа и слизистые оболочки животных и человека. Обладая активными липазами,

эти организмы гидролизуют триглицериды салных желез, выделяют продукты обмена, порой раздражающие кожу и способствующие протеканию воспалительных процессов. Один вид – *P.propionicus* – обнаружен в почве. Образование высоких количеств витамина В<sub>12</sub> пропионовокислыми бактериями используется в промышленном масштабе для его производства [30].

### 3.1.4 Маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение осуществляют в основном облигатно анаэробные, грамположительные, спорообразующие, подвижные, палочковидные бактерии рода *Clostridium*.

Суммарное уравнение брожения следующее:



Типичным представителем маслянокислых бактерий, осуществляющих этот тип брожения является *Clostridium butyricum* (рис. 14) – крупная палочка (1-2×10 мкм). Молодые клетки этих бактерий имеют палочковидную форму, затем становятся веретеновидными (кlostридиями), поскольку в клетках формируется спора [30].

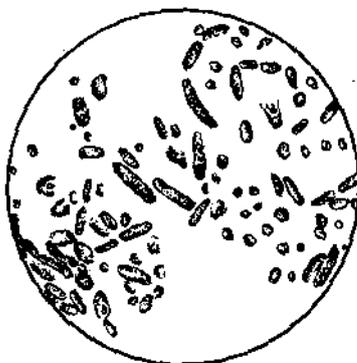


Рисунок 14 – Маслянокислые бактерии - *Clostridium butyricum*. [20]

Споры могут располагаться в клетке центрально или чаще субтерминально. Диаметр спор, как правило, больше диаметра клеток. Клетки спорообразующих анаэробов грамположительны, подвижны (перитрихи) [30].

В качестве источника углерода маслянокислые бактерии могут использовать моно- и дисахариды, некоторые полисахариды (декстрин, крахмал), молочную и пировиноградные кислоты, манит, глицерин и ряд других соединений. Источники азота – белки, пептон, аминокислоты, аммиачные соединения и даже молекулярный азот.

Род *Clostridium* имеет патогенные и сапрофитные формы. Сапрофитные маслянокислые бактерии широко распространены в почвах и других естественных субстратах.

<b>Сапрофитные маслянокислые бактерии</b>	<b>Патогенные маслянокислые бактерии</b>
- <i>Clostridium pasteurianum</i>	- <i>Clostridium botulinum</i>
- <i>Clostridium butyricum</i>	- <i>Clostridium tetani</i>
- <i>Clostridium felsineum</i>	- <i>Clostridium perfringens</i>

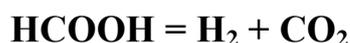
В природе маслянокислое брожение имеет большое значение как звено в цепи превращений соединений углерода. В то же время в ряде производств народного хозяйства маслянокислые бактерии могут наносить значительный ущерб, вызывая вспучивание сыров, прогоркание молока, порчу консервов, силоса, овощей, картофеля и других продуктов.

Вместе с тем масляная кислота требуется для некоторых промышленных целей и её получают на заводах, сбраживая специально подготовленные заторы чистой культурой маслянокислых бактерий. Образовавшуюся кислоту затем отделяют и очищают химическим методом.

Двухфазность брожения характерна для ряда видов, выделяющих наряду с бутиратом и ацетатом такие метаболиты, как бутанол, ацетон, этанол. Таким образом, *Cl.acetobutylicum* и другие виды, по мнению

исследователей этой группы бактерий, нейтрализуют ингибирующее действие бутирата и ацетата на клетки клостридий. Являясь космополитами, клостридии широко распространены в природе и различаются в отношении сбраживаемых субстратов. Их популяции встречаются в почве, придонном иле водоемов, участвуя в расщеплении олиго- и полимеров (крахмала, клетчатки, пектина и т. п.). Некоторые пептолитические виды могут быть возбудителями раневых инфекций (столбняк – *Cl.tetani*, газовая гангрена – *Cl.septicum*, *Cl.perfringens* и др.), пищевых отравлений (ботулизм – *Cl.botulinum*). Способность клостридий к азотфиксации была обнаружена С. Н. Виноградским (*Cl. pasteurianum*).

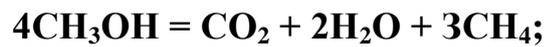
Способность некоторых микроорганизмов выделять при брожении органические кислоты: молочную, янтарную, уксусную, муравьиную и др., называют смешанным или муравьинокислым брожением. Такой способностью обладают и представители семейства *Enterobacteriaceae*. Например, *Escherichia coli* расщепляет пируват с образованием ацетил-СоА и формиата, при этом большинство штаммов кишечной палочки расщепляют муравьиную кислоту:



Описанные выше типы брожения называются первичными, так как организмы используют в качестве субстрата растительные и животные остатки – продукты биосинтеза: углеводы, органические спирты, кислоты, аминокислоты, белки и т. д.

При метановом брожении бактерии родов *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* и др. используют продукты брожения других (первичных) анаэробов:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и др. Поэтому метановое брожение называют вторичным, трофически тесно связанным с превращением органических веществ в анаэробных условиях. Суммарные уравнения следующие:





На основании изучения химического состава клеточных стенок, цитоплазматической мембраны, последовательности оснований в 16S рРНК и других признаков, метанообразующие бактерии относят к архебактериям (отдел *Mendosicutes*).

Биогаз и сам метан образуются в торфяниках, на дне водоемов, в затопленных, переувлажненных почвах (рисовые поля), в отстойниках очистных сооружений. Метанообразующие бактерии составляют последнее звено анаэробной пищевой цепи, вначале которой находятся углеводы, белки, липиды. Образующийся метан используется человеком как топливо, а сам процесс брожения оценивается как способ получения возобновляемого источника энергии – метана [15].

В заключение следует отметить, что выход энергии при протекании различных типов брожения небольшой (две молекулы АТФ) по сравнению с дыханием и анаэробным дыханием (до 38 молекул АТФ на одну молекулу окисленной глюкозы).

## Лабораторная работа №5

### *Спиртовое брожение*

#### **Ход работы:**

1. Приготовить питательную среду следующего состава, объемные проценты: сахароза- 15,0; пептон - 0,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - 0,3;  $\text{MgSO}_4$ - 0,1.

2. Налить 100 мл среды в колбу Эрленмейера и внести туда 0,5 г прессованных дрожжей. Закрыть ватной пробкой.

3. Колбу взвесить на технических весах с точностью до 0,01г и поставить в

термостат при 25-30°C на 7 дней.

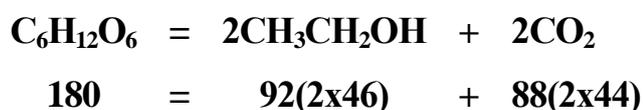
К условиям, способствующим развитию дрожжей, но препятствующим развитию других микроорганизмов и делающим питательную среду селективной для дрожжей можно отнести следующие:

- 1) высокую концентрацию сахара;
- 2) слегка кислую среду за счет  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;
- 3) анаэробные условия;
- 4) накопление в процессе опыта значительного количества спирта.

#### **Результаты опыта:**

4. Определить количество выделившегося  $\text{CO}_2$  по разнице в весе колбочки до и после опыта.

5. Исходя из уравнения спиртового брожения и учитывая массу выделившегося  $\text{CO}_2$ , рассчитать количество выделившегося спирта



Массу сброженного сахара можно определить по сумме образовавшегося спирта и углекислого газа.

6. Определить интенсивность брожения.

**Интенсивность брожения** это количество сброженного сахара в % от исходного за определенный промежуток времени.

7. *Микроскопирование дрожжей.* Бактериальной петлей взять каплю культуральной жидкости и приготовить прижизненный препарат «раздавленная капля» (см. занятие 2).

8. Зарисовать.

9. *Отгон этилового спирта.* Культуральную жидкость перенести в плоскодонную колбу на 800 мл соединенную с холодильником и нагреть на

плитке до кипения. Спирт, улетучиваясь с водой и охлаждаясь в холодильнике стекает в приемную колбу.

10. Качественная реакция на этиловый спирт. К 1-2 мл отгона прилить 1-2 мл крепкой серной кислоты и по каплям 1 % раствор двуххромовокислого калия до получения зелено-синей окраски.

11. Сделать выводы о протекании процесса брожения.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

- 1 Назовите возбудителей спиртового брожения?
2. Назовите элективные условия для спиртового брожения?
3. Дайте определение интенсивности спиртового брожения.
4. При каком рН протекает спиртовое брожение?
5. Какое брожение будут вести дрожжи, если реакцию среды сделать щелочной?
6. Какие конечные продукты образуются при спиртовом брожении?
7. Что произойдет с дрожжами, если аэрировать среду, в которой их выращивают?
8. Какие конечные продукты образуют дрожжи в аэробных условиях?
9. Чем характеризуются верховые дрожжи и где их применяют?
10. Чем характеризуются низовые дрожжи и где их применяют?
11. К каким микроорганизмам - аэробам, анаэробам или факультативным анаэробам относят дрожжи?
12. Какие соединения входят в состав сивушных масел?

*Домашнее задание:* заполнить таблицу 2 «Участие микроорганизмов в круговороте углерода в природе».

Таблица 5.1 – Участие микроорганизмов в круговороте углерода в природе

Виды брожений и окислений	Возбудители процессов брожения и окисления	Динамика процессов брожения и окисления		Условия, благоприятствующие течению процесса	Значение процессов в природе, в сельском хозяйстве
		исходные продукты	конечные продукты		
Молочнокислое					
Спиртовое					
Уксуснокислое					
Маслянокислое					
Окисление: - клетчатки					
-пектиновых веществ					

### Лабораторная работа №6

#### *Маслянокислое брожение углеводов*

Возбудители маслянокислого брожения были открыты Луи Пастером в 1861 году.

Для изучения маслянокислого брожения ставят опыт на среде с картофелем.

#### **Ход работы:**

1. Сырой неочищенный картофель нарезать мелкими кубиками, заполнить ими 1/3 высокой пробирки, добавить немного мела (для нейтрализации образующейся масляной кислоты), залить водопроводной водой до пробки.

2. Пастеризовать пробирки на водяной бане при 80 °С в течении 10 мин.

3. Культивировать в термостате при 28-30 °С в течении 7 дней.

4. После окончания культивирования сделать вывод об интенсивности брожения (отметить выделение пузырьков CO<sub>2</sub> и N на поверхности).

Культуральную жидкость использовать для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

5. *Микроскопирование.* Из середины пробирки пипеткой взять каплю культуральной жидкости и приготовить прижизненный препарат «раздавленная капля»:

- нанести каплю культуральной жидкости на предметное стекло,
- к накопительной культуре добавить каплю раствора Люголя,
- накрыть покровным стеклом и микроскопировать. В тех местах клетки, где содержится гранулеза, возникает темно-синее окрашивание.

6. Сделать качественную реакцию на масляную кислоту. Получение масляноэтилового эфира (ананасовой эссенции). К 3-5 мл культуральной жидкости в пробирке прибавить 0,5 мл 96 % этилового спирта и 1-2 мл крепкой серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах эфира (запах ананаса). Реакция протекает по уравнению:



7. Зарисовать бактерии. Записать возбудителей брожения (латынь). Сделать вывод.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите возбудителей маслянокислого брожения?
2. Назовите виды маслянокислого брожения?
3. Где распространены маслянокислые бактерии?
4. Как относятся маслянокислые бактерии к кислороду?
5. Какие источники углерода могут использовать маслянокислые бактерии?
6. Какие источники азота могут использовать маслянокислые бактерии?
7. Почему маслянокислые бактерии относятся к облигатным анаэробам?
8. Какое запасное вещество накапливают маслянокислые бактерии в почвах?
9. Как создать элективные условия для маслянокислого брожения?

10. Какие конечные продукты образуются при маслянокислом брожении?

11. Почему маслянокислые бактерии устойчивы к высоким температурам и другим условиям внешней среды?

### 3.2 Характеристика процесса дыхания

Согласно биохимической характеристике дыхание – окислительно-восстановительный процесс, в котором роль донора водорода играет органическое вещество, а роль акцептора – свободный кислород (O<sub>2</sub>).

Дыхание и брожение имеют общий начальный этап преобразования углеводов – гликолиз, что указывает на филогенетическую связь этих типов окисления. Однако, в отличие от брожения, пируват не превращается в продукты брожения, а подвергается дальнейшему окислению: сначала в цикле Кребса, а затем выделяющийся из цикла водород поступает в дыхательную цепь, где через ряд переносчиков соединяется с O<sub>2</sub> и образует H<sub>2</sub>O. Углекислый газ, выделенный в реакциях декарбоксилирования цикла Кребса, является максимально окисленной формой углерода. Суммарное уравнение дыхания следующее:



Большое количество АТФ, синтезируемое в процессе дыхания, объясняется более эффективной регенерацией АТФ в дыхательной цепи за счет энергии транспорта электронов через мембрану (окислительное фосфорилирование). При переносе 2H от NADH<sub>2</sub> (НАДН<sub>2</sub>) на O<sub>2</sub> только три электронных перехода сопряжены с фосфорилированием АДФ в АТФ, т. е. P/O = 3. Это позволяет составить энергетический баланс окисления глюкозы, например, идущему по фруктозобисфосфатному пути далее через цикл Кребса и дыхательную цепь [37].

Итак, на 1 моль утилизированной клеткой глюкозы образуется:

- во фруктозобисфосфатном пути – 2 моль НАДН<sub>2</sub>;
- при дегидрировании пирувата – 2 моль НАДН<sub>2</sub>;
- в цикле Кребса – 2 3 моль НАДН<sub>2</sub> и 2 моль ФАДН<sub>2</sub>.

Всего образуется 10 моль НАДН<sub>2</sub> и 2 моль ФАДН<sub>2</sub>. При коэффициентах P/O, равных для окисления НАДН<sub>2</sub> и ФАДН<sub>2</sub> 3 и 2 соответственно, получается число синтезируемых молей АТФ:  $10 \cdot 3 + 2 \cdot 2 = 34$ .

К этому числу надо добавить 2 моль АТФ, синтезируемых во фруктозобисфосфатном пути, и 2 моль, образующихся при превращении сукцинил-СоА в сукцинат в цикле Кребса. В итоге получим 38 моль АТФ, что соответствует уравнению дыхания. Таким образом, дыхание с энергетической точки зрения намного эффективнее брожения и позволяет клетке наиболее полно окислять поглощенный субстрат. Богатые энергией продукты брожения, не используемые самими микробами: спирт, кислоты, альдегиды, кетоны – давно привлекли внимание человека и находят широкое применение в различных отраслях (виноделие, пивоварение, хлебопечение, получение кисломолочных продуктов, квашение овощей, силосование, получение метана и др.).

Эволюция дыхания, как и любого другого жизненно важного процесса, давно интересовала ученых. В дыхательной цепи аэробов есть пиридиннуклеотиды [НАД(Ф)], флавопротеиды [ФАД], встречающиеся у анаэробов, что может указывать на их филогенетическую связь. Но большое разнообразие цитохромов в дыхательной цепи аэробов вряд ли можно объяснить независимым возникновением таких переносчиков электронов в каждой группе анаэробных бактерий. Австралийский профессор физической химии, специалист в области энергетики, химии и биологии Э. Брода рассматривает гипотезу конверсии, объясняющую появление аэробных бактерий. Суть ее заключается в том, что все дышащие бактерии произошли от фотосинтезирующих. В основе механизмов дыхания и

фотосинтеза лежат упорядоченные ферментные ансамбли, связанные с мембранами, обеспечивающие поток электронов, – это флавопротеиды, цитохромы, негеминовые белки, содержащие серу. Переключение фотосинтетической цепи на дыхательную в эволюции обеспечило гибкость и разнообразие последней, что имело адаптивную ценность [21].

Моделями для понимания перехода от фотосинтеза к дыханию могут служить несерные пурпурные бактерии, представляющие собой факультативные анаэробы среди фотоорганотрофов (род *Rhodospseudomonas*), имеющие структурное и функциональное родство фотосинтезирующей и дыхательной систем. Утрата способности к фотосинтезу у сине-зеленых водорослей (цианобактерий), возможно, привела к появлению бесцветных «скользящих бактерий» – аэробных гетеротрофов.

Молочнокислые бактерии, толерантные к кислороду, микроаэрофильны, что вполне согласуется с присутствием у некоторых из них компонентов дыхательной системы гемопротеидов, что характерно и для некоторых пропионовокислых бактерий. В связи с этим некоторые исследователи не исключают появление этих бактерий в процессе регрессии их из аэробного состояния [16].

Вопросы физиологии, биохимии и таксономии пропионовокислых бактерий подробно освещены в трудах крупнейшего специалиста в этой области, профессора Л. И. Воробьевой. Было показано, что окислительная активность многих штаммов пропионовокислых бактерий не ограничивается брожением, в них функционируют ферменты цикла Кребса, дыхательной цепи (флавопротеины, цитохромы), а антиокислительную защиту при контакте клеток с кислородом обеспечивает супероксиддисмутаза, характерная для многих аэробных и аэротолерантных организмов. Пропионовокислые бактерии представляют эволюционную ветвь, восходящую от актиномицетного предка, что не исключает их

родство с аэробными прокариотами.

### ***3.2.1 Характеристика процесса анаэробного дыхания***

Анаэробное дыхание рассматривают как окислительно-восстановительный процесс, в котором роль донора водорода играет органическое вещество, а роль акцептора – связанный кислород. Отличие этого типа окисления от собственно дыхания лишь в том, что в анаэробных условиях, в отсутствие  $O_2$ , микроорганизмы способны переносить электроны на нитраты, сульфаты, а также на другие неорганические соединения ( $S$ ,  $Fe^{3+}$  и др.).

Энергетическая ценность анаэробного дыхания несколько ниже собственно дыхания, и у разных организмов может составлять в среднем 60-70%, но синтез АТФ намного превышает таковой при брожении за счет функционирования цикла ди- и трикарбоновых кислот (цикла Кребса) и дыхательной цепи, на конце которой вместо свободного кислорода находится связанный или другие неорганические акцепторы электронов [21].

Поглощение нитратов может сопровождаться ассимиляционной нитратредукцией (восстановлением их до аммиака и синтезом азотсодержащих соединений) и диссимиляционной (нитраты восстанавливаются, выполняя функцию конечных акцепторов водорода при «нитратном дыхании»). Последний процесс называют также денитрификацией, он будет рассмотрен далее как одна из стадий круговорота азота.

Аналогичным образом проходит «сульфатное дыхание», продуктом которого при полном восстановлении сульфатом является в первую очередь  $H_2S$ :



Большая часть  $H_2S$  в природе образуется благодаря этой реакции. В отличие от нитратредуцирующих, сульфатредуцирующие бактерии являются строгими анаэробами, среди них широко распространены аспорогенные формы (род *Desulfovibrio*) и спорообразующие (род *Desulfotaculum*). Подобные организмы считаются ответственными за высокое содержание  $H_2S$  в глубинах Черного моря (> 200 м). Отложения биогенной серы в Северной Америке считают также результатом деятельности древних сульфатредукторов, восстанавливавших сульфаты в далекие геологические эпохи.

Обсуждая происхождение сульфатного дыхания, ученые склонны поставить этот процесс на второе место после фотосинтеза серных бактерий, приведшего к накоплению сульфатов в условиях анаэробной атмосферы Земли.

Некоторая аналогия, просматриваемая между анаэробным дыханием и восстановлением карбоната до метана метанообразующими бактериями, не дает основания называть последнее «карбонатным дыханием», так как метаногенные организмы не имеют механизмов потока электронов и не содержат цитохромов. Высказано предположение, что метанообразующие бактерии древнее фотосинтезирующих и тем более дышащих организмов [37].

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как выполняется общий закон увеличения энтропии для живых систем?
2. Сформулируйте первый закон термодинамики в применении к живому организму.
3. Перечислите возможные способы получения энергии

гетеротрофными организмами.

4. Какое соединение является универсальным переносчиком энергии в живом организме?
5. Какие механизмы биологического окисления вы знаете и какой из них более универсален?
6. Какое определение брожению дал Л. Пастер?
7. Дайте определение термину «дыхание».
8. Какое органическое соединение занимает центральное место в промежуточном метаболизме анаэробов?
9. Какие ферменты участвуют в цикле трикарбоновых кислот?
10. Какие существуют типы биологического окисления?
11. Какие типы брожения относят к первичным?
12. Какой тип брожения вторичен и почему?
13. Каков энергетический баланс окисления глюкозы при брожении и дыхании?

#### **4. ИЗУЧЕНИЕ ПРЕВРАЩЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ ОРГАНИЧЕСКИХ И МИНЕРАЛЬНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ**

##### ***4.1 Превращение соединений азота, серы и других элементов***

Наряду с углеродом *азот* – один из важных биофильных элементов, поскольку входит в состав основных полимеров – белков, играющих структурную и каталитическую функции в клетке; нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), отвечающих за сохранение, передачу и реализацию наследственной информации; аденозинфосфатов, играющих ключевую, универсальную роль в энергетическом обмене и т. д.

На нашей планете большие запасы азота представлены газообразными формами ( $N_2$ ,  $NH_3$ ,  $N_2O$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ) в атмосфере, а также в почвенном воздухе. Молекулярный азот составляет 78,09% по объему или 75,6% по массе всех атмосферных газов и является практически неисчерпаемым источником этого элемента для азотфиксирующих организмов.

Иммобилизованный азот гумуса и микробной биомассы в почве почти в три раза больше запасов азота в составе растений и животных, вместе взятых. Вынос азота из почвы с урожаем превышает 100 млн. т/год, а производство минеральных азотных удобрений составляет 60-70 млн. т/год (по азоту) и является энергоемким, а значит, дорогим производством, учитывая и тот факт, что эффективность использования удобрений растениями не превышает 50%. Применение неоправданно высоких доз удобрений может вести к загрязнению окружающей среды, в первую очередь грунтовых вод и открытых водоемов. Проблема азота, по мнению многих ученых, является социально-экологической, так как с ней связаны задачи жизнеобеспечения людей продовольствием, охраны окружающей среды, сохранения потенциального плодородия почв [29].

Круговорот азота в природе состоит из нескольких звеньев, в которых основную роль играют микроорганизмы, обитающие в почве и водоемах (рис. 15). Уникальными по своему химизму являются трансформации азота, осуществляемые только прокариотами. Это касается прежде всего процессов нитрификации и азотфиксации, осуществляемых хемолитоавтотрофами и diaзотрофами соответственно.

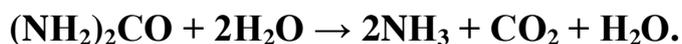
Разложение органических азотсодержащих соединений до аммиака и других более простых структур называется аммонификацией и осуществляется в почве, воде, навозохранилищах, аэро- и метантенках, отстойниках очистных сооружений бактериями (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *E.coli* *Proteus* и др.), актиномицетами (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* и др.), микромицетами (*Mucor*, *Aspergillus*,

*Penicillium, Rhizopus, Alternaria, Fusarium* и др.).

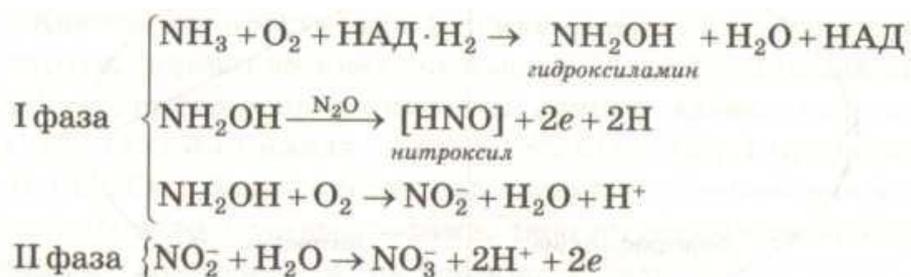


Рисунок 15 – Основные стадии круговорота азота [36]

Разложение микробами мочевины, выделяемой животными и человеком, имеет существенное значение в ее детоксикации в планетарном масштабе:



Аммиак и ионы аммония используются растениями, почвенной биотой и могут быть окислены в условиях достаточной аэрации почвы нитрифицирующими бактериями до нитратов и нитритов:



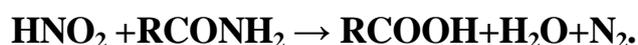
Двухфазность нитрификации и ее возбудители впервые описаны С. Н.

Виноградским в конце XIX в. Процесс охарактеризован как «минеральное дыхание» (хемосинтез), а микроорганизмы отнесены к хемолитоавтотрофам (I фаза – род *Nitrosomogas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* и др. II фаза – род *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira*).

В кислых почвах автотрофная нитрификация подавлена, аммиак окисляется гетеротрофными бактериями и грибами. Этот процесс не связан с энергетическим метаболизмом, и активность его на несколько порядков ниже, чем у автотрофов. Гетеротрофная нитрификация имеет место в условиях обилия органических веществ (компостные кучи, аэротенки, евтрофные водоемы), где автотрофные популяции не развиваются.

Нитраты далее используются растениями, вымываются в водоемы, иммобилизуются микроорганизмами в процессе ассимиляторной нитратредукции, восстанавливаются до газообразных продуктов в результате диссимиляторной нитратредукции, т. е. денитрификации [36].

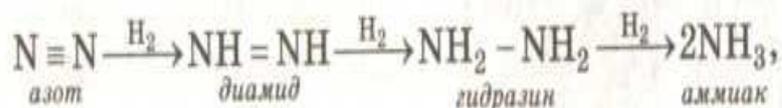
Денитрификация – анаэробный процесс восстановления нитритов и нитратов до газообразных форм – NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, активно протекающий в переувлажненной почве, ризосфере растений, водоемах. Прямая денитрификация проводится большой группой таксономически разнородных организмов и по своей сути является примером анаэробного дыхания. Косвенная денитрификация включает некоторые реакции, идущие вне клеток микроорганизмов, например взаимодействие нитритов с аминокислотами, выделяемыми за пределы клеток:



Достаточно остро стоит проблема потери азота из почвы: 270-300 млн.т. N<sub>2</sub> ежегодно поступает в атмосферу. По масштабу этот процесс сравним с азотфиксацией. Другая проблема образование N<sub>2</sub>O (закиси азота), с которой связывают такое явление, как разрушение озонового слоя в стратосфере. В целом для природы денитрификация – это восстановление баланса азота в атмосфере и предупреждение накопления нитратов в

водоемах, вымываемых из почвы.

Азотфиксация – процесс усвоения молекулярного азота, перевода его в связанное состояние некоторыми микроорганизмами – diaзотрофами. Суммарная годовая продукция азотфиксации в экосистемах составляет, по подсчетам ученых, 175-190 млн т. Механизм азотфиксации восстановительный и, по-видимому, напоминает по хронологии промышленный синтез  $\text{NH}_3$ :



где перевод молекулы  $\text{N}_2$  в две молекулы  $\text{NH}_3$  требует 225 ккал. Процесс идет при высоких давлениях и температурах [36].

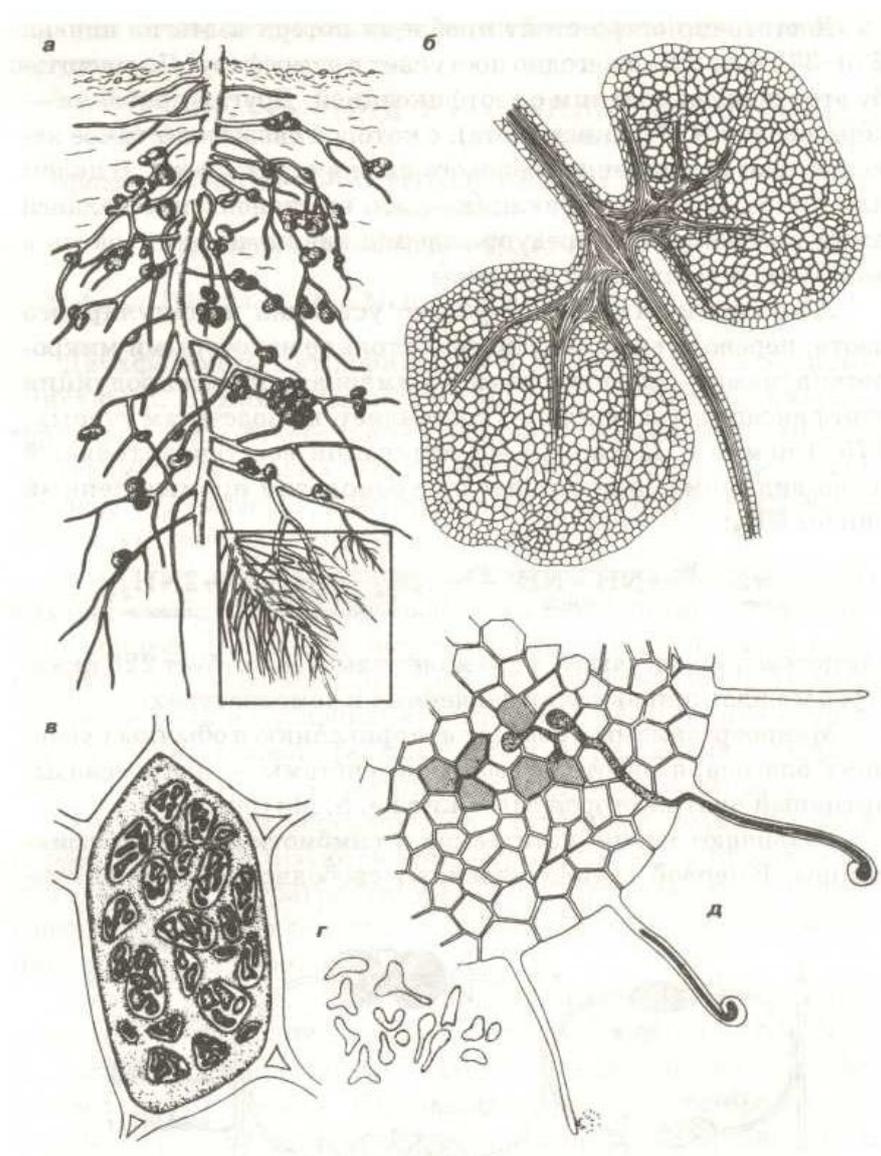
Микроорганизмы проводят азотфиксацию в обычных условиях благодаря работе ферментной системы – нитрогеназы, активный центр которой содержит Fe, S, Mo.

Различают несимбиотические и симбиотические азотфиксаторы. В первой группе выделяют свободноживущие (*Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Derxia*, *Beijerinckia* и др.) и ассоциативные, связанные с ризосферой растений (*Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* и др.).

К симбиотическим относят прокариоты, внедряющиеся в клетки корня, стимулирующие их деление, ведущее к образованию клубеньков (рис. 16).

Возникают они при инфицировании корневой системы бактериями из рода *Rhizobium* и близких родов. Заражение корневой системы происходит через молодые корневые волоски. После внедрения бактерии прорастают внутри них в виде инфекционной нити. Выросшие нити проникают сквозь стенки эпидермиса в кору корня, разветвляются и распределяются по клеткам коры. При этом индуцируется деление клеток хозяина и разрастание тканей. В месте локализации бактерий на корне растения-

хозяина образуются клубеньки, в которых бактерии быстро размножаются и располагаются по отдельности или группами в цитоплазме растительных клеток [21].



*а* — корень гороха с клубеньками; *б* — клубеньки в разрезе; *в* — растительная клетка, заполненная бактериями (*Rhizobium*), в разрезе; *г* — бактерии, находящиеся в клетках растений, приобретают необычную форму; *д* — внедрение бактерий через корневые волоски, рост инфекционных нитей.

Рисунок 16 – Симбиотическая фиксация азота в корневых клубеньках бобовых растений [39]

Внутри клеток растений бактерии фиксируют  $N_2$ . Симбионты характерны для бобовых растений: для сои – *Bradyrhizobium japonicum*, для козлятника — *Rhizobium galegae*, для люцерны – *Rh. meliloti*, для гороха – *Rh. leguminosarum*, для клевера – *Rh. trifoli* и т. д.

Небобовые растения также вступают в симбиоз с азотфиксирующими микроорганизмами, например актиномицетами рода *Frankia*. Значение азотфиксации для пополнения запасов азота в почве, водных экосистем трудно переоценить, большую роль в этом процессе отводят цианобактериям [23].

Молекулярный азот фиксируют бактерии, осуществляющие кислородный и анаэробный фотосинтез. Фиксация азота имеет сходство с фотосинтезом в том смысле, что в обоих случаях неорганическое вещество атмосферы ( $CO_2$  и  $N_2$ ) превращается в органическое и оба эти свойства часто бывают ассоциированы в одном организме. Фиксация азота обнаружена у представителей 25 родов цианобактерий, у большинства зеленых и у всех пурпурных. Среди хемотрофов фиксация азота обнаружена у большого числа родов анаэробных, факультативно анаэробных, микроаэрофильных и аэробных бактерий. Диязотрофия встречается как у хемоорганотрофов, так и у литотрофов, например у *Thiobacillus* – коринебактерии, утилизирующей молекулярный водород. Недавно у бактерий обнаружена связь между окислением молекулярного водорода и фиксацией азота. Некоторые свежесделанные водородокисляющие бактерии, например *Xanthobacter autotrophicus* и *Alcaligenes latus* и др., фиксируют азот. Более того, установлено, что известные фиксаторы азота – *Bradyrhizodiu japonicum* и *Derxia gummosa* могут расти хемоавтотрофно, используя молекулярный водород, как донор электронов, и, по крайней мере, у некоторых штаммов автотрофный характер метаболизма выражен только в условиях фиксации  $N_2$ , но не в присутствии связанных форм азота. Диязотрофия не распространена среди всех представителей рода и даже вида. Фиксацию азота осуществляют

свободноживущие и симбиотические формы, живущие в симбиозе, с высшими растениями. Различают две основные формы азотфиксирующего симбиоза: облигатный симбиоз (с образованием клубеньков) и ассоциативный симбиоз.

В облигатном симбиозе со стороны бактерий выступают клубеньковые у бобовых растений и актиномицеты в клубеньках корней у 13 видов покрытосеменных, главным образом древесных пород. Встречаются клубеньки и на корнях злаков. Патогенная для человека *Klebsiella* фиксирует  $N_2$  в симбиозе с тропическими растениями. Большая часть типов, ранее относимых к обязательным симбионтам, как оказалось, в определенных условиях может фиксировать  $N_2$  независимо от растения, но все-таки несколько облигатных симбионтов осталось: это большая часть штаммов *Rh. meliloti* и *Rh. leguminosarum*. Ассоциативный симбиоз – это ассоциация с корнями или проникновение в корни растений свободноживущих азотфиксаторов. Фиксация  $N_2$  не обязательно с корневой системой растений. Например, цианобактерия *Azolla*, азотфиксация идет в узелках листьев некоторых растений, зараженных клебсиеллой. Бактерии рода *Rhizobium* относятся к клубеньковым азотфиксаторам, и это их свойство активно используется на практике. Из  $175 \times 10^7$  т. Поэтому считаю, что культивирование клубеньковых бактерий служит главным способом увеличения количества фиксированного азота.

Известны симбиозы цианобактерий родов *Anabaena*, *Nostoc* с водными папоротниками. Кроме этого, объектом исследований становятся симбиозы diazотрофных бактерий с животными – с насекомыми (термиты, тараканы), грызунами и жвачными [21].

В настоящее время на основе многих упомянутых выше микроорганизмов созданы земледобрительные биопрепараты. Характеризуя перспективы исследований азотфиксации, профессор М. М. Умаров пишет: «Овладение микробной азотфиксацией позволит решить не только проблему

снабжения человечества продовольствием, но и обеспечит сохранение природной среды на планете». Приток биологического азота исчисляется от десятков до нескольких сотен килограмм (по азоту) на гектар в год и не связан с загрязнением окружающей среды, так как основан на деятельности естественных микробоценозов самой почвы, водной системы или интродуцированных человеком.

Как и *азот, сера* – биофильный элемент, необходимый любой живой клетке. Она входит в состав некоторых аминокислот (цистеин, метионин), витаминов (биотин), коферментов (коэнзим А), активного центра нитрогеназы и других ферментов. Молекулярная сера и  $H_2S$  служат источниками энергии для серных бактерий, впервые описанных как хемоавтотрофы С. Н. Виноградским. Кроме этого,  $H_2S$  – источник электронов для анаэробных фототрофов – обитателей водных экосистем.

Ежегодно от 10 до 80 кг серы выносятся с урожаем с каждого гектара сельхозугодий. Запасы серы в почве пополняются как с внесением удобрений, так и в результате разложения остатков животных, растений и микроорганизмов. При этом в почву поступают аминокислоты, тиоспирты, тиофенолы, тиозфиры и гетероциклы. Хозяйственная деятельность человека приводит к попаданию в почву после сжигания топлива газообразной двуокиси серы ( $SO_2$ ) или серной кислоты ( $H_2SO_4$ ) вместе с осадками – кислотными дождями. Сера вовлекается в биологический круговорот и в результате разработки и добычи полезных ископаемых, в частности пирита ( $FeS_2$ ), халькопирита ( $CuFeS_2$ ), галенита ( $PbS$ ), сфалерита ( $ZnS$ ), киновари ( $HgS$ ), молибденита ( $MoS_2$ ). Окисленная форма серы встречается в составе гипса ( $CaSO_4 \times 2H_2O$ ), мирабилита ( $Na_2SO_4 \times 10H_2O$ ), барита ( $BaSO_4$ ) и других минералов [21].

В наземных и подводных гидротермах найдены как аэробные микробные сообщества, способные к окислению восстановленных

вулканических газов, в том числе  $\text{H}_2\text{S}$  кислородом, так и анаэробные сообщества хемолитотрофных микробов, в большинстве своем архебактерий, основными продуктами обмена, которых являются  $\text{CH}_4$  и  $\text{H}_2\text{S}$ . Эти сообщества формируются вблизи газовых выходов на дне океана, называемых сульфидными каминами, «черными курильщиками», высотой 3-10 м, из которых изливается горячая вода (до  $380^\circ\text{C}$ ), содержащая  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  на глубине более 2,5 км.

Цикл превращений серы сходен с циклом азота, так как включает окислительные и восстановительные звенья, а также превращения серы без изменения валентности. Следует отметить, что аэробная микрофлора воды и почвы проводит процесс сульфатации, окисляя восстановленные соединения серы, выделяет сульфиты и сульфаты, поглощаемые затем планктоном и растениями [17].

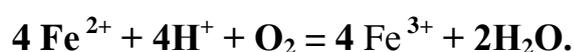
*Thiobacillus ferroxidans* используют в биогидрометаллургии для выщелачивания серных руд. Экзогенные месторождения серы формируются с участием серобактерий. В анаэробных условиях (стоячие водоемы, заиленные водохранилища, почвы рисовых полей) сульфиты и сульфаты восстанавливаются до  $\text{H}_2\text{S}$ , весьма токсичного для многих организмов, в том числе для корневой системы растений. Этот процесс называют десульфатацией, или сульфатредукцией.

*Фосфор* входит в состав макромолекул – нуклеиновых кислот, аденозинфосфатов, фосфолипидов микробных клеток. В растительных и животных остатках, в гумусе, торфе, навозе.

Фосфор входит в состав фитина, лецитина, фосфорных эфиров сахаров, нуклеиновых кислот и т. п. Благодаря работе микробных ферментов фитаз, фосфолипаз, фосфатаз, нуклеаз из указанных соединений освобождается  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – доступная форма фосфора для растений и микроорганизмов. Это очень важный процесс с учетом того, что коэффициент использования растениями фосфора из минеральных удобрений низкий – 15-20%, и фосфор

всегда находится в дефиците даже в хорошо удобренных почвах в связи с переходом фосфатов в состав недоступных (часто нерастворимых) органических и минеральных соединений. В качестве фосфорных удобрений в агроценозах чаще применяют фосфориты  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  и апатиты  $[\text{Ca}(\text{OH})_2 \times 3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ , фосфор которых мобилизуется благодаря действию кислот. Азотную кислоту выделяют нитрификаторы, серную – тионовые бактерии, масляную, уксусную, муравьиную, угольную выделяют возбудители брожения и дыхания. Большую роль в мобилизации фосфора играют микоризные грибы и лишайники. Таким образом, почвенная микрофлора обеспечивает функционирование главного движущего звена в вовлечение фосфора в биологический цикл [18].

Занимая второе место по содержанию в литосфере, железо активно мигрирует в земной коре. Железобактерии это группа – микроорганизмов разного систематического положения, автотрофов и гетеротрофов, однако в конце XIX в. С. Н. Виноградский охарактеризовал этим термином узкую группу автотрофных бактерий, использующих энергию окисления закисного железа в окисное для хемосинтеза. Ацидофильные автотрофные железобактерии (*Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfolobus acidocaldarius* и др.) обитают в подземных водах сульфидных месторождений, железистых источниках, торфяниках. Гетеротрофные железобактерии представлены нитчатými формами, образующими слизистые чехлы, содержащие окисленное железо (*Leptothrix*, *Sphaerotilus*), флексибактериями (*Spirothrix*), стебельковыми олиготрофными (*Seliberia*) и типичными почвенными бактериями (*Arthrobacter siderocapsulatus*). Скопления гидроокисей  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  охристого цвета в водоёмах и почвах связывают с деятельностью железобактерий:



Бактерии родов *Metallogenium*, *Siderocapsa* наряду с окислением закисного железа в окисное инкрустированы и диоксидом марганца ( $\text{MnO}_2$ ).

Происхождение железных и марганцевых руд может быть связано с деятельностью древних микроорганизмов [18].

Согласно академику Г. А. Заварзину [17], биогеохимическая машина планеты представляется системой взаимосвязанных циклов элементов. Эти циклы действуют как в планетарном масштабе, так и в конкретных ландшафтах-экосистемах. Общим правилом служит тезис «циклы в циклах».

Ведущим является цикл органического углерода с первичной продукцией (фотоавтотрофная ассимиляция  $\text{CO}_2$ ) и органотрофной деструкцией (см. рис. 17). С ним сопряжены анаболические циклы азота и фосфора. Катаболический цикл серы и в прошлом, по-видимому, цикл железа обуславливают деструкцию  $\text{C}_{\text{орг}}$ . Химическое выветривание изверженных пород ускоряется биотически опосредованными реакциями с ведущей ролью углекислоты.

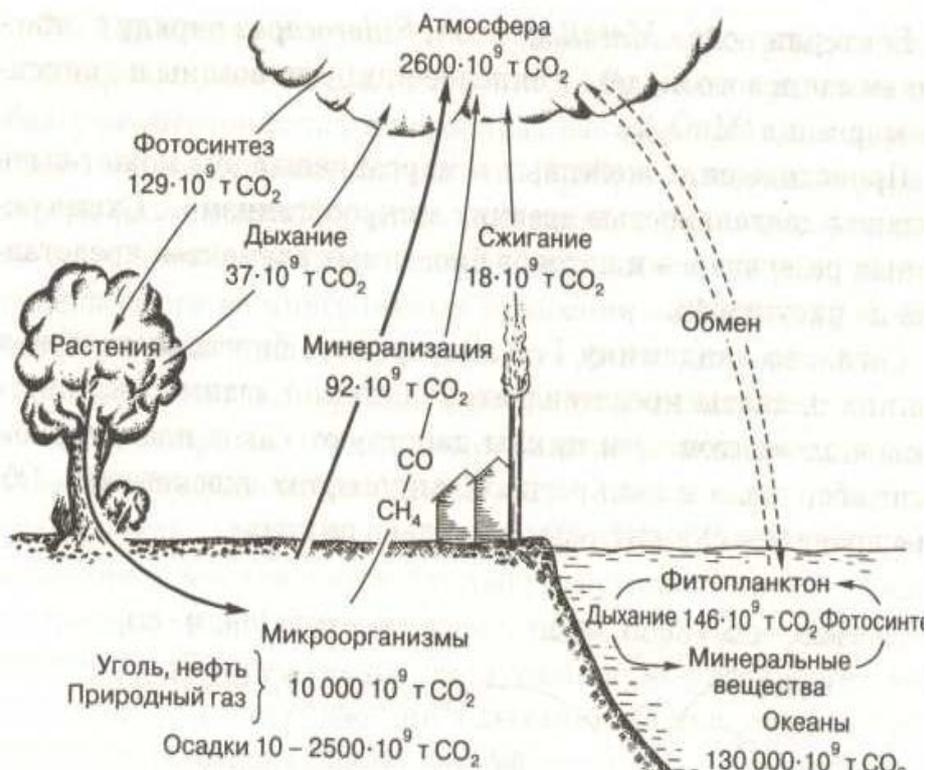


Рисунок 17 – Круговорот углерода в природе [39].

Цикл азота сопряжен с циклом органического углерода соотношением  $C_{орг}:N_{орг} = 6:1$  для синтеза биомассы; в нем происходят также превращения неорганических форм азота (см. рис. 18).

Роль микроорганизмов в цикле азота указана выше. Цикл фосфора стехиометрически связан с циклом органического углерода в отношении  $C:P > 100:1$  в анаболических реакциях.

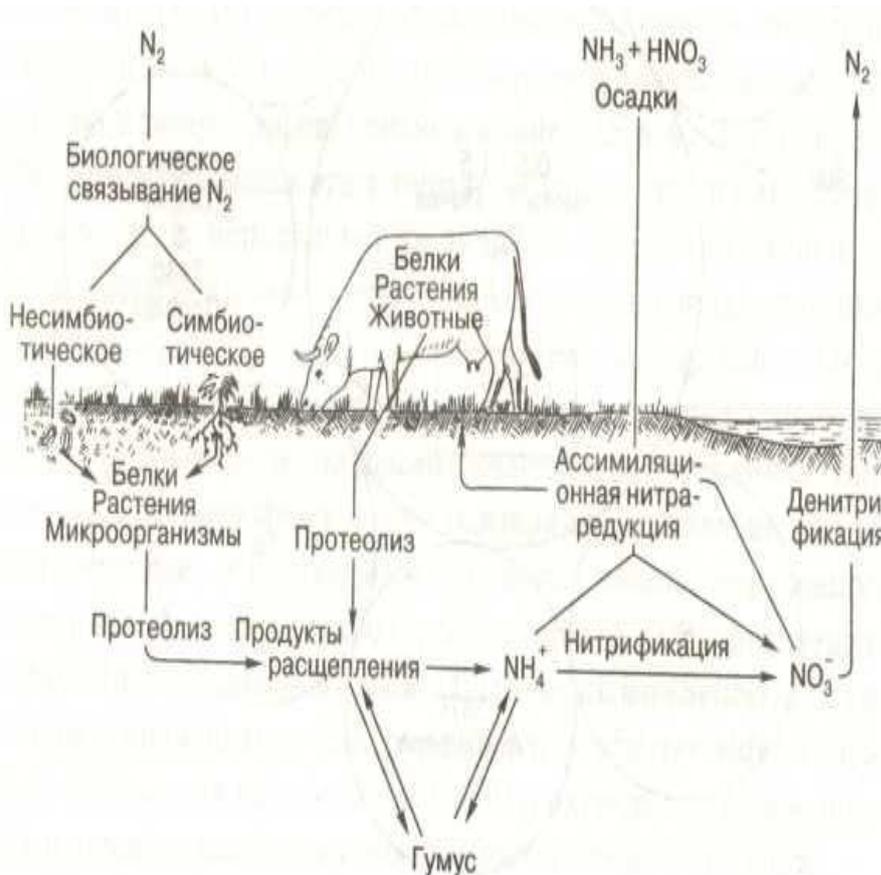


Рисунок 18 – Круговорот азота в природе [39].

В отличие от других биогенных элементов, у фосфора отсутствует стадия воздушной миграции, а значит, и более равномерное распределение на планете. Первичным источником доступного для организмов фосфора служит процесс выщелачивания из пород. Захоронение фосфора в

мортмассе и переход его в осадочные породы делает его лимитирующим биогеном для развития эу- и прокариотных организмов (рис. 19).

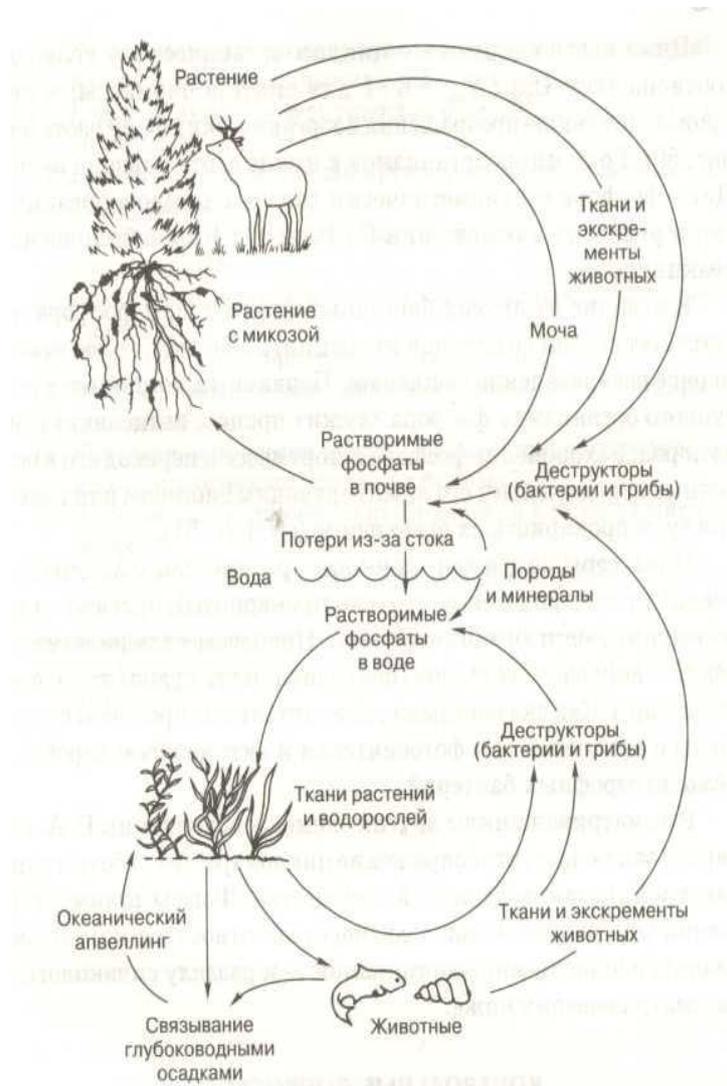


Рисунок 19 – Круговорот фосфора в природе [30].

Цикл серы сопряжен с циклом органического углерода в реакциях сульфидогенеза (только прокариоты), сульфат- и сероредуцирующими организмами. Процессы сульфидогенеза ведут к коррозии металлов (подводная часть судна, трубопроводы и др.). Как сказано выше, окислительные процессы сопряжены с аноксигенным фотосинтезом и активностью аэробных хемолитотрофных бактерий [30].

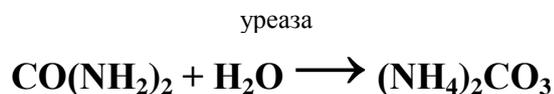
## Лабораторная работа №7

### Аммонификация мочевины.

Аммонификация – это превращение органических форм азота в аммиачный азот. Его вызывают различные микроорганизмы (бактерии, актиномицеты, грибы).

К азот содержащим соединениям часто встречающимся в природе относится мочевины - конечный продукт превращения соединений азота в организме человека и животных мочевины может синтезироваться почвенными грибами. В год на Земле образуется около 30 млн. тонн мочевины. Это огромные ресурсы азота, так как мочевины по химическому строению представляет собой амид угольной кислоты и содержит 46% азота, поэтому используется как удобрение.

Мочевина под действием микроорганизмов, вырабатывающих фермент уреазу разлагается до аммиака и углекислого газа:



Образующаяся углеаммиачная соль мало устойчива и распадается на составные части:



Многие бактерии и грибы имеют уреазу и могут использовать мочевины в качестве источника азота для синтеза белков. Разлагают мочевины уробактерии, обитающие в почве и в рубце жвачных животных. Поэтому мочевины добавляют в корма, а в рубце микроорганизмы вызывают её разложение (аммонификацию) и далее переводят её в белок. Уробактерии могут развиваться при высокой щелочности среды (pH 9-10), что позволяет им вызывать распад значительных количеств мочевины до аммиака. Среди

уробактерий есть (рис. 20 и 21):

- кокки **Micrococcus ureae**,
- сарцины **Planosarcina ureae**,
- бациллы **Bacillus probatus (Urobacillus pasteurii)**.

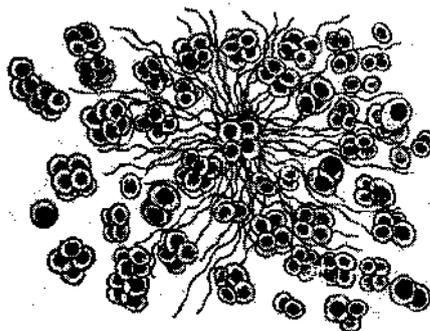


Рисунок 20 – *Planosarcina ureae* [20]

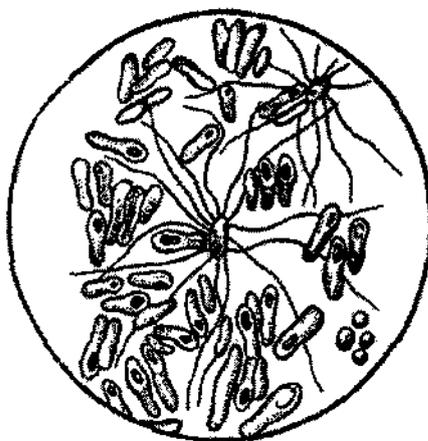


Рисунок 21 – *Urobacillus pasteurii*. Палочки со спорами [20].

Аммиак, образующийся при микробном разложении мочевины претерпевает в почве различные превращения:

- 1) частично адсорбируется на глинисто-гумусовых комплексах или нейтрализует почвенные кислоты;
- 2) потребляется растениями как источник азота и иммобилизуется в

процессе метаболизма почвенных микроорганизмов;

- 3) выделяется в атмосферу;
- 4) окисляется в нитриты и нитраты.

#### **Ход работы:**

1. Приготовить питательную среду следующего состава (г/л): К или Na виннокислый – 5,0  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2 ; мочевины – 50 г.

2. Среду по 15 мл, разлить в пробирки, заразить почвой. Для обнаружения выделяющегося аммиака под ватно-марлевую пробку в пробирке закрепить красную лакмусовую бумажку смоченную водой и поместить в термостат при температуре 28-30°C на 7 дней.

3. После культивирования сделать качественную реакцию на аммиак. В фарфоровую чашечку поместить каплю культуральной жидкости и каплю реактива Несслера. Образуется буроватый осадок. Образование аммиака подтверждается и приобретением синей окраски красной лакмусовой бумажкой.

4. Микроскопирование. Приготовить фиксированный окрашенный препарат из культуральной пленки, образовавшейся на поверхности среды в пробирке.

5. Зарисовать микроорганизмы и сделать вывод о протекании процесса аммонификации.

#### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какой процесс называют аммонификацией?
2. Назовите возбудителей процесса аммонификации мочевины?
3. Какой гидролитический фермент выделяют уробактерии при разложении мочевины?
4. Почему процесс аммонификации имеет большое значение для сельского

хозяйства?

5.Какое соотношение азота и углерода должно быть, чтобы в почве накапливался аммиак?

6.Как предотвратить (довести) до минимума потери азота в виде аммиака при хранении навоза?

7.Будет ли идти процесс аммонификации при плотном способе хранения навоза?

8.Будет ли идти процесс аммонификации при неправильном хранении навоза вразброс?

9.Какие существуют мероприятия для предотвращения улетучивания аммиака из почвы при хранении навоза?

## Лабораторная работа №8

### *Нитрификация*

Все нитрифицирующие бактерии – облигатные аэробы, некоторые из них приведены на рисунках 22 и 23. Оптимальная температура для их роста 25-30°C и pH 7,5 – 8,0. При pH ниже 6 и выше 9,2 эти бактерии не развиваются.

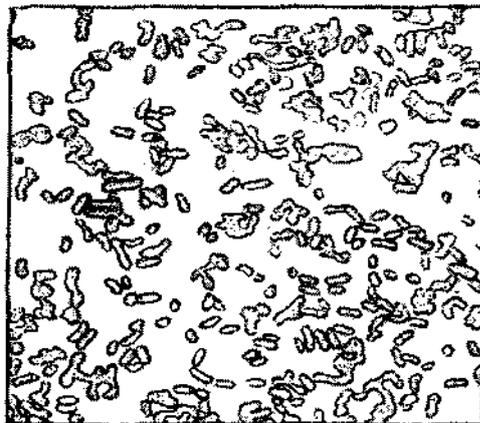


Рисунок 22 – Возбудитель первой фазы нитрификации род *Nitrosomonas* [20].

Нитрифицирующие бактерии играют в природе существенную роль. В хорошо аэрируемой почве ионы  $\text{NH}_4^+$  подвергаются быстрому окислению и образуются анионы  $\text{NO}_2^-$ , которые подкисляют почву. Это ведет к растворимости минералов, в состав которых входят соли K, Mg, Ca, фосфорной кислоты. Последние становятся доступными для питания растений. В этом отношении нитрифицирующие организмы имеют важное значение в сельском хозяйстве.

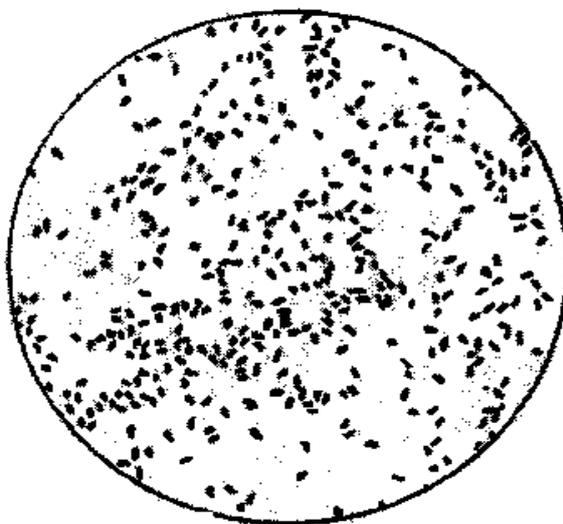


Рисунок 23 – Возбудитель второй фазы нитрификации *Nitrobacter* [20]

Однако ионы аммония задерживаются в почве и не теряются, ионы же  $\text{NO}_3^-$  могут вымываться и подвергаться процессу денитрификации, в результате которого теряется значительное количество азота из почвы. Для предотвращения этих потерь предложены многочисленные промышленные препараты ингибиторов нитрификации, которые повышают КИА удобрений до 80% и более, подавляют процесс нитрификации в почве.

Нитраты претерпевают следующие превращения в почве:

- 1) используются высшими растениями в процессах ассимиляции;
- 2) вымываются в водоемы и вызывают их евтрофикацию;

- 3) закрепляются (иммобилизируются микроорганизмами)
- 4) восстанавливаются до молекулярного азота в результате денитрификации.

### **Ход работы:**

1. Приготовить питательные среды соответствующего химического состава для 1 и 2 фаз нитрификации.

– для 1-й фазы, %:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , – 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{NaCl}$  – 0,2  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,04;  $\text{CaCO}_3$  или  $\text{MgCO}_3$  – 0,5.

– для 2-й фазы, %:  $\text{NaNO}_3$  – 0,1;  $\text{NaCO}_3$  (безводный) – 0,1;  $\text{NaCl}$  – 0,05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,05;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,04.

2. По 15 мл каждой среды разлить в 2 чашки Петри, заразить почвой и поместить в термостат при температуре 28-30°C на 2 недели.

3. После культивирования провести качественные реакции: в 1-й фазе на  $\text{NH}_3$  и  $\text{NO}_2$ , во 2-й фазе на  $\text{NO}_2$  и  $\text{NO}_3$ :

- проба на  $\text{NH}_3$  - на предметное стекло помещают каплю культуральной жидкости и добавляют каплю реактива Несслера, гель приобретает желто-оранжевую окраску.

- на  $\text{NO}_2$  - на предметное стекло поместить 1 каплю культуральной жидкости из чашки Петри и добавить 1-2 кристалла реактива Грисса. В присутствии азотистой кислоты реактив Грисса окрашивает раствор в красный цвет.

- на  $\text{NO}_3$ - на предметное стекло поместить каплю культуральной жидкости, добавить 1 каплю дифениламина и 1-2 капли крепкой  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . В присутствии азотной кислоты раствор приобретает синий цвет.

4. Микроскопирование. С поверхностной пленки среды из чашек Петри 1 и 2 фаз нитрификации приготовить фиксированные окрашенные (фуксином) препараты.

5. Зарисовать микроорганизмы и сделать выводы о степени активности протекания процесса нитрификации. Результаты занести в таблицу 8.1.

Таблица 8.1 – Возбудители процесса и степень активности процесса нитрификации

Нитрифицирующие бактерии (написать латынь)	Отношение к кислороду и факторы элективности среды	Исходный продукт нитрификации	Конечный продукт нитрификации	Заключение о степени активности процесса нитрификации по интенсивности окрашивания (качественные реакции). Оценить по 5-ти бальной системе
1-я фаза:				
2-я фаза:				

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите возбудителей 1-й фазы нитрификации.
2. Назовите возбудителей 2-й фазы нитрификации.
3. Что получают бактерии в процессе нитрификации?
4. Как создать элективные условия для процесса нитрификации?
5. К какому типу питания по отношению к углероду относятся нитрификаторы?
6. Для чего применяются ингибиторы нитрификации?
7. С какими азотными удобрениями вносят ингибиторы нитрификации?
8. Назовите причины, почему нитраты считаются нежелательными в почве?
9. Будет ли протекать процесс нитрификации при плотном способе хранения навоза?
10. Почему процесс нитрификации может служить критерием плодородной почвы?

## Лабораторная работа №9

### *Денитрификация.*

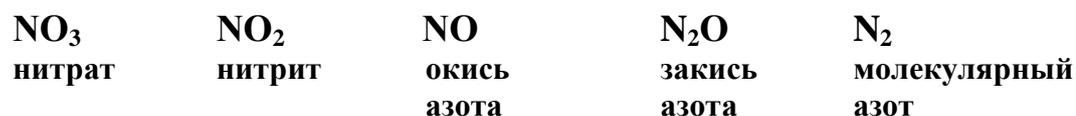
*Денитрификация* – сумма процессов, которые ведут к потерям азота нитратов в результате их восстановления до газообразных форм биологическим путем.

1. Восстановление нитрата может происходить в результате конструктивного и энергетического обмена. В первом случае многие бактерии способны использовать в качестве источника азота нитрат, восстанавливать его через нитрит до аммиака с последующим включением его в метаболизм.

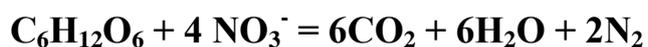


Это процесс *ассимиляторной денитрификации*.

2. В энергетическом обмене при дыхании в анаэробных условиях некоторые микроорганизмы используют кислород нитрата, который восстанавливается до молекулярного азота или до закиси азота. Такое восстановление нитрата надо рассматривать как тип дыхания, при котором акцептором водорода служит кислород нитрата.



Это процесс *диссимиляторной денитрификации* или нитратное дыхание. При нитратном дыхании микроорганизмы получают энергии значительно больше, чем при брожении, у денитрифицирующих бактерий окисляемый субстрат подвергается полному окислению до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.



Окись и закись азота, как и молекулярный азот, летучи, и в процессе диссимиляторной денитрификации происходит обеднение почвы азотом.

Возбудителями денитрификации являются (рис. 24): *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas denitrifikans*, *Pseudomonas stutzeri*.

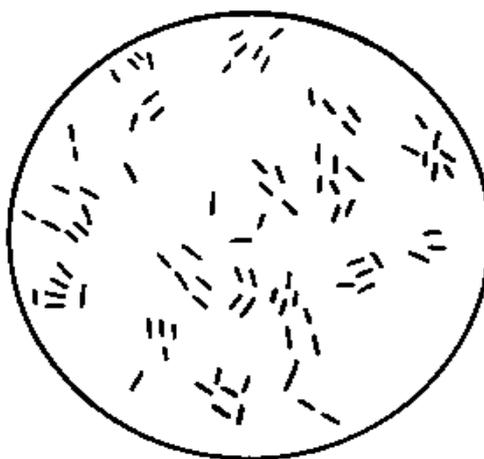


Рисунок 24 – *Pseudomonas fluorescens* [20]

*Микробиологическая денитрификация* – это достаточно широко распространенный процесс в природе, в результате которого в атмосферу ежегодно поступает из почвы и водоемов 270-330 млн. т азота. Процесс протекает в основном в анаэробных условиях в присутствии фермента нитратредуктазы.

#### **Ход работы:**

1. Приготовить питательную среду соответствующего химического состава, г: сегнетова соль (натриевокалиевая соль винной кислоты) или цитрат натрия – 20;  $\text{KNO}_3$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{FeS}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  – следы, дистиллированная вода - 1000 мл.

2. Залить питательную среду в пробирки, заразить почвой и закрыть резиновыми пробками так, чтобы в пробирках не было пузырьков воздуха.
3. Поместить в термостат при температуре 28-30 °С на 7 дней.
4. После культивирования провести качественные реакции на наличие в питательной среде нитратов и нитритов (см. работу 9).
5. Микроскопирование. Из середины пробирки пипеткой взять каплю культуральной жидкости и приготовить фиксированный окрашенный препарат.
6. Зарисовать микроорганизмы и сделать выводы о степени интенсивности протекания процесса денитрификации. Результаты занести в таблицу 4.

Таблица 9.1 – Возбудители процесса и степень активности процесса денитрификации

Денитрифицирующие бактерии (написать латынь)	Отношение к кислороду и факторы элективности среды	Исходный продукт денитрификации	Конечный продукт денитрификации	Заключение о степени активности процесса денитрификации по интенсивности окрашивания. Оценить по 5-ти бальной системе

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите денитрифицирующие бактерии.
2. Какой процесс называют ассимиляторной денитрификацией?
3. Какой процесс называют диссимиляторной денитрификацией?
4. Какие конечные продукты образуются при денитрификации?
5. Почему процесс денитрификации имеет отрицательное агрономическое значение?
6. В каких условиях аэробных или анаэробных идет процесс денитрификации?
7. Почему процесс денитрификации называют нитратным дыханием?

8. Назовите пути предотвращения процесса денитрификации в почве и хранении навоза?

9. К какой группе относятся денитрификаторы: хемолитоавтотрофы или хемоорганогетеротрофы?

## 5. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА

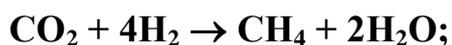
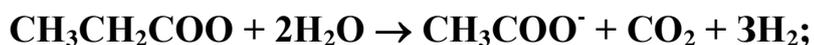
Очевидно, что одним из основных операционных понятий в экологии микроорганизмов является сообщество, состоящее из разных популяций организмов. Чтобы разобраться в его сути, необходимо знать адаптационные возможности отдельных видов, их функциональное разнообразие и типы связей, возникающих между видами микроорганизмов, а также микро- и макроорганизмов.

*Сообщество* – это организационная, структурная и функциональная единица экосистемы. Взаимодействия между членами сообщества основаны на трофическом либо метаболическом характере связей.

*Трофические связи.* Метабиоз – форма взаимоотношений организмов, при которой одна группа популяций создает условия для существования другой, главным образом за счет выделения продуктов обмена, служащих субстратами для этой другой группы популяций. Метабиотические связи можно проследить во всех циклах превращения биогенных элементов. Например, в цикле азота аммонификаторы, выделяя  $\text{KN}_3$ , поставляют субстрат нитрификаторам и т. д. [21].

Синтрофные пищевые связи подразумевают потребление субстрата смешанными популяциями. Синтрофные ассоциации микроорганизмов основаны на обмене факторами и субстратами роста между популяциями, а также на удалении токсических метаболитов. Таким образом, трофические связи имеют метаболитную основу, и в этом смысле синтрофные связи

зачастую обуславливают совместное освоение субстрата двумя популяциями, т. е. протокооперацию. Примерами могут служить ассоциации гидролитиков (целлюлозолитических грибов, бактерий) и азотфиксаторов: первые поставляют олигомеры, вторые – факторы роста (витамины, источник азота и др.). Синтрофные взаимоотношения характерны для метаногенного сообщества, а именно первичных и вторичных анаэробов, что приводит к превращению в метан широкого спектра субстратов, в том числе летучих жирных кислот (ЛЖК). Превращение ЛЖК в метан осуществляется за счет межвидового переноса водорода. Синтрофы развиваются совместно с организмами, использующими водород, – метанообразующими или сульфатвосстанавливающими:



Первую реакцию осуществляет, например, *Syntrophobacter wolinii*., вторую -- *Methanobacterium sp.*, третью - *Desulfobacterium sp.*

В результате суммарная реакция превращения ЛЖК, спиртов термодинамически возможна и способна обеспечить микроорганизмы энергией [21].

Наиболее четко трофические связи выражены в системе «хищник - жертва». В почве и воде эта связь отмечена между животными (беспозвоночными) и микроорганизмами. Опытные данные свидетельствуют о том, что эффективность роста простейших достаточно велика: выход зоомассы на единицу потребленных бактериальных клеток составляет 0,4. В водоемах одна инфузория за час переваривает до 30 тыс. микробов. В агроценозах зерновых культур установлено, что вслед за приростом биомассы микроорганизмов возрастает численность простейших. Наиболее четко это проявляется в ризосфере растения и коррелирует с

флуктуациями потока корневых выделений.

*Метаболические связи* часто сопряжены с трофическими механизмами и могут быть выражены в симбиозе, который в настоящее время характеризуется как тесный длительный контакт двух или более организмов. В понимании А. де Бари (1879), находящиеся в симбиозе организмы могут любым образом влиять друг на друга. Различают следующие формы симбиоза: комменсализм, мутуализм и паразитизм [22].

Комменсализм — сожительство одних организмов с другими, которые служат их местообитанием, а первые — не причиняют им вреда. Эпифитные бактерии (*Erwinia*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus* и др.), дрожжи (*Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* и др.) колонизируют надземные органы растений, используя незначительные выделения растительных клеток как комменсалы. На поверхности тела человека в качестве эпибионтов обнаружены пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium acnes*, *P.granulosum*, *P.avidum*) — так называемые кожные бактерии. При этом для первых двух видов хорошим субстратом служат выделения сальных желез, для третьего — выделения потовых желез.

Мутуализм — взаимовыгодное сосуществование организмов, рассматриваемое некоторыми исследователями как крайняя степень симбиотических взаимоотношений, когда организмы не могут существовать отдельно. Этот тип связи отмечен в лишайниках между грибами и водорослями. Кишечная микрофлора человека и животных (*Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Propionibacterium sp.* и др.) относится к полезной эндосимбионтной, так как, поглощая питательные субстраты, регулярно поступающие через желудочно-кишечный тракт, выделяет витамины, аминокислоты, органические кислоты и другие метаболиты, усваиваемые организмом хозяина, а также антибиотики, сдерживающие развитие гнилостной и патогенной микрофлоры [15, 16].

Известно, что основными источниками углеводов для жвачных служат

растительные корма, содержащие большое количество фруктозанов, ксиланов, целлюлозы. Последняя была бы недоступна животным, если бы у жвачных в процессе эволюции не возникали симбиотические отношения с микробами — целлюлозолитиками (*Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum* и др.), перерабатывающими полимерные углеводы в жирные кислоты, спирты и другие продукты, которые всасываются в рубце, а сами бактерии при переходе содержимого рубца в кишечник частично подвергаются лизису и усваиваются организмом животного [3].

Жуки-короеды и муравьи-листорезы выращивают грибной мицелий в галереях и подземных гнездах, которым питаются их личинки, в то время как сами грибы находят благодаря этим животным экологическую нишу для развития. Хорошо известен пример мутуализма в системе «бобовые растения – клубеньковые бактерии», а именно соя – *Bradyrhizobium japonicum*, люцерна – *Rhizobium meliloti*, клевер – *Rh. trifoli*. горох – *Rh. leguminosarum* и т.д. [3].

Растения поставляют бактериям, находящимся в клетках клубеньков на корнях, углеводы – продукты фотосинтеза, многие другие факторы роста. Бактерии, в свою очередь, обладая высокой азотфиксирующей активностью, улучшают азотное питание бобовых растений, поставляя им азотсодержащие соединения.

Паразитизм – предполагает тесный контакт организмов, при котором один организм угнетает развитие другого, иными словами, при паразитизме проявляется полная или частичная зависимость развития паразита от хозяина. Как и при мутуализме, взаимодействие организмов может осуществляться при проникновении одного организма в клетки и ткани другого. К облигатным внутриклеточным паразитам относятся вирусы, вызывающие инфекционные заболевания (оспа, бешенство, полиомиелит, желтая лихорадка, ящур и т. д.). Как уже говорилось, вирусы

поражают все клеточные организмы, начиная от бактерий и заканчивая человеком. Высокая степень структурного и функционального упрощения вирусов объясняет их строгую зависимость от хозяина – внутриклеточный паразитизм. Однако существуют организмы, которые способны в отсутствие хозяина развиваться во внешней среде как сапротрофы, используя остатки отмерших растений, животных и микроорганизмов. В отличие от строгих (облигатных) паразитов, такие микробы называют факультативными паразитами. Например, экологической особенностью клостридий является их высокая устойчивость к неблагоприятным воздействиям среды, широкое распространение и способность к сапрофитному существованию (*Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum* и др.). Многие из почвенных грибов, питаясь растительными остатками, заражают корни и подземные части стеблей и своими токсинами провоцируют быструю гибель растений [21].

Факультативные паразиты в основном представлены грибами – возбудителями корневых гнилей, например некоторые виды родов *Olpidium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium* и др.

Ржавчинные грибы (порядок *Uredinales*), наоборот, относятся к облигатным (строгим, обязательным) паразитам, поражающим большое количество основных и промежуточных хозяев (злаковые, масличные, бобовые культуры, лиственные и хвойные породы деревьев и кустарников).

Ареалы ржавчинных грибов связаны с распространением поражаемых ими растений, они прошли довольно длительный путь совместной эволюции с питающими их растениями, что является подтверждением теории сопряженной эволюции паразита и растения-хозяина П. М. Жуковского, развившего взгляды Н. И. Вавилова о центрах происхождения культурных растений.

Для анализа межпопуляционных отношений при паразитизме важно иметь понятие о патогенности и вирулентности.

Патогенность – способность микробов паразитировать в макроорганизме и вызывать инфекционный процесс. По этому признаку все существующие микроорганизмы подразделяют на патогенные, условно патогенные и сапрофиты [33].

Все возбудители инфекционных болезней являются патогенными, но не все из них способны вызывать инфекционную болезнь, для этого микроб должен обладать вирулентностью. Никто не сомневается в патогенности сибиреязвенной бациллы, между тем среди культур этого микроба встречаются ави-рулентные штаммы, не способные вызывать заболевания у овец, кроликов. Поэтому патогенность зависит от вирулентности.

Вирулентность — это степень патогенности конкретного микроорганизма. Ее можно измерить. За единицу измерения вирулентности условно приняты летальная и инфицирующая дозы. Минимальная смертельная доза  $D_{LM}$  (Dosis letalis minimi) – это наименьшее количество живых микробов или их токсинов, вызывающее за определенный срок гибель большинства взятых в опыт животных определенного вида [33].

Но поскольку индивидуальная чувствительность животных к патогенному микробу (токсину) различна, то была введена, безусловно, смертельная доза –  $D_{CL}$  (Dosis certa letalis), вызывающая гибель 100% зараженных животных.

Наиболее точной является средняя летальная доза –  $LD_{50}$ , т. е. наименьшая доза микробов (токсинов), убивающая половину (50%) подопытных животных или растений.

*Основные факторы патогенности по функциональному значению разделяют на четыре группы.*

1. Микробные ферменты, способствующие проникновению и распространению возбудителя в макроорганизме (гиалуронидаза, фибринолизин, нейраминидаза, ДНК-аза, коллагеназа, коагулаза).

2. Поверхностные структуры бактерий, способствующие закреплению их в макроорганизме (ворсинки, жгутики, пили, рибитотейхоевые или липотейхоевые кислоты, липопротеиды и липополисахариды).

3. Поверхностные структуры бактерий, обладающие антифагоцитарным действием.

4. Факторы патогенности с токсической функцией (эндотоксины, экзотоксины, гемолизины, лейкоцидин, нейротоксины, энтеротоксины) [21].

Первые три группы факторов обуславливают инвазионность, последний – токсичность патогенных микробов.

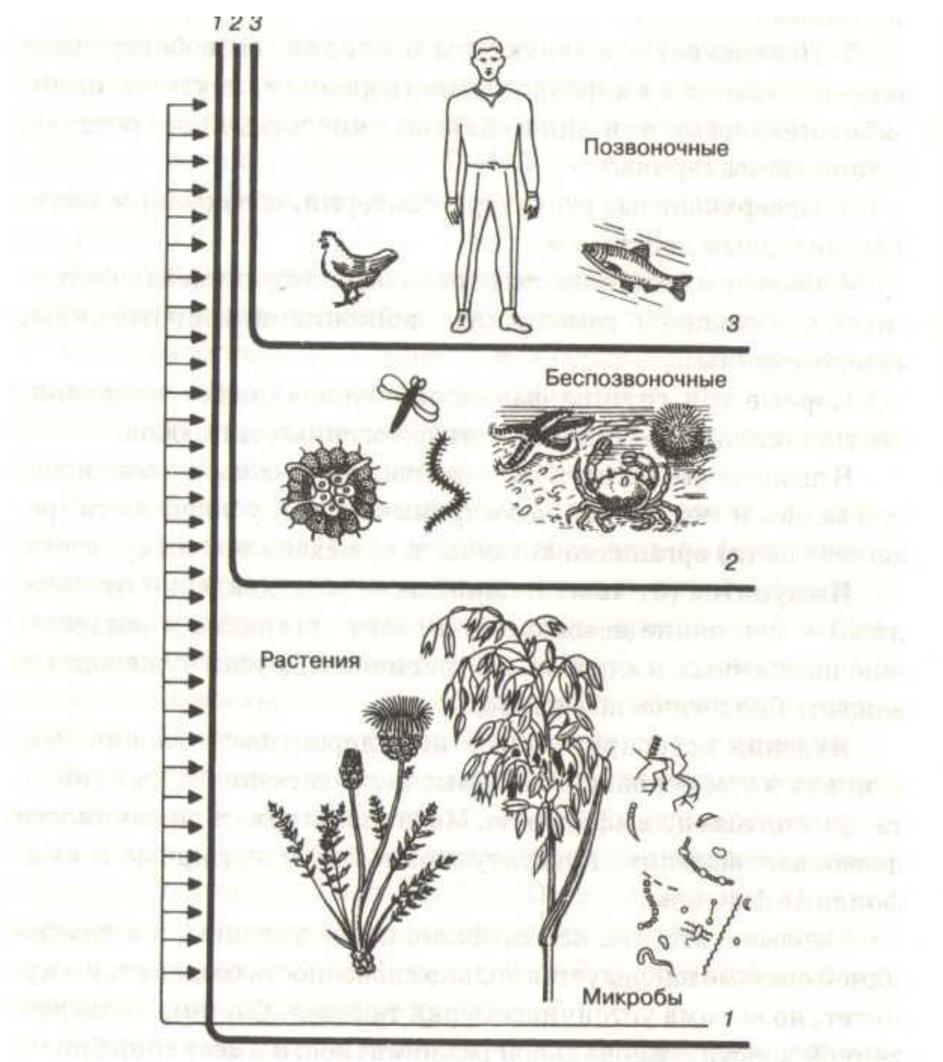
В процессе эволюции в системе «паразит – хозяин» совершенствовались и механизмы невосприимчивости, устойчивости (резистентности) организма хозяина, т. е. механизмы иммунитета.

Иммунитет (от *лат. immunitas* – освобождение от чего-либо) – состояние невосприимчивости организма к воздействию патогенных микробов, их токсинов и других чужеродных веществ биологической природы.

Явления невосприимчивости, толерантности можно объединить в три основные системы: наследственного иммунитета, фагоцитоза и лимфоидную. Механизмы невосприимчивости позволяют выделить конституционные, фагоцитарные и лимфоидные факторы.

Первые и вторые, как правило, наследственны, а в лимфоидной системе наследуется только способность создавать иммунитет, но не сама устойчивость как таковая. Система наследственной конституциональной резистентности имеет общебиологическое значение. Этот принцип защиты действует у живых организмов независимо от их таксономического положения. У беспозвоночных дополнительно появляется система фагоцитоза, действие которой проявляется в поглощении и разрушении чужеродных объектов (в том числе и микроорганизмов) клетками-

фагоцитами. Растения лишены такой системы защиты. У позвоночных животных (менее 1% всех биологических видов Земли) конституциональные и фагоцитарные факторы иммунитета подкрепляются факторами индивидуально приобретаемого, реактивного иммунитета, который создается лимфоидной системой иммуногенеза (см. рис. 25) [32].



1 – конституциональный, 2 – фагоцитарный, 3 - лимфогенный

Рисунок 25 – Типы антимикробного иммунитета [32].

*Антагонизм* выражается в подавлении развития одного организма другим, при этом, в отличие от паразитизма, контакт этих организмов не

обязателен.

Антагонистические взаимоотношения могут проявляться:

- в форме конкуренции за источники питания между популяциями, имеющими разную скорость роста и размножения;
- в форме подавления роста одной из популяций токсическими веществами неспецифического действия (органических кислот, спиртов,  $H_2S$  и др.);
- в форме подавления роста одной из популяций специфическими продуктами метаболизма другой популяции – антибиотиками.

*Антибиотики* (от греч. *αντί* – против и *βίος* – жизнь) – продукты жизнедеятельности организмов, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам организмов. В данном определении указано происхождение этих веществ, что отличает антибиотики от химиопрепаратов искусственного происхождения. Физиологическая активность антибиотиков соответствует концентрациям от десятков и сотен мкг/мл до десятых и сотых долей мкг/мл [32].

Открытие первого антибиотика принадлежит английскому врачу А. Флемингу, который первым обратил внимание на подавление развития стафилококков в присутствии плесневого грибка пеницилла – *Penicillium notatum*. Исследование этого явления антагонизма микроорганизмов привело в конечном счете с участием Э. Чейна и Х. Флори к открытию и практическому применению уже в годы Второй мировой войны в медицине антибиотика пенициллина [21].

В это же время в нашей стране академик З.В. Ермольева [21] разработала более активный отечественный препарат крустозин на основе другого вида пеницилла – *Penicillium chrustosum*. Оба препарата спасли жизни тысячам раненых на войне. Пенициллин активно подавлял развитие воспалительных процессов, вызванных кокковой и бациллярной

микрофлорой, но был неэффективен в борьбе с возбудителями кишечных инфекций, туберкулеза и др. Поэтому, когда С. Ваксман в Америке открыл стрептомицин – антибиотик с широким спектром действия, продуцентом которого были актиномицеты, окончательно наступила эра антибиотиков, широко применяемые сейчас в медицине, ветеринарии, защите растений, кормопроизводстве, консервировании сырья и продукции.

Огромное многообразие антибиотиков и видов их воздействия на организм человека явилось причиной классификации антибиотиков на группы по биологическому происхождению антибиотика делят бактериальные, актиномицетные, грибные.

Антибиотические вещества вырабатывают также растения, животные и человек. По механизму биологического действия выделяют антибиотики:

1. ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины, бацитрацин, ванкомицин, цефалоспорины и др.)
2. нарушающие функции мембран (грамицидин, нистатин, трихомицин и др.);
3. избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот (канамицин, гризеофульвин, неомицин и др.);
4. подавляющие синтез пуринов и пиримидинов (азасерин, саркомицин и др.);
5. подавляющие синтез белка (бацитрацин, канамицин, неомицин, тетрациклины, хлорамфеникол, эритромицин и др.);
6. ингибиторы дыхания (олигомицины, патулин, пиоцианин, усниновая кислота и др.);
7. ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины, колицины, олигомицин и др.);
8. антиметаболиты (фураномицин – антиметаболит аминокислоты лейцина, вещества – антиметаболиты других аминокислот, витаминов, нуклеиновых кислот);

9. иммуномодуляторы (актиномицины О и С, олигомицин, брунеомицин, рубомицин и др.).

Важной характеристикой антибиотиков является спектр действия. Спектр действия антибиотика определяет широту его влияния на различные популяции организмов. Спектр действия антибиотика определяется спецификой той мишени, которую поражает данный антибиотик в клетках микроорганизмов [21].

По спектру биологического действия выделяют:

- противобактериальные антибиотики узкого спектра действия (пенициллины, цефалоспорины, альбомицин, ванкомицин, линкомицин, новобиоцин, эритромицин, олеандомицинидр.);
- противобактериальные антибиотики широкого спектра действия (тетрациклины, хлорамфеникол, стрептомицин, неомицин, канамицин, гентамицин и др.);
- противотуберкулезные антибиотики (стрептомицин, канамицин, циклосерин и др.);
- противогрибные антибиотики (нистатин, гризеофульвин, амфотерицин В, леворин, кандицин, трихотецин и др.);
- противоопухолевые антибиотики (митомицин С, оливомицин, брунеомицин и др.).

Некоторые антибиотики обладают активностью, подавляющей развитие простейших.

Согласно данным Н. С. Егорова [21], антибиотики можно классифицировать по химической структуре следующим образом:

- антибиотики ациклического строения (аллицин, рафанин, нистатин, трихомицин, фумагиллин и др.). В эту группу входят жирные кислоты, ацетилены, полиены, серо- и азотсодержащие соединения. Большинство противогрибных антибиотиков актиномицетного происхождения относятся к полиенам;

- антибиотики алициклического строения (саркомицин, актидион, туевая, фузидиевая кислоты и др.);
- ароматические антибиотики (галловая кислота, хлорамфеникол, туяплицин и др.);
- антибиотики-хиноны (фумигатин, плюмбагин, эндокрицин); «антибиотики – кислородсодержащие гетероциклы (пеницилловая кислота, гризеофульвин, новобиоцин, трихотецин, цитринин и др.);
- антибиотики-макролиды (эритромицин, магнамицин и др.); «аминогликозидные антибиотики (гентамицин, стрептомицин, канамицин, неомицин и др.);
- антибиотики – азотсодержащие гетероциклы (продигиозин, циклосерин, пенициллин и др.);
- антибиотики – полипептиды (грамицидин, бацитрацин, низин, полимиксин и др.).

Кроме указанных групп антибиотиков, выделяют олигомицины, актиномицины, стрептотрицины и металлсодержащие соединения.

Открытие антибиотиков и их практическое использование ознаменовались присуждением двух Нобелевских премий в области физиологии и медицины: А. Флеминг, Э. Чейн, Х. Флори (1945) – пенициллин; С. Ваксман (1952) – стрептомицин [21].

Первые антибиотики были открыты случайно, по образованию зон подавления роста. Однако в настоящее время выделение новых антибиотиков требует длительной работы – от получения почвенных проб до опытов на животных (см. рис. 26).

Кроме того, в биотехнологической промышленности в настоящее время для производства антибиотиков пользуются не исходными штаммами микроорганизмов, а более продуктивными мутантами. Штамм гриба, открытый А. Флемингом, синтезировал лишь 3 мкг пенициллина на 1 мл

среды. Современные штаммы-продуценты дают минимум в 2000 раз больше.

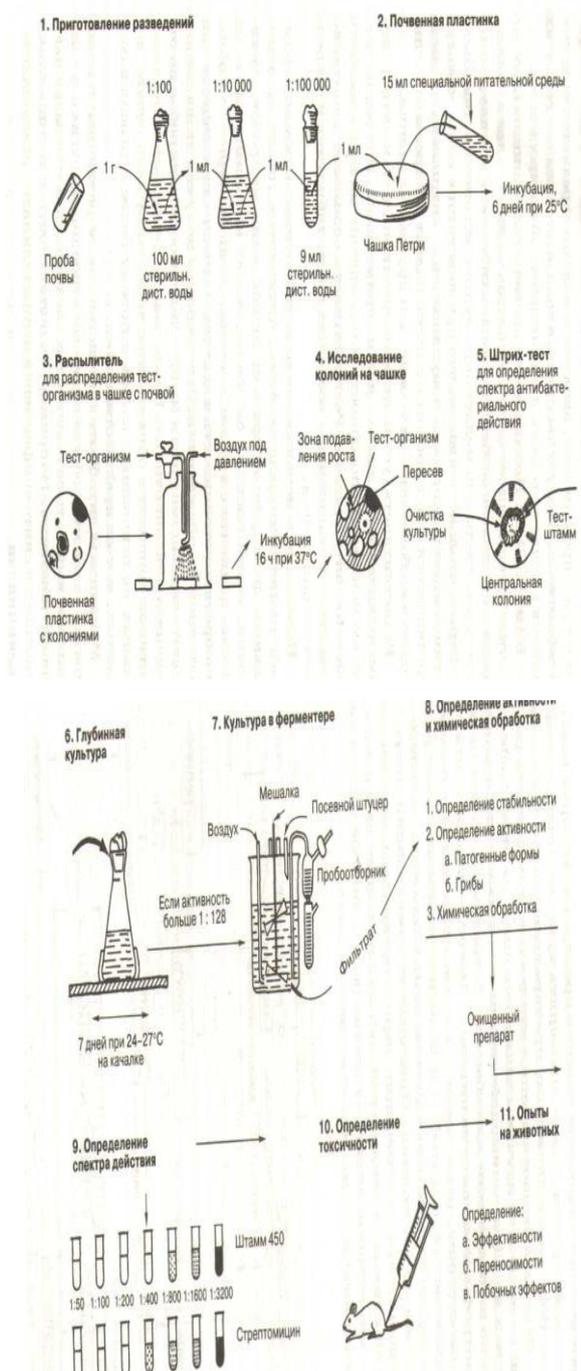


Рисунок 26 – Примерная схема работ по отбору антибиотиков [39].

Сейчас известны тысячи антибиотиков, но далеко не все они

пригодны для практического использования, в основном в связи с их токсичностью для макроорганизмов [39].

Экологическая роль антибиотиков остается не до конца выясненной. Являясь вторичными метаболитами, они играют регуляторную роль в процессах дифференциации популяций. Значительное количество работ посвящено изучению механизмов биосинтеза антибиотиков, механизмов защиты от антибиотиков у суперпродуцентов, эволюции плазмид, резистентности к антибиотикам. Получены прямые доказательства синтеза этих веществ в почве методами люминесцентной микроскопии [30].

В 1978 г. Л. М. Полянская [21] на примере гелиомицина (*S. olivocinereus*) показала возможность синтеза антибиотиков в почвах. Предположительно особенно важны антибиотики в конкуренции за ресурсы среды для медленно растущих актиномицетов. Было экспериментально показано, что при внесении в почву культур актиномицетов плотность популяции вида актиномицета, подвергающегося действию антагониста, падает быстрее и стабилизируется на более низком уровне, чем другие популяции.

*Резистентность* (устойчивость) по отношению к антибиотикам появляется при длительном их применении. Под резистентностью понимают способность микроорганизма противостоять действию антибиотика. Резистентность возникает спонтанно вследствие мутаций и под воздействием антибиотика и закрепляется в популяции [21].

Появление и использование антибиотиков оказало огромное влияние на микроорганизмы. Антибиотики стали дополнительным фактором отбора в среде обитания микробов. Антибиотик, «сработавший» однажды, может не подействовать на того же пациента с той же болезнью. Ведь бактерии способны приобретать устойчивость к действию химических веществ при повторном их применении. Этот феномен получил название антибиотикорезистентности (сопротивляемости) микробов по отношению к

антибиотикам. Как оказалось, использование антибиотиков приводит к образованию видов микробов, нечувствительных по отношению к ним и потому более агрессивных и опасных, чем их предшественники [30].

Механизмы антибиотикорезистентности различны: в некоторых случаях микробы меняют свое строение, в других случаях начинают вырабатывать вещества, связывающие или разрушающие антибиотики. Например, резистентность к пенициллину объясняется синтезом фермента пенициллиназы, разрушающего пенициллин.

Болезни, вызываемые микробами с антибиотикорезистентностью, протекают тяжелее и хуже поддаются лечению. В лечении таких болезней могут быть использованы только новые антибиотики или синтетические препараты, которые еще не известны микробам. Важно проверить чувствительность возбудителя инфекции к лечебному препарату перед его применением. Формы взаимоотношений микроорганизмов очень разнообразны; далеко не изучены такие явления, как синергизм, саттеизм и др. Для взаимодействующих в сообществе организмов важно их сближение для обмена субстратами и продуктами при осмотрофном механизме питания. При этом надо помнить что с одной стороны, размножение клеток приводит к образованию микроколонии, с другой – необходимо взаимодействие различных видов (колонии), т. е. действует правило минимального диффузионного расстояния. Примером его реализации могут быть микроагрегаты, содержащие разные организмы, объединенные общей слизью, а также гранулы, включающие набор анаэробных микроорганизмов, осуществляющих полное расщепление многих органических веществ в метантенках [30].

В аэробной зоне водоема сообщество микроорганизмов представлено хлопьями, биопленками, матами, а в бентосных сообществах функциональные группы организмов часто расположены послойно, что соответствует последовательности превращения органического вещества,

например от окисления его в микроаэрофильных условиях на придонных осадках, сбраживания первичными анаэробами до метаногенеза.

В целом выделяют большое количество сообществ микроорганизмов. Это аэробное и анаэробное фотосинтезирующие сообщества бактерий, метаногенное и сульфидогенное сообщества, превращающие растительные и животные остатки (мортмассу) в  $\text{CH}_4$  и  $\text{H}_2\text{S}$  соответственно. Аэробное сообщество включает микроорганизмы различных экологических стратегий, превращающие в аэробных условиях сложные органические вещества в продукты полного и неполного окисления, в том числе в трудно расщепляемые соединения типа лигнина, включаемые в состав гумуса (рис. 27) [17].

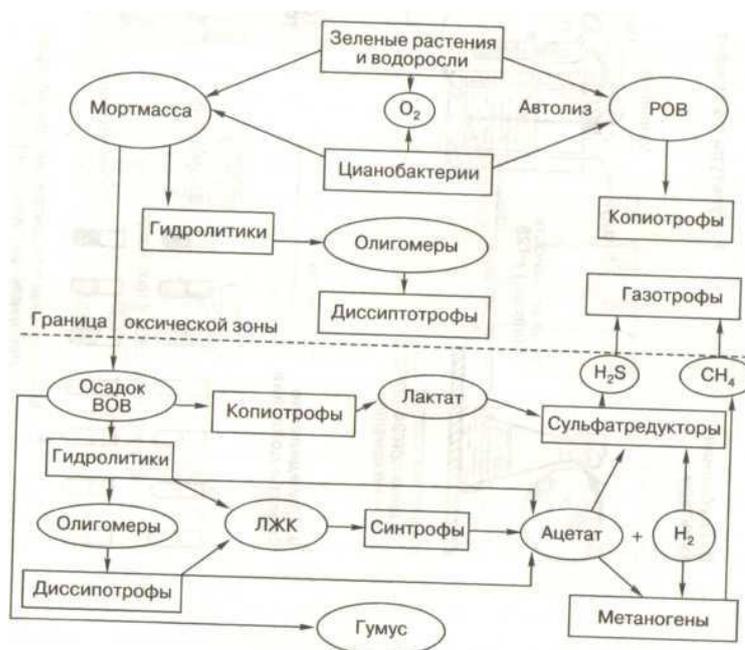


Рисунок 27 – Трофические взаимоотношения в микробном сообществе [17]

Рассматривая трофические связи в сообществе, отмечают, что тесно и прямо взаимозависимые члены сообщества, как правило, представлены филогенетически удаленными организмами. Например, в метаногенном

сообществе тесно взаимодействуют первичные анаэробы, эубактерии рода *Clostridium* и вторичные анаэробы, архебактерии родов *Methanobacterium*, *Methanosarcina*.

Таким образом, сообщество микроорганизмов формируется не путем дивергенции внутри одной экологической ниши, а «конструируется из генетически разнородного материала, который функционально взаимно дополняет друг друга по требованиям формирования устойчивой системы», по мнению академика Г. А. Заварзина [17].

### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите свободноживущие азотфиксирующие аэробные и анаэробные бактерии?
2. Назовите симбиотические азотфиксирующие бактерии?
3. На чем основываются симбиотические отношения бобовых растений и клубеньковых бактерий? Что поставляют бактерии растениям и что дают растения бактериям?
4. За счет энергии, какого процесса фиксирует N *Clostridium*?
5. За счет энергии, какого процесса фиксирует азот атмосферы *Azotobacter*?
6. Что является действующим началом нитрагина?
7. Какие свойства клубеньковых бактерий следует учитывать при изготовлении нитрагина?
8. Что такое специфичность, вирулентность и активность клубеньковых бактерий?
9. Как применяют нитрагин; вносят в почву, на семена, на рассаду?
10. Почему биологический азот считается более энергетически выгодным и экологически чистым?

## **6. МИКРООРГАНИЗМЫ И АНТРОПОГЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

### ***6.1 Микрофлора почвы***

Российский ученый, основоположник современного научного почвоведения В. В. Докучаев назвал почву матерью микроорганизмов, именно он настаивал и, изучении микробиологии в университетах, понимая, сколь велика роль микрофлоры в почвообразовательном процессе [29].

Действительно численность микроорганизмов в почве колеблется от нескольких десятков – сотен тысяч (почвы севера) до нескольких миллиардов (черно- и красноземы) в одном грамме. Максимальное количество микроорганизмов находится в верхних слоях, где складывается благоприятный режим влаги и, температуры, воздухообеспеченности и где находятся растительные и животные остатки – источники питания гетеротрофных микробов. Этот слой составляет 0-20 см, в некоторых случаях он гораздо глубже, что может быть связано как с проникновением корневой системы и ее биогенностью, так и агротехническими приемами. Вниз по почвенному профилю численность микробов снижается [29].

С одной стороны, микроорганизмы осуществляют процессы разрушения и минерализации органических веществ, тем самым поставляя неорганические формы C, N, S, P, Fe, Mn, Co, Mg и других элементов автотрофам – растениям и некоторым прокариотам (например, нитрификаторы), а с другой – разрушая одни органические вещества, микробы синтезируют ряд метаболитов, которые могут входить в состав гумуса т. е. участвуют в почвообразовательном процессе (см. рис. 28).

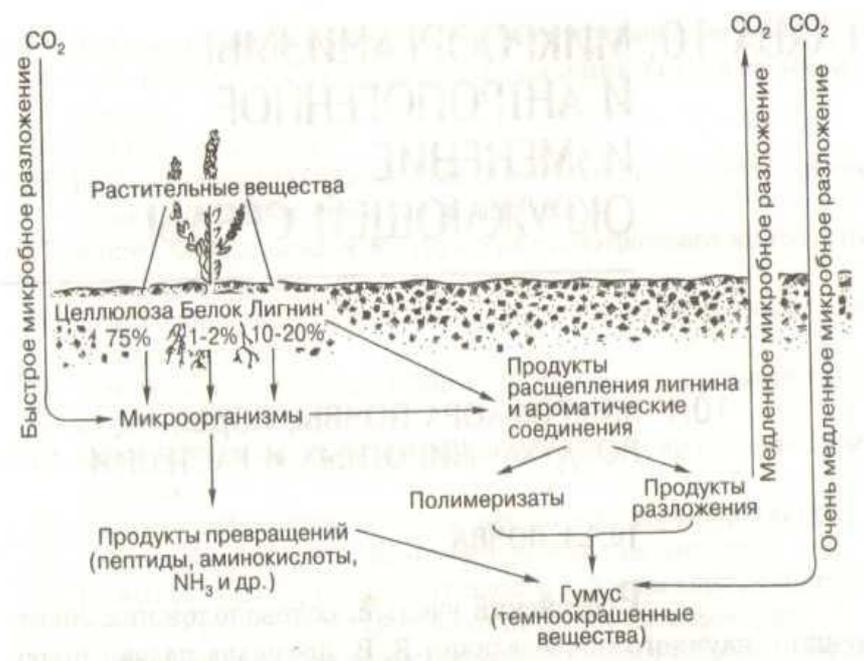


Рисунок 28 – Превращения растительных веществ в почве и образование гумуса [39]

В раскрытие истинной картины почвенного микромира внесли свой вклад не только микробиологи, но и агрономы, агрохимики, физиологи растений, почвоведы, химики и другие специалисты. Так, Буссенго и Шлезинг впервые связали аккумуляцию нитратов в результате разрушения органики почвы с ее плодородием, а далее Шлезинг и Мюнц доказали биологическую природу нитрификации [21].

Однако выделение чистых культур нитрификаторов стало возможным, как и азотфиксаторов, только после разработки микробиологами (М. Бейеринк, С. Н. Виноградский) метода элективных культур, позволяющего создать оптимальные условия для развития определенной экологотрофической группы организмов, устранить конкурентов и антагонистов. Так были выделены С. Н. Виноградским анаэробные азотфиксаторы (*Clostridium pasteurianum*, 1893), а Бейеринком аэробные азотфиксаторы (*Azotobacter*, 1901). Разработав метод культивирования бактерий на предметных стеклах (метод микрокультур) и метод

искусственных болот, моделирующих естественные условия обитания автотрофов, С. Н. Виноградский открыл новый тип дыхания – «минеральное дыхание» – процессы окисления неорганических соединений серы, азота, железа, поставляющие энергию для фиксации  $\text{CO}_2$  соответствует серобактериям, нитрификаторам и железобактериям [21].

Впоследствии это явление получило название, как уже говорилось, хемосинтеза. Являясь руководителем отдела почвенной микробиологии в институте Л. Пастера во Франции, С. Н. Винаградский возглавил исследования по изучению азотфиксации, нитрификации, брожения клетчатки и пектина в почве. Классификация почвенной микрофлоры в зависимости от ее экологических особенностей разработана академиком С. Н. Виноградским и дополнена академиком Е. Н. Мишустиним, долгие годы возглавлявшим отдел почвенной микробиологии в Институте микробиологии АН СССР:

. *автохтонная*, постоянно обитающая в почве, способная развиваться в условиях дефицита доступных источников питания, использующая труднодоступные субстраты, в том числе соединения гумуса. К данной группе С.Н. Виноградский относил в основном неспоровые формы бактерии, состав которых довольно однотипен во всех почвах [21];

- *зимогенная* микрофлора использует легко метаболизируемые (доступные) органические соединения, и ее развитие связано с периодическим поступлением в почву растительных и животных остатков;

- . *олиготрофная* микрофлора, использующая низкие концентрации субстратов;

- . *автотрофная* микрофлора, фиксирующая  $\text{CO}_2$  и использующая как энергию солнца (фотоавтотрофы), так и энергию окисления минеральных соединений N, S, P, Fe, Mn и др. (хемоавтотрофы, открытые С. Н. Виноградским).

Эта классификация, как и многие методы изучения микрофлоры почв, остается актуальной и сейчас. Последователи С. Н. Виноградского, В. Л. Омелянского, С. П. Костычева продолжили изучение основных проблем почвенной микробиологии. Так, в работах академика Е. Н. Мишустина особое значение придается почвенно-географическим закономерностям в распространении микроорганизмов на земной поверхности. Поскольку микроорганизмы являются важным фактором почвообразования, то в разных почвах они составу, т. е. для микробов выполняется закон В. В. Докучаев о зональности в распространении почв, растений и животных [21].

Экспериментально доказано, что доминирующие роды и виды микроорганизмов в разных типах почв различны. Это было показано с учетом вертикальной стратификации микроорганизмов по всем ярусам и горизонтам многих наземных экосистем.

Тундровые почвы, относящиеся к группе криоморфных (мерзлотных), формируются в условиях недостатка тепла, вечной мерзлоты, краткости вегетационного периода, а значит, низкой биологической продуктивности (общая фитомасса составляет не более 50 т/га). В фитоценозах велика роль мхов и лишайников. Водоросли – зеленые и желто-зеленые, цианобактерии служат пищевым резервом для беспозвоночных сосредоточенных в поверхностном пятисантиметровом слое. Слабое развитие профиля криогенных почв отражается в микробоценозах, в которых почти отсутствуют целлюлозарушающие микроорганизмы, беден состав возбудителей круговорота азота, а доминируют олиготрофы, коринеподобные бактерии, дрожжи рода *Cryptococcus*, в то время как автотрофные почвенные формы – липомицеты – практически отсутствуют. Увеличение плотности отдельных популяций с коротким периодом вегетации растений [6].

Подзолистые почвы под хвойными лесами таежной зоны характеризуются образованием подстилки из лесного опада. Образующийся

гумус мигрирует по почвенному профилю, а кислые продукты деструкции органических остатков снижают рН почвенного раствора и взаимодействуют с минеральной частью почвы [6].

В переработке лесного опада активную роль играет микро-и мезофауна. Интенсивность биологического круговорота увеличивается от подзолистых почв к дерново-подзолистым и серым лесным. В лесных почвах особенно многочисленны микромицеты, а состав макромицетов резко меняется в зависимости от лесообразующих пород деревьев.

В определенных горизонтах подзолистых почв отмечено накопление гидроокисей железа, алюминия и марганца, с активностью особого комплекса микробов. В частности железо-марганцевые бактерии ответственны за формирование ортштейнов и ортштейновых плит в подзолистых почвах [21].

Черноземы – степные и лесостепные почвы засушливых травянистых растительных формаций. В луговых степях годовой прирост растительности максимальный – 100-140 ц/га, что выше, чем в лесах, но общий запас фитомассы невелик менее 50 т/га с преобладанием подземной массы над надземной. Это объясняет особенности биологического круговорота в черноземах, ведущего к созданию насыщенного нейтрального гумуса и зернистой структуры почвы. Плотность микроорганизмов высока по всему профилю без резких перепадов с глубиной. В отличие от лесных почв, биомасса бактерий высока и близка к биомассе грибов [6].

Каштановые почвы формируются под разреженным растительным покровом в зоне сухих степей. Значительную долю микрофлоры этих почв составляют актиномицеты и спорообразующие бактерии. Активность их, как и в черноземах, зависит от влагообеспеченности и максимальна весной и после выпадения осадков [6].

Сероземы характерны для субтропического сухого пояса. Активная вегетация растений полупустынь проходит за короткие периоды. Запасы

фитомассы – не более 50 ц/га, до 90% их представлены подземной частью. Нейтральная или слабощелочная реакции, высокие температуры благоприятны для микробиологической активности с достаточно высоким уровнем минерализационных процессов [6].

Красноземы формируются под обильным растительным покровом в предгорьях в условиях сухого жаркого лета и теплых дождливых зим с промывным водным режимом при интенсивном разложении опада. В отличие от черноземов, гумус этих почв кислый, фульватный (рН почвы 4-4,5), что в определенной степени объясняет сходство биоты красноземов, подзолистых и дерново-подзолистых почв (доминирование неспоровых форм бактерий, высокая численность микромицетов, особенно рода *Penicillium*, а также дрожжей *Candida podzolica* – индикатора кислых почв) [6].

## **Лабораторная работа №10**

### ***Микробные землеудобрительные препараты***

Применение микробных землеудобрительных препаратов в сельском хозяйстве является альтернативой химическим удобрениям, а часто и пестицидам, что, несомненно, важно в настоящее время с точки зрения экологического земледелия. Бактериальные удобрения имеют ряд преимуществ, так как «биологический азот» ассимилируется полностью в отличие от «минерального», эти вещества не загрязняют окружающую среду, повышают коэффициент использования растениями азота, фосфора, калия и других элементов, за счет повышения растворимости минералов в зоне ризосферы, поддерживают равновесие в микробном ценозе почвы, улучшают фитосанитарное состояние полей.

В настоящее время широко используют препараты клубеньковых

бактерий для заражения семян бобовых растений: Нитрагин сухой – ризобин и ризоторфин [2].

*Ризоторфин* – препарат клубеньковых бактерий, предназначенный для усиления фиксации молекулярного азота в симбиозе с бобовыми растениями. Препарат изготовлен на основе торфа и содержит не менее 2,5 млрд./г высокоэффективных по признаку азотфиксации клубеньковых бактерий.

Применяют его путем предпосевной обработки семян зернобобовых культур и бобовых трав: гороха, люпина, сои, вики, фасоли, люцерны, клевера, донника, эспарцета и др. Для каждого вида бобовых растений ризоторфин готовится отдельно.

Препарат увеличивает в прикорневой зоне количество активных клубеньковых бактерий, что способствует образованию клубеньков на корнях и усилению процесса биологической фиксации азота атмосферы бобовыми растениями. Ризоторфин повышает урожай зерна сои на 2-5 ц/га, люпина на 1,5-2 ц/га, сена люцерны и клевера на 5-8 ц/га. Содержание протеина в урожае повышается на 2-3%.

Увеличение урожая обеспечивается за счет снабжения растений симбиотически фиксированным молекулярным азотом воздуха. Размеры фиксации за сезон достигают для бобовых трав 150-200 кг/га, для зернобобовых – 50-100 кг/га.

Бобовые растения, возделываемые с применением ризоторфина, оставляют на поле пожнивные остатки, богатые азотом, и поэтому являются прекрасным предшественником для последующих культур. Препарат повышает устойчивость бобовых растений к грибным заболеваниям.

Наиболее высокий хозяйственный эффект получают при соблюдении прогрессивной технологии возделывания бобовых культур: предварительное известкование кислых почв (кроме люпина), высева семян во влажную почву, применение микро элементов, особенно молибдена и обязательном обеспечении растений фосфорно-калийными удобрениями [2].

На почвах слабоокультуренных, бедных азотом, для получения максимального урожая применение ризоторфина следует сочетать с внесением в почву 30-45 кг/га минерального азота. Внесение высоких доз азотных удобрений снижает уровень азотфиксации бобовых растений и они переходят на питание минеральным азотом. На хорошо окультуренных почвах применение ризоторфина исключает необходимость внесения минерального азота под все виды бобовых. Эффективность препарата особенно высока на площадях, где ранее не возделывалась данная бобовая культура, так как здесь отсутствуют в почве специфические клубеньковые бактерии [2].

*Получение препарата.* Торф, обогащенный углеводами, минеральными веществами, витаминами и микроэлементами, упакованный в полиэтиленовые пакеты, подвергают гамма – стерилизации (доза – 2,5 млн./рад), инокулируют (уколом) соответствующей культурой клубеньковых бактерий и выдерживают при температуре 18-20°C в течение 3-7 дней для получения количества бактерий не менее 2,5 млрд./г. Ризоторфин для сои и люпина хранят при температуре 12-14°C, для остальных бобовых культур – при температуре 3-5°C, в темном, сухом помещении. Замораживание препарата не допускается. Гарантийный срок годности для сои и люпина – 9 месяцев, для остальных бобовых – 6 месяцев. Норма расхода препарата для всех бобовых культур 200 г/га. Препарат расфасовывают в полиэтиленовые пакеты по 200, 400, 600, 800 и 1000 г. [34].

Способ применения. Предпосевная обработка семян проводится в день посева. Семена увлажняют водой с перемешиванием (1,5-2% воды от веса семян), добавляют необходимое количество ризоторфина и тщательно перемешивают для равномерного распределения препарата на семенах.

При посеве бобово-злаковых смесей (горохо-овсяная и др.) проводят обработку всей смеси двойной порцией ризоторфина.

Люцерну и клевер высевают под покровные культуры. В этом случае

предпочтительно обработать ризоторфином семена покровной культуры, а не бобовой. Это позволит глубже (4-5 см) внести клубеньковые бактерии, что способствует их лучшей приживаемости в почве и создаст условия для большей «встречаемости» с корневой системой бобовых культур. В этом случае практически полностью исключается потеря клубеньковых бактерий, выносимых на поверхность почвы семядолями прорастающих инокулированных семян люцерны и клевера. Данный способ биологически и хозяйственно более эффективен, чем непосредственная инокуляция семян бобовых [34].

Нитрагин сухой (ризобин). Состоит из чистой высушенной культуры клубеньковых бактерий, смешанной с наполнителем. Препараты медленнорастущих клубеньковых бактерий содержат не менее 5 млрд./г действующего вещества, препараты быстрорастущих клубеньковых бактерий – не менее 2 млрд./г.

Нитрагин предназначен для предпосевной обработки семян бобовых трав и зернобобовых культур. Норма расхода – 20 г/га. Температура хранения от +10°C до – 30°C в сухом, проветриваемом помещении, защищенном от света. Срок хранения – 6 месяцев. Применяется с целью повышения урожая зерна и зеленой массы. Прибавка зерна у зернобобовых – 15-20%, урожая зеленой массы бобовых трав – 20-30%. Увеличение содержания белка на 15-20%.

*Азотобактерин* получают микробиологическим путем на основе культуры *Azotobacter chroococcum*. Действие препарата основано на способности азотобактера фиксировать свободный азот атмосферы, а так же синтезировать биологически активные вещества: стимуляторы роста, витамины группы В, антибиотики [30].

Принцип действия азотобактера заключается в том, что находясь в непосредственном контакте с корневой системой растений он может пользоваться корневыми выделениями, и развиваясь за их счет, фиксировать

азот атмосферы, тем самым улучшая условия для развития растений, соответственно повышая урожайность [21].

Однако этому сожительству мешает ряд причин:

1. Корневые выделения растений используются обильной микрофлорой других ризосферных бактерий, которые лишают азотобактер части углеродной пищи.

2. Разные штаммы азотобактера обладают разной конкурентной способностью по отношению к типичным ризосферным бактериям.

3. Агротехнический фон, на котором может успешно проявиться полезная деятельность азотобактера, требует применения ряда минеральных и органических удобрений.

4. Почвенные условия (влажность, температура, рН, аэрация и т.д.) должны благоприятствовать развитию азотобактера.

Работы Костычева показали, что усвоение атмосферного азота азотобактером происходит в таком масштабе, что можно совсем обойтись без минеральных азотных удобрений.

*Технология производства азотобактерина.* На агаровой безазотной среде выращивается двухнедельная культура азотобактера и вносится из расчета 40 мл на 1 кг абсолютно сухого торфа, заранее испытанного на возможность размножения в нем азотобактера и доведенного до определенной степени влажности. Слизь препарата тщательно перемешивается с торфом, ставится во влажное помещение с температурой 20-24°C и ежедневно перемешивается пока не разовьется 100-200 млн. клеток на 1г влажного торфа. После этого препарат вновь разбавляется в 10 раз торфяным порошком и вновь выдерживается при 20-24°C до состояния, когда содержание клеток азотобактера вновь достигнет 100млн. в 1г. После этого препарат готов к употреблению [30].

Кроме торфяного препарата можно приготовить *почвенный азотобактер*. В условиях хозяйства используют хорошо унавоженную

огородную почву, рН 6,5-7,7. Почва заправляется 1% сахарозы, 2% мела, 0,01% фосфорнокислой соли, увлажняется водой до образования мажущейся массы, заражается чистой культурой азотобактера из расчета 2 млн. клеток на 1г и намазывается ровным слоем в плоские кюветы толщиной 1,5-2 см.

Через 48 часов при температуре 25-30°C на поверхности образуется белый слизистый налет азотобактера титр 400 млн. клеток на 1 г. Он устойчив.

Для практического применения 0,25-0,5 кг почвенного азотобактерина разбавляют в 1,5-2 л воды и полученной болтушкой обрабатывают семена.

Наилучшие результаты отмечаются при внесении 250-300 млрд. клеток на 1 га посева. Для создания наиболее благоприятных условий развития азотобактера в почве необходимо внесение минеральных удобрений (К, Са, особенно важен фосфор), рН среды (менее 6,0 рост азотобактера идет за счет связанного азота почвы), аэрация (рыхлая почва). Использовать штамм азотобактера с гарантированной активностью азотфиксации и адаптированный к местным условиям [30, 34].

Важность обеспечения азотобактера углеродистой пищей выявляется не только для приживаемости бактерий, но и сохранения ими азотфиксирующей активности. В почве без органических удобрений препарат теряет свою активность на 2/3 от исходной, а в почве с органическими удобрениями только на 1/3.

Норма внесения препарата: для бактеризации семян – 200 г/га, для подкормки растений – 400 г/га. Эти приемы повышают урожайность на 15-30%.

### ***Препараты на основе дефосфорилирующих бактерий***

*Фосфобактерин.* Р. Менкиной из богатой органическим веществом

почвы в чистую культуру были выделены активные разрушители фосфорно-органических веществ. Наиболее активная культура, освобождавшая 50% фосфора из лецитина и 86% фосфора из нуклеиновой кислоты, представляет собой споровую палочку, близкую к *Bacillus megaterium* (var. *phosphaticum*). В лабораторных условиях за 3-4 недели микроорганизмы освобождали 3-9 мг  $P_2O_5$  на 100 г почвы. Эти бактерии используются в препарате фосфобактерин [37].

*Приготовление фосфобактерина.* Сначала готовится закваска на картофельной среде, на которой хорошо развивается *Bac. megaterium phosphaticum*. Затем полученная бактериальная масса смешивается с наполнителем (сухой порошок каолина), сушка смеси 35-40°C. В 1 г сухого фосфобактерина  $200 \times 10^6$  кл. Норма расхода препарата 250 г/га. Способ применения – препарат разбалтывают в небольшом количестве воды и полученной болтушкой смачивают семена.

На черноземах прибавка урожая при применении фосфобактерина 1-3 ц/га. На кислых подзолистых почвах фосфобактерин не эффективен. Эффективность повышается при удобрении почвы навозом и применении высокой агротехники. В настоящее время разрешен к применению и препарат *Бактофосфин* (ООО «НПО Биопром»), высокая эффективность которого подтверждена для многих огородных и садовых культур [37].

### ***Препараты на основе силикатных бактерий***

Силикатные бактерии *Bacillus circulans* *Arthrobacter* нитрифицирующие сульфобактерии-микроорганизмы, вызывающие брожение, являются основой препарата *Кремнебактерин*. Они разлагают алюмосиликаты почвы и переводят калий в растворимую форму, используемую в питании растений.



Кроме удобрительной, роль силикатных удобрений в увеличении урожайности растений состоит в том, что они синтезируют витамины группы В, вещества стимулирующие рост и развитие растений. Кроме того выделяются антибиотики, угнетающие развитие патогенной микрофлоры. Силикатные бактерии освобождают калий при разрушении минералов. Калий способствует повышению засухоустойчивости, теневыносливости и устойчивости растений к почвенным патогенам [9].

Препарат силикатных бактерий рекомендовано применять путем бактериализации семян.

### ***Препарат АМБ***

Препарат *АМБ (аутохтонная микрофлора В)* был предложен Н.М. Лазаревым для активации биодинамики окультуриваемых почв северной зоны. Исследованиями было показано, что степень развития экологического сообщества микроорганизмов, разлагающих перегнойные вещества почвы с образованием минеральных соединений для питания растений, оказывает большое влияние на развитие и урожайность сельскохозяйственных культур. В эту группировку микроорганизмов входят аммонифицирующие, денитрофицирующие, аэробные целлюлозоразрушающие бактерии, нитрифицирующие, тионовые [24].

Эта группа микроорганизмов широко представлена в более плодородных и окультуренных почвах, что позволило использовать её в качестве сложного бактериального удобрения – АМБ. Необходимые микроорганизмы выращиваются на гуматной среде путем заражения её плодородной почвой. Затем полученную закваску бактерий с добавлением

азотобактера вносят в разложившийся низинный торф (с нейтрализацией известью при температуре 20-25°C в течение 3 недель). Препарат считается готовым к употреблению, когда в нем содержание аэробных микроорганизмов дойдет до десятков млн. на 1 г торфа (его можно готовить в условиях хозяйства непосредственно) [25].

Удобрение применяется весной. Норма расхода – 250 кг/га путем равномерного рассеивания его по поверхности почвы. Хорошие результаты отмечены на дерново-подзолистых почвах и в защищенном грунте.

В настоящее время новейшие достижения микробиологии, биохимии, физиологии растений и растениеводства используются в разработке и применении комплексных препаратов, обладающих свойствами антистрессора, иммуномодулятора и биофунгицида. Таким препаратом является «Супер Гумисол», который содержит гуматы, живую микрофлору, натуральные фитогормоны, природные ростовые вещества, микроэлементы в хелатной форме. Норма расхода этого жидкого удобрения – биопрепарата 1 л/га. Его применение повышает урожайность, предохраняет от засухи и заморозков.

**Домашнее задание:** заполнить таблицу 10.1 «Сравнительная характеристика микробных землеудобрительных препаратов».

Таблица 10.1 – Сравнительная характеристика микробных  
землеудобрительных препаратов

Элемент характеристики удобрения	Нитрагин	Азотобактерин	Фосфобактерин	Силикатные бактерии	АМБ (автохтонная микрофлора бактерий)
Используемые микроорганизмы					
Краткая характеристика					
Тип бактериального удобрения					
Титр микроорганизмов (количество живых клеток в г или мл.					
Под какие культуры применяется					
Гектарная порция					
Срок годности					
Способ применения					

## **ВОПРОСЫ К КОЛЛОКВИУМАМ**

### **Коллоквиум №1 «Морфология и систематика микроорганизмов»**

1. Основные принципы классификации микроорганизмов.
2. Эукариоты. Их характеристика. Представители.
3. Прокариоты. Их характеристика. Представители.
4. Характеристика бактерий (форма, подвижность, размер, расположение спор ...)
5. Формы сохранения жизнеспособности микроорганизмов, факторы их определяющие.
6. Актиномицеты. Их характеристика. Значение в природе.
7. Сине-зеленые водоросли (цианобактерии). Их характеристика. Распространение. Значение.
8. Риккетсии. Их характеристика. Распространение.
9. Миксобактерии. Их характеристика.
10. Грибы. Их классификация. Характеристика. Значение.
11. Микоплазмы. Их характеристика. Значение.
12. Дрожжи. Их характеристика. Значение. Применение.
13. Высшие грибы. Характеристика. Представители. Распространение.
14. Низшие грибы. Их характеристика. Представители. Распространение.
15. Вирусы. Их физиологические особенности. Характеристика. Представители.
16. Фаги. Их физиологические особенности. Характеристика. Представители.

### **Коллоквиум №2 «Влияние условий внешней среды на рост и развитие микроорганизмов»**

1. Влияние влажности на микроорганизмы.
2. Использование фактора «влияние влажности на микроорганизмы» в сельском хозяйстве.
3. Какие микроорганизмы относятся к галофитным?
4. Влияние температуры на микроорганизмы.
5. Какие микроорганизмы относятся к психрофилам?
6. Какие микроорганизмы относятся к мезофилам?
7. Какие микроорганизмы относятся к термофилам?

8. Использование фактора «влияние температуры на микроорганизмы» в народном хозяйстве.
9. Влияние кислотности на микроорганизмы.
10. Какие микроорганизмы относятся к ацидофилам?
11. Какие микроорганизмы относятся к алкалофилам?
12. Влияние кислорода на микроорганизмы.
13. Влияние осмотического и гидростатического давления на микроорганизмы.
14. Влияние химических веществ на микроорганизмы и использование этого явления в народном хозяйстве.
15. Группы химических веществ и характер их действия на микроорганизмы.
16. Влияние реакции среды на микроорганизмы, использование этого фактора в народном хозяйстве.

**Коллоквиум №3**  
**«Питание микроорганизмов и превращение микроорганизмами соединений углерода»**

1. Взаимоотношение микроорганизмов при комменсализме, примеры.
2. Взаимоотношение микроорганизмов при мутуализме, примеры.
3. Взаимоотношение микроорганизмов при метабиозе, примеры.
4. Взаимоотношение микроорганизмов при антагонизме, примеры.
5. Взаимоотношение микроорганизмов при паразитизме, примеры.
6. Пассивное поступление питательных веществ в клетку микроорганизмов.
7. Активное поступление питательных веществ в клетку микроорганизмов.
8. Типы питания микроорганизмов (углерод, энергия). Примеры.
9. Фотолитотрофы и фотоорганотрофы. Представители.
10. Хемолитотрофы и хемоорганотрофы. Представители.
11. Понятие о катаболизме и биосинтезе.
12. Ферменты микроорганизмов. Их виды, характеристика, примеры.
13. Круговорот углерода в природе. Значение. Роль микроорганизмов в круговороте.
14. Молочнокислое брожение. Химизм. Возбудители. Значение в промышленности.
15. Маслянокислое брожение. Химизм. Представители. Значение в промышленности.
16. Разложение клетчатки и гемицеллюлозы. Химизм. Возбудители. Значение.

17. Спиртовое брожение. Химизм. Возбудители. Значение в промышленности.

#### **Коллоквиум №4**

#### **«Превращение микроорганизмами соединений N, P, S, Fe, K»**

1. Аммонификация белковых веществ и других органических соединений  
Химизм. Представители.
2. Аммонификация мочевины. Химизм. Представители.
3. Химизм фиксации молекулярного азота атмосферы.
4. Симбиотическая фиксация молекулярного азота. Представители.
5. Нитрификация. Химизм. Представители. Значение в природе и сельском хозяйстве.
6. Положительные и отрицательные стороны процесса нитрификации.
7. Денитрификация. Виды денитрификации. Химизм. Представители.
8. Имобилизация азота. Факторы, определяющие имобилизацию.
9. Ингибиторы нитрификации. Их характеристика. Значение.
10. Превращение микроорганизмами органических соединений фосфора.  
Представители.
11. Мобилизация неорганических соединений фосфора. Представители.
12. Превращение микроорганизмами соединений железа. Представители.
13. Превращение микроорганизмами соединений калия. Представители.
14. Превращение микроорганизмами соединений серы. Представители.

## Список рекомендуемой литературы

### Основная литература:

1. **Емцев, Всеволод Тихонович.** Микробиология [Текст] : учеб. для вузов / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. - М. : Дрофа, 2005. - 445 с.
2. **Нетрусов, Александр Иванович.** Микробиология [Текст] : учеб. для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. - 2-е изд., стер. - М. : Академия, 2007. - 350 с.
3. **Зимоглядова, Татьяна Васильевна.** Практикум по микробиологии [Текст] : учеб. пособие для вузов по спец. 110203 - "Защита растений" : рек. Учеб.-метод. об-нием / Т. В. Зимоглядова, И. А. Карташёва, О. Г. Шабалдас. - М. : Колос ; Ставрополь : АГРУС, 2007. - 147 с.

### Дополнительная:

1. **Гиль Т. А.,** Биотехнология. Основы технической микробиологии. Микробиологические препараты в растениеводстве и защите растений [Текст] : учеб. пособие для вузов / Иркут. гос. с.-х. акад., каф. физиологии растений, микробиологии и агрохимии, Иркут. гос. ун-т, каф. микробиологии ; авт.-сост. Т. А. Гиль, Т. Ф. Казаринова, Н. Н. Дмитриев. - Иркутск : ИрГСХА, 2006. - 95 с.
  2. **Т. А. Гиль** Микробиология [Текст] : учеб. пособие для студентов агроном. фак. ИрГСХА по спец. 310200 "Агрономия", 320400 "Агроэкология" / Авт.-сост. Т. А. Гиль, Н. Н. Дмитриев. - Иркутск : ИрГСХА, 2008. - 105 с.
  3. **Штерншис М. В.** Биологическая защита растений [Текст] : учеб. для вузов по спец. 310400 "Защита растений" / М. В. Штерншис [и др.] ; под ред. М. В. Штерншис. - М. : КолосС, 2004. - 264 с.
  4. **Фирсов, Николай Николаевич.** Микробиология [Текст] : слов. терминов / Н. Н. Фирсов. - М. : Дрофа, 2005. - 256 с.
- Нетрусов, Александр Иванович.** Общая микробиология [Текст] : учеб. для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. - М. : Академия, 2007. - 283 с.

## Список использованных источников работ

1. Аносов, Н. Р. Микробиология. — М. : Агропромиздат, 1989. — 351 с.
2. Базилинская, М. В. Биоудобрения. — М. : Агропромиздат, 1989. — 128 с.
3. Биология — наука XXI века / 6-я Пущинская школа-конференция : сб. тез. — Пущино, 20-24 мая 2002. — Т. 1. — 364 с.
4. Биотехнология / под ред. Е. С. Воронина. — СПб. : Гиорд, 2006. — 703 с.
5. Ветеринарная микробиология и иммунология / под ред. Н. А. Радчука. — М. : Агропромиздат, 1991. — 383 с.
6. Виноградский, С. Я. Микробиология почвы. — М. : Изд-во АН СССР, 1952.— 792 с.
7. Гарибова, Л. В. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов / Л. В. Гарибова, С. Н. Лекомцева. — М. : Товарищество научных изданий КМК, 2005. — 220 с.
8. Гарибова, Л. В. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов / Л. В. Гарибова, С. Н. Лекомцева. — М. : Товарищество научных изданий КМК, 2005. — 220 с.
9. Гиль Т. А. Микробиология [Текст] : учеб. пособие для студентов агроном. фак. ИрГСХА по спец. 310200 "Агрономия", 320400 "Агроэкология" / Авт.-сост. Т. А. Гиль, Н. Н. Дмитриев. - Иркутск : ИрГСХА, 2008. - 105 с.
10. Добровольская, Т. Г. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий / Т. Г. Добровольская, И. Н. Скворцова, Л. В. Лысак. — М. : Изд-во МГУ, 1989. — 71 с.
11. Добровольская, Т. Г. Структура бактериальных сообществ почв. — М. : Академкнига, 2002. — 282 с.
12. Домарадский, И. В. Основы бактериологии для экологов / И. В. Домарадский, А. В. Ермолаев. — М. : Изд-во РУДН, 1999. — 211 с.

13. Дьяков, Ю. Т. Введение в альгологию и микологию. — М. : Изд-во МГУ, 2000. — 192 с.
14. Дьяков, Ю. Т. Новое в систематике и номенклатуре грибов / Ю. Т. Дьяков, Ю. В. Сергеев. — М. : Национальная академия микологии, 2003. — 496 с.
15. Емцев, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — М. : Дрофа, 2005. — 445 с.
16. Емцев, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — М. : Колос, 1993. — 383 с.
17. Заварзин, Г. А. Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. — М. : Книжный дом «Университет», 2001. — 256 с.
18. Звягинцев, Д. Г. Биология почв / Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева, Г. М. Зенова. — М. : Изд-во МГУ, 2005. — 455 с.
19. Звягинцев, Д. Г. Экология актиномицетов / Д. Г. Звягинцев, Г. М. Зенова. — М. : ГЕОС, 2001. — 256 с.
20. Кищенко Л.А. Методические указания для лабораторных занятий со студентами 2-го курса агрономического факультета направления 110400.62 «Агрономия» очной и заочной формы обучения. / Авт.-сост. Л.А. Кищенко, Н.Н. Клименко.. - Иркутск : ИрГСХА, 2014. - 105 с.
21. Коростелев Л. А. Основы экологии микроорганизмов: Учебное пособие. / Авт.-сост. Коростелев Л. А., Кощаев А. Г. – СПб.: Издательство «Лань», 2013. – 240 с.
22. Лучшие рефераты по экологии / под ред. И. А. Елисеева. — Ростов-на-Дону : Феникс, 2001. — 320 с.
23. Мирчинк, Т. Г. Почвенная микология. — М. : Изд-во МГУ, 1988. — 220 с.
24. Муромцев, Г. С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко, Т. Н. Тихоненко [и др.] — М. : Агропромиздат,

1990.-384 с.

25. Неклюдов, А. Д. Экологические основы биотехнологии / А. Д. Неклюдов, А. Н. Иванкин. — М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2006. — 420 с.

26. Нетрусов, А. И. Общая микробиология / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Академия, 2007. — 288 с.

27. Олескин, А. В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов / А. В. Олескин, И. В. Ботвинко, Е. А. Цавкелова // Микробиология, 2000. — Т. 69. — № 3. — С. 309-327.

28. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта [и др.]; пер. с англ. — М. : Мир, 1997. — 800 с.

29. Перспективы развития почвенной биологии : тр. Всерос. конф. / отв. ред. Д. Г. Звягинцев. — М. : МАКС Пресс, 2001. — 284 с.

30. Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. — М. : Высш. шк., 1989. — 587 с.

31. Рейвн, П. Современная ботаника : в 2-х т. / П. Рейвн, Р. Эверт, С. Айкхорн // под ред. А. Л. Тахтаджана; пер. с англ. — М. : Мир, 1990. — Т. 1, — 348 с.

32. Румянцев, С. Я. Микробы, эволюция, иммунитет. — Л. : Наука, 1984. — 176 с.

33. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фетергилл, М. Рипальди; пер. с англ. — М.: Мир, 2001. — 486 с.

34. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. пособие / под ред. В. С. Шевелухи. — М. : Изд-во ТСХА, 1995. — 302 с.

35. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Колос, 1993. — 175 с.

36. Умаров, М. М. Микробиологическая трансформация азота в почве / М. М. Умаров, А. В. Кураков, А. Л. Степанов. — М. : ГЕОС, 2007. — 138 с.

37. Шевелуха, В. С. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В. С. Шевелуха [и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. — М.: Высш. шк., 2003 — 460 с.
38. Шлегель, Г. История микробиологии / пер. с нем. — М.: Едиториал УРСС, 2002. — 304 с.
39. Шлегель, Г. Общая микробиология / под ред. Е. Н. Кондратьевой; пер. с нем. — М. : Мир, 1987. — 567 с.

## ГЛОССАРИЙ

Абиотические факторы – совокупность факторов неорганической среды, влияющих на жизнедеятельность и распространение живых организмов;

Анаэробы (греч. а, an-отрицательная частица, aer-воздух) – организмы, способные жить при отсутствии свободного кислорода;

Антропогенные факторы – факторы, включающие различные формы воздействия человека на отдельные компоненты и природные комплексы;

Аэробы (греч. aer-воздух, bios-жизнь) – организмы, живущие в среде, содержащей свободный, молекулярный кислород;

Бактериоцид (греч. bakterion-палочка, cido-убиваю) – антибактериальное вещество, вырабатываемое бактериями определенного вида и подавляющее жизнедеятельность бактерий другого вида;

Бацилла (лат. bacillum-палочка) – бактерия, имеющая форму палочки; - Биолюминесценция (греч. bios-жизнь, лат. lumen-свет) – видимое свечение организмов, связанное с процессами их жизнедеятельности.

Биота (греч. biote-жизнь) – сложившаяся совокупность живых организмов, объединенных общей территорией, вне зависимости от наличия или отсутствия экологических связей между ними.

Биотические факторы – совокупность влияний жизнедеятельности одних организмов на жизнедеятельность других, а также на неживую среду обитания;

Брожение – процесс окислительно-восстановительного превращения органических соединений, протекающий в анаэробных условиях и сопровождающийся выходом энергии, которую микроорганизмы используют для своей жизнедеятельности;

Вибрионы, спириллы и спирохеты – извитые бактерии, различающиеся морфологическим строением клетки;

Вирусы (лат. virus-яд) – неклеточная форма жизни, способная проникать в живую клетку и размножаться только внутри нее; вирусы – неклеточные частицы с упорядоченной организацией, содержащие генетический материал (ДНК или РНК), упакованный в белковую оболочку или капсид;

Дыхание – совокупность протекающих в организме физико-химических и физиологических процессов, в результате которых используемый клетками кислород окисляет органические вещества с освобождением энергии, необходимой для их жизнедеятельности;

Дыхание анаэробное – организмы получают необходимый для жизнедеятельности кислород в результате расщепления кислородосодержащих органических соединений (нитратное, сульфатное, карбонатное, другие разновидности анаэробного дыхания).

Жгутики, приспособления необходимые бактериальной клетке для

передвижения;

Ингибиторы (лат. *inhibeo*-останавливаю) – вещества, подавляющие активность ферментативных систем живых клеток, а также регулируют интенсивность обмена веществ, изменяя скорость биохимических процессов.

Индукция (лат. *inductor*-возбудитель, эффектор) – процессы, вызываемые веществом, которое стимулирует выработку фермента и без которого фермент в бактерии не синтезируется;

Капсула (лат. *capsula*-коробочка, футляр) – слизистое образование, расположенное поверх клеточной стенки;

Классификация (лат. *classis*-разряд, группа; *facere*-делать) – условное распределение всей совокупности живых организмов по иерархическим соподчиненным группам в соответствии с каким-либо общим признаком или признаками;

Клетка – основная структурная, генетическая и функциональная единица всех живых организмов; это самовоспроизводящаяся и саморегулируемая элементарная живая система, прошедшая длительную эволюцию;

Кокки – шаровидные бактерии, способные образовывать различные морфологические группы – диплококки, тетракокки, стафилококки и т.д.;

Конъюгация (лат. *conjugatio*-соединение) – половой процесс у бактерий, который контролируется специфической плазмидой (фактор фертильности); при этом происходит перенос генетического материала от одной бактериальной клетки к другой;

Культура микроорганизмов – совокупность жизнеспособных микроорганизмов одного или нескольких видов, выращенных на определенной питательной среде;

Метаболизм (греч. *metabole*-перемена, превращение) – совокупность всех химических изменений и превращений веществ энергии в организме, обеспечивающих развитие, жизнедеятельность, самовоспроизведение, а также связь организма с окружающей средой и адаптацию к изменениям внешних условий;

Микробиология (лат. *micro*-малый, *bios*-жизнь, *logos*-наука) – биологическая дисциплина, изучающая микроорганизмы – их систематику, морфологию, физиологию, биохимию, генетику и т.д.

Микроорганизм (греч. микрос-малый) – мельчайший в основном одноклеточный организм различной систематической принадлежности, видимый только в микроскоп;

Морфология (греч. *morphe*- форма и *logos*-понятие, учение) – комплекс научных отраслей и их разделов, исследующий форму и строение живых организмов;

Мутация (лат. *mutatio*-изменение) – резкое, скачкообразное изменение наследственных свойств организма, которое или естественно, или вызываемо искусственно;

Органоиды (греч. organon-орган, eidos-вид) – постоянно присутствующие в клетке структуры, выполняющие определенные жизненно важные функции.

Прокариоты (лат. pro-вместо, перед, греч. karyon-ядро) – предъядерные или доядерные организмы, клетки которых не имеют структурно оформленного ядра;

Размножение – важнейшее свойство живых организмов, обеспечивающее воспроизводство и увеличение количества особей данной популяции или вида;

Сидерофоры – вещества, выделяемые микроорганизмами, переводящие соединения железа в растворимую форму;

Спорообразование – фаза развития, способствующая распространению организмов в виде спор или сохранению их в неблагоприятных условиях существования;

Субстрат (лат. substratum-основа, подстилка) – опорный компонент и питательная среда, где постоянно обитают и развиваются микроорганизмы;

Таксис (греч. taxis-расположение в порядке) – движение свободно передвигающихся организмов по направлению к действующему стимулу (положительный таксис) или в сторону от него (отрицательный таксис);

Фаг, ...фаги (греч. phagos-пожиратель) – часть сложных слов, соответствующая по значению словам «поглощающий», «поедающий»;

Бактериофаг – вирус бактерий, способный поражать бактериальную клетку, размножаться в ней и вызывать ее растворение;

Ферменты или энзимы (лат. fermentum-брожение) – биологически активные вещества белковой природы, катализирующие все процессы обмена веществ в клетке;

Фототрофы или автотрофы (авто ... и греч. trophe-питание) – организмы, синтезирующие из неорганических соединений необходимые для жизни органические вещества за счет энергии солнца (фотосинтез) или энергии химических реакций (хемосинтез);

Хемосинтез (греч. chemeia-химия, synthesis-соединение) – процесс синтеза некоторыми видами бактерий органического вещества из углекислого газа за счет энергии, получаемой при окислении неорганических соединений;

Штамм (немец. Stamm-ствол, основа) – генетически однородная (чистая) культура в пределах данного вида микроорганизмов, которая характеризуется определенными свойствами;

Эволюция (лат. evolutio-развертывание) – процесс исторического развития живой природы.

Эукариоты (греч. eu-хорошо, полностью, karyon-ядро) – организмы, клетки которых содержат оформленное ядро, а также хорошо развита система мембран и присутствуют клеточные органоиды.