

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением
по естественнонаучному образованию
в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений высшего образования,
обучающихся по специальности
1-31 01 03 «Микробиология»*

МИНСК
БГУ
2016

УДК 579.69(075.8)

ББК 28.4я73

Э40

Авторы:

**М. И. Чернявская, А. В. Сидоренко, С. Г. Голенченко,
В. В. Лысак, А. С. Самсонова**

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент *Е. А. Храпцова*;
кандидат биологических наук *Е. М. Глушень*

Экологическая микробиология : учеб.-метод. пособие / М. И. Чер-
Э40 нявская [и др.]. – Минск : БГУ, 2016. – 63 с.
ISBN 978-985-566-268-7.

В учебно-методическом пособии рассматриваются основные термины и понятия по курсу «Экологическая микробиология», приводятся контрольные вопросы, тестовые задания для самоконтроля, рекомендации по выполнению лабораторных работ, приложения.

Предназначено для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-31 01 03 «Микробиология».

**УДК 579.69(075.8)
ББК 28.4я73**

ISBN 978-985-566-268-7

© БГУ, 2016

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы присутствуют повсеместно. Например, в одном грамме почвы их содержится миллиарды. Они объединены в систематические группы, обладают разнообразными свойствами и по-разному взаимодействуют между собой. *Экологическая микробиология* — это наука, которая изучает многообразие микроорганизмов в земных биомах, а также развивает подходы для исследования и последующего использования активности этих микроорганизмов.

Термин «микробная экология» («экологическая микробиология») впервые стали применять только в 60-х гг. XX в., хотя экологически направленные исследования микроорганизмов начали проводить задолго до этого. Еще А. Левенгук (1632–1723) выявил микроорганизмы в каплях дождевой воды (естественная среда обитания), а также исследовал влияние перца (фактор внешней среды) на микроорганизмы.

Основоположниками экологической микробиологии по праву считаются С. Н. Виноградский (1856–1953) и М. В. Бейеринк (1851–1931), разработавшие принципы получения элективных (накопительных) культур. Виноградский впервые использовал градиенты света, сульфида и кислорода для изучения природных популяций сульфидокисляющих фотоавтотрофных бактерий, сульфатовосстанавливающих и хемоавтотрофных сульфид- и сероокисляющих бактерий, одновременно присутствующих в одном местообитании и осуществляющих взаимозависимые процессы. Созданная модельная система получила название «колонка Виноградского».

В настоящее время можно выделить следующие направления исследований в области экологической микробиологии:

- 1) аутоэкология;
- 2) демэкология;

- 3) синэкология;
- 4) экофизиология;
- 5) экобиотехнология.

Аутэкология (от англ. out — внешний) — раздел экологии, изучающий влияние внешних абиотических факторов (физических и химических) на микроорганизмы.

Определение свойств совокупности особей одного вида (популяции) является предметом *демэкологии*. Известно, что популяция обладает свойствами, которые невозможно определить для отдельной особи данного вида, например количество особей в совокупности, скорость изменения их обилия, средний размер особи в совокупности и др. Поскольку основным объектом демэкологии выступает популяция, ее также называют популяционной экологией.

Синэкология (от лат. syn — вместе) — раздел экологии, изучающий взаимодействие данного микроорганизма с другими организмами, окружающими его, т. е. с биотическими факторами. Таким образом, объектом исследования синэкологии выступают сообщества организмов, а предметом — многообразие межвидовых взаимоотношений внутри этого сообщества. Взаимоотношения между микроорганизмами могут носить характер:

1) с и м б и о з а:

- *собственно симбиоза* — два или более вида создают взаимовыгодные условия для развития друг друга;

- *метабиоза* — выгоду извлекает только один партнер. Наиболее интересен синтрофический тип кооперации, когда при взаимодействии различных микроорганизмов может происходить такой процесс, который не способен осуществлять ни один из этих микроорганизмов в отдельности. Так, бактерии рода *Arthrobacter* в ассоциации с некоторыми видами *Streptomyces* могут полностью деградировать фосфорорганический инсектицид диазонин, используя его в качестве источника углерода и энергии. При этом ни один из этих организмов в отдельности на данном субстрате не растет;

- *сателлитизма* — разновидность метабиоза, при которой развитие одного микроорганизма стимулируется другим за счет выделения факторов роста;

- *синергизма* — члены ассоциации стимулируют развитие друг друга за счет выделения продуктов жизнедеятельности;

2) а н т и б и о з а (конкурентные отношения):

- *антагонизма* — активная конкуренция между видами, в результате которой происходит задержка или полное подавление развития микроорганизмов одного вида другим или взаимное угнетение;
- *хищничества* — одна группа организмов использует в пищу другую;
- *паразитизма* — один вид (паразит) использует другой вид (хозяина) в качестве источника питания и среды обитания, при этом хозяину наносится вред.

Взаимоотношения микроорганизмов с макроорганизмами в широком смысле определяются как симбиоз и могут носить характер:

- *мутуализма* — взаимовыгодного симбиоза, например симбиоза морских животных (рыб, моллюсков) со светящимися бактериями (*Photobacterium*, *Vibrio*), продуцирующими хитиназу — фермент, необходимый для гидролиза оболочек планктона, главной пищи большинства относительно крупных морских животных;

- *паразитизма* — один из партнеров по симбиозу, в данном случае макроорганизм, испытывает на себе вредное воздействие другого партнера — микроорганизма, который является патогенным. Паразитизм достаточно широко распространен среди микроорганизмов. Влияние паразитов на состояние макроорганизма происходит не только благодаря трофическим взаимодействиям (использование организма хозяина в качестве среды обитания и источника питания), но и патогенным воздействиям, обусловленным токсическими и иммунологически чужеродными метаболитами паразитов;

- *комменсализма* — микроорганизмы питаются за счет макроорганизма-хозяина, не нанося ему ущерба. Такой тип взаимодействия можно наблюдать, например, в ризосфере растения. В процессе роста и развития растения в почве формируются так называемые корневые депозиты, состоящие из корневых экссудатов (низкомолекулярных веществ — сахаров, гормонов, витаминов, аминокислот и др., выделяемых корнями растения в почву), высокополимерной слизи полисахаридной и белковой природы, отмерших клеток корня. Многие микроорганизмы используют корневые депозиты в качестве источника питания, поэтому вокруг корней растений наблюдается более высокая плотность микроорганизмов — ризосферный эффект.

Важным разделом экологической микробиологии является экофизиология — изучение микроорганизмов в связи с занимае-

мой ими экологической нишей — совокупностью условий, обеспечивающих существование вида. Понятие «экологическая ниша» включает не только физическое пространство, заселяемое конкретным организмом, но и условия, трофическое положение, его функциональную роль в сообществе. В микробиологии экологическая (фундаментальная) ниша более всего соответствует физиологической группе организмов, т. е. группе организмов с определенными функциональными свойствами (например, азотфиксаторы, сульфатредукторы, метаногены и др). Экологические ниши могут быть узкими и широкими. Однако два организма с одинаковыми потребностями при наличии между ними конкурентного взаимодействия не могут занимать одну экологическую нишу (правило Гаузе), поэтому реализованная экологическая ниша всегда более узкая, чем потенциальная.

Разработка подходов использования микроорганизмов для решения экологических проблем — одно из направлений экобиотехнологии. Особенно активно микроорганизмы применяются для очистки природных и производственных сред от загрязнителей различной природы: нефти, нефтепродуктов, пестицидов, отходов промышленности и т. д.

Тема 1. КОЛОНКА ВИНОГРАДСКОГО

Изучение разнообразия микроорганизмов немыслимо без выделения чистых культур, поскольку это позволяет получить достоверные сведения о свойствах тех или иных микроорганизмов и способах их взаимодействия. В естественных условиях чистые культуры микроорганизмов встречаются редко, поэтому на первом этапе их выделения получают накопительные культуры. Основная задача здесь сводится к созданию оптимальных условий для роста определенного вида или группы микроорганизмов по сравнению с другими.

Для получения накопительной культуры и последующего выделения фотоавтотрофных, хемолитотрофных и хемогетеротрофных микроорганизмов удобно использование колонки Виноградского. Она также является моделью, позволяющей представить взаиморасположение в водоеме разных групп микроорганизмов, прежде всего связанных с метаболизмом углерода и серы. Важнейшая закономерность, которую можно выявить, наблюдая за развитием колонки Виноградского, — возникновение вертикального градиента окислительно-восстановительных условий (от анаэробных в нижней части колонки к аэробным — в верхней) и создание экологических ниш для развития разных групп бактерий. В типичном случае в первые дни после постановки колонки в толще ила начинается анаэробное разложение органического вещества, катализируемое группой микроорганизмов-гидролитиков и первичных анаэробов (бродильщиков). Продукты брожения (H_2 , органические кислоты, спирты) используются вторичными анаэробами, в том числе сульфатредуцирующими бактериями. Продукты метаболизма последних (сульфид и CO_2) диффундируют в среду и служат субстратами для роста фототрофных аноксигенных (пурпурных и зеленых) и хемолитотрофных (тионовых, бесцветных серных) бактерий. Анокси-

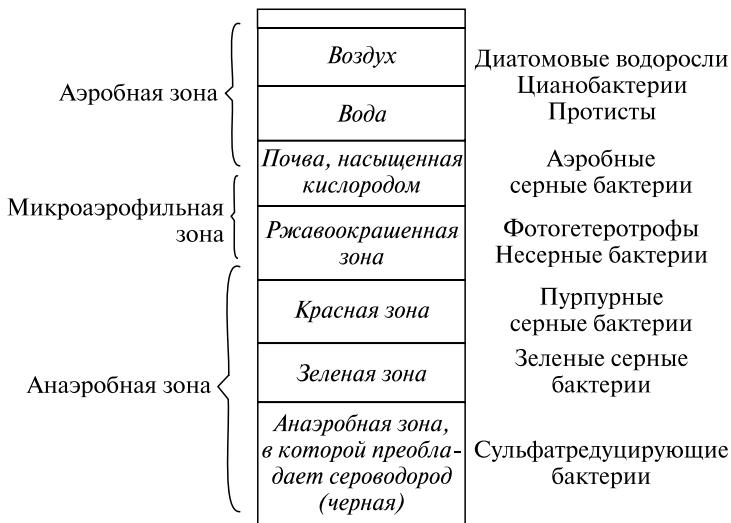


Рис. 1. Схема распределения различных групп микроорганизмов в колонке Виноградского

генные фототрофные бактерии развиваются в анаэробной зоне осадка и воды, образуя окрашенные слои или пятна на обращенной к свету стороне колонки. В верхней части колонки появляются цианобактерии и водоросли, выделяющие на свету O_2 . Тионовые и нитчатые бесцветные серные бактерии могут развиваться в условиях одновременного присутствия H_2S , диффундирующего снизу, и O_2 , поступающего сверху. В разные периоды времени в различных зонах колонки создаются условия для развития многочисленных групп микроорганизмов, входящих в состав экосистемы водоема (рис. 1). Полнота их учета зависит от времени инкубации колонки и тщательности наблюдений.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию «экологическая микробиология».
2. Перечислите основные направления исследований в области экологической микробиологии.
3. Какие типы взаимоотношений могут возникать между микроорганизмами?
4. Какие типы взаимоотношений могут возникать между микроорганизмами и макроорганизмами?

5. Каково значение накопительных культур в микробиологической практике?
6. Какие группы микроорганизмов позволяет изучить колонка Виноградского?

Лабораторная работа 1

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ ФОТОАВТОТРОФНЫХ И ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: заложить колонку Виноградского и наблюдать за ее развитием в течение 6–7 недель.

Материалы и оборудование: стеклянные колонки (цилиндры) высотой не менее 30 см и диаметром 8 см (объем – 500–1000 мл), ил из водоема или грязь (250–500 г, в зависимости от объема цилиндра), карбонат кальция (CaCO_3), сульфат кальция (CaSO_4), измельченная газетная или фильтровальная бумага, миска или контейнер для ила, ложка или шпатель для перемешивания, дистиллированная вода, кусок алюминиевой фольги, пластиковая крышка или парафилм, источник света (окно или лампа дневного света).

Ход работы

1. Из водоема отбирают ил/грязь (ил должен быть свежим, поэтому отбор проб необходимо проводить в день постановки колонки).
2. Из пробы ила/грязи убирают мусор.
3. В миску (контейнер) для смешивания переносят 125–250 г ила/грязи.
4. Добавляют 5 г CaCO_3 и 5 г CaSO_4 .
5. Если проба недостаточно влажная, добавляют немного воды.
6. Тщательно перемешивают.
7. Добавляют 10 г измельченной фильтровальной или газетной бумаги и снова перемешивают.
8. Полученную массу помещают в колонку (колонка должна быть заполнена приблизительно на $1/4$ – $1/3$ часть), тщательно утрамбовывают, чтобы удалить воздушные полости.
9. Оставшийся ил/грязь переносят в колонку (до уровня примерно 5 см от верха) и снова утрамбовывают.
10. Добавляют воду (она должна покрывать ил/грязь на 2–3 см).
11. Ждут, пока вода осядет (30 мин). В колонке должно остаться 2–3 см воздушного пространства над водой. Если воды больше – излишек удаляют, если меньше – добавляют до получения необходимого уровня.

12. Колонку герметично закрывают парафином, а затем фольгой.
13. Инкубируют колонку в течение 6–7 недель при комнатной температуре и непрямом солнечном свете (на окне).
14. Колонку проверяют каждую неделю, чтобы увидеть ее развитие.
15. Результаты наблюдений записывают в лабораторный журнал.

Тема 2. АУТЭКОЛОГИЯ.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

В естественных условиях микроорганизмы подвергаются воздействию абиотических факторов, значительно различающихся по своей природе и механизму действия. Тем не менее характер зависимости показателей жизнедеятельности микроорганизмов от уровня различных внешних факторов сходен. Для любого абиотического фактора существует диапазон изменений, в пределах которого показатели жизнедеятельности микроорганизма практически не изменяются, оставаясь на уровне, называемом оптимальным. Данный интервал получил название *зона оптимума*. Более низкие уровни фактора не обеспечивают полноценное функционирование микроорганизма, ограничивая интенсивность процессов его жизнедеятельности, и соответствующий интервал называют *зоной лимитирования*. Избыточные уровни фактора подавляют жизнедеятельность микроорганизмов, и этот интервал называют *зоной ингибирования*. Существуют экстремально высокие и экстремально низкие уровни фактора, при которых жизнедеятельность микроорганизма становится невозможной. Крайние пределы изменений фактора, которые организм способен перенести, принято называть *пределами толерантности*. Разные микроорганизмы имеют значительно отличающиеся пределы толерантности к одному и тому же экологическому фактору.

В большинстве случаев отношение микроорганизма к тому или иному абиотическому фактору отражают на графике зависимости роста от интенсивности фактора. При этом определяют так называемые кардинальные точки: *оптимальное значение* (или область значений), обеспечивающее наилучший рост, *минимальное* и *максимальное* значения, при которых рост прекращается. Диапазон между минимальным и максимальным значениями составляет *область толерантности*, в ней (вне зоны оптимума) микроорганизм активен, но имеет низкую конкурентоспособность и может быть вытеснен другими организмами. Область толерантности микро-

организма к определенному фактору может быть узкой или широкой. Организмы с широкими пределами толерантности называют *эврибионтами*, а организмы, способные существовать в относительно узких пределах изменений экологического фактора, – *стенобионтами*. Для стенобионтов следует принимать во внимание положение зоны их оптимума на шкале возможных изменений данного фактора. Например, среди стенотермных микроорганизмов различают психрофилы, температурный оптимум которых находится в области низких температур (0–4 °С), и термофилы с высокой оптимальной температурой роста (70 °С и выше).

Физико-химические условия обитания микроорганизмов в природе имеют достаточно широкий диапазон. Повсеместно распространенные условия называют *обычными*, или *нормальными*, а крайние значения факторов – *экстремальными*.

Температура – один из важнейших факторов внешней среды, влияющий на микроорганизмы. Действие температуры на рост микроорганизмов обусловлено ее воздействием на скорость химических реакций в клетке и состояние клеточных макромолекул (вязкость мембран, конформация белков и др.). Повышение температуры выше критического уровня ведет к необратимой инаktivации клеточных компонентов, в первую очередь денатурации белков и нуклеиновых кислот, и гибели микроорганизма. Для оценки летального эффекта температуры на клетки микроорганизмов используют количественные параметры: *термическую точку отмирания* (ТТО) – температуру, при которой данный организм погибает за 10 минут, и *термическое время отмирания* (ТВО) – время, за которое данный организм погибает при определенной температуре. Нижние пределы роста микроорганизмов ограничены температурой «застывания» мембраны, когда она теряет текучесть и перестает выполнять свои функции. При снижении температуры ниже минимального уровня микроорганизмы не погибают и могут в течение длительного времени сохранять жизнеспособность. При пониженной температуре снижается не только скорость роста, но и скорость отмирания микроорганизмов, и, соответственно, увеличивается их выживаемость. Поэтому замораживание микроорганизмов при низкой и сверхнизкой температуре (–20, –70, –196 °С) широко используется для длительного хранения.

Микроорганизмы встречаются в местах с различными температурными режимами. К *низкотемпературным* местам обитания микроорганизмов относятся регионы Арктики, Антарктики, тундра, глубины океанов, где температура имеет постоянное значение около 4 °С. *Высокотемпературные* места обитания – гейзеры, вулканические источни-

ки, горячие источники, «черные курильщики» (гидротермальные источники срединно-океанических хребтов) – выход вулканических горячих газов на разломах земной коры, где температура при высоком давлении может достигать 360 °С.

По отношению к температуре микроорганизмы подразделяют на несколько групп (рис. 2):

- *мезофилы* – растут при умеренной температуре. У многих из них температурный оптимум близок к температуре тела теплокровных животных (30–37 °С) или немного ниже (20–25 °С). Максимальная температура роста свободноживущих мезофилов составляет 45–50 °С и близка к максимальной температуре нагрева почвы. Большинство известных микроорганизмов являются мезофилами, в том числе излюбленный объект микробиологических исследований *Escherichia coli*;

- *психрофилы* – растут при температуре ниже 20 °С, вплоть до отрицательной температуры, оптимальная температура роста у них ниже 15 °С. К психрофильным микроорганизмам можно отнести представителей вида *Bacillus psychrophilus*, железобактерии рода *Galionella*. Психрофилы обитают в стабильно холодных условиях и чрезвычайно чувствительны даже к незначительному повышению температуры. Одна из причин психрофилии – тепловая денатурация клеточных белков при умеренной температуре (выше 20 °С). Для психрофилов характерен особый состав мембран с пониженной точкой заморозания. Они содержат больше ненасыщенных, короткоцепочечных и разветвленных жирных кислот и меньше циклических жирных кислот. Температурный оптимум

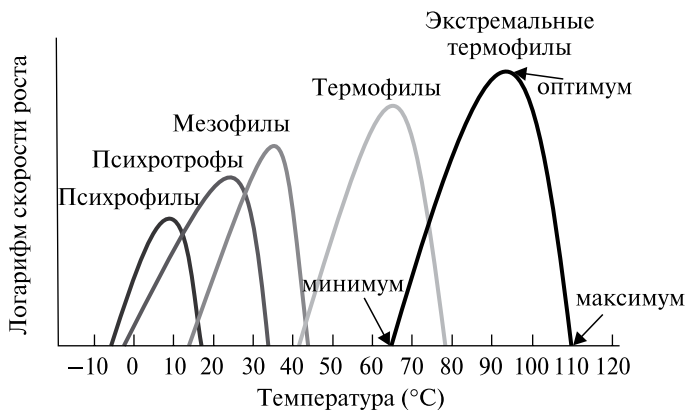


Рис. 2. Кривые роста различных групп микроорганизмов по отношению к температуре

активности ферментов у психрофилов ниже, чем у мезофильных микроорганизмов, а белоксинтезирующий аппарат способен функционировать при низких температурах;

- *психротрофы* – способны расти при 0 °С, однако по сравнению с психрофилами имеют более высокую оптимальную (20–30 °С) и максимальную (35 °С) температуру роста. К данной группе относят представителей некоторых видов *Pseudomonas* и *Arthrobacter*. Психротрофы приспособлены к сезонным изменениям климата и имеют селективные преимущества перед стенотермными видами, поскольку метаболически активны и в теплое, и в холодное время года. Многие из них – типичные обитатели холодильников, вызывающие порчу замороженных продуктов. Приспособление психротрофов к пониженной температуре проявляется в изменении состава мембран (увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот) и синтезе внутриклеточных криопротекторов (например, глицерола). Другой механизм адаптации связан с накоплением в клетках психротрофов больших количеств жизненно важных ферментов, функционирование которых позволяет клетке поддерживать достаточную активность даже при неоптимальной температуре. Психрофильные и психротрофные микроорганизмы играют важную роль в природных процессах в зоне холодного и умеренного климата. При исследовании метаногенного сообщества тундры группой российских ученых впервые обнаружено переключение трофического маршрута сообщества в зависимости от температуры, обусловленное сменой доминирующей группы микроорганизмов. При температуре выше 15 °С основным конечным процессом в сообществе был метаногенез, а ниже 15 °С – образование ацетата;

- *термофилы* – микроорганизмы, оптимальная температура роста которых выше 50 °С. В зависимости от «кардинальных» точек температурного диапазона их подразделяют на следующие группы: *термотолерантные* (температурный максимум – 45–50 °С), *факультативные* (максимум – 50–65 °С), *облигатные* (максимальная температура роста до 70 °С) и *экстремальные* (оптимальная температура роста – 70–75 °С, максимальная – 90 °С) термофилы. Примером термотолерантных микроорганизмов являются бактерии вида *Methylococcus capsulatus*; факультативных термофилов – гомоферментативные молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*; облигатных термофилов – представители вида *Bacillus stearothermophilus*; экстремальных термофилов – бактерии родов *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermoplasma*. Рекорд выживаемости при повышенной температуре отмечается у архей, отдельные культуры которых растут на питательных средах при температуре выше 110 °С. Например, *Methanopyrus kandleri* растет

при 122 °С – рекордно высокой температуре для всех известных организмов. У термофилов обнаружены высокотемпературные стабильные белки, термостабильные рибосомы, мембранные липиды содержат больше гликолипидов и тугоплавких насыщенных жирных кислот, ДНК и РНК ГЦ-типа. Ферменты термофилов более устойчивы к нагреванию по сравнению с аналогичными ферментами мезофилов, что в большинстве случаев обусловлено изменением первичной структуры белковой молекулы.

Термофильные микроорганизмы имеют огромное практическое значение. Они являются активными продуцентами ферментов, витаминов, органических кислот, кормового белка, используются для биологической очистки бытовых отходов с образованием биогаза.

Гидростатическое давление. Большинство микроорганизмов, живущих на поверхности земли или воды, не подвергаются значительным изменениям давления и растут при давлении около 1 атм. Однако существуют места, где давление значительно отличается от атмосферного. Повышенное давление в природе наблюдается в глубоких нефтяных скважинах (как правило, с высоким содержанием серы) и в глубинных зонах океанов, которые обычно характеризуются низкой температурой и малым содержанием питательных веществ. Микроорганизмы обнаружены в самом глубоком месте Мирового океана – Марианской впадине – при давлении ~1016 атм. Самое высокое искусственно созданное давление, при котором сохраняются микроорганизмы, – 1400 атм.

Повышение гидростатического давления приводит к разрушению клеточных структур и денатурации белков. В условиях повышенного давления клетки микроорганизмов перестают делиться, не расходятся после деления и приобретают нитевидную форму.

По отношению к высокому давлению микроорганизмы подразделяют на следующие группы:

- *пьезочувствительные (барочувствительные)* – микроорганизмы (обычно с газовыми вакуолями), которые при повышенном гидростатическом давлении перестают расти;
- *пьезотолерантные (баротолерантные)* – микроорганизмы, выдерживающие давление до 400 атм., способные расти при обычном давлении;
- *пьезофильные (барофильные)* – микроорганизмы, нуждающиеся для роста в повышенном давлении. *Умеренные* барофилы выдерживают давление до 850 атм., а *экстремальные* – выше 1000 атм.

Микроорганизмы подвержены действию различных видов **электромагнитных излучений**. В зависимости от длины волны электромагнитные излучения подразделяют на *ионизирующее* (до 10 нм), *ультрафиолето-*

вое (10–400 нм), инфракрасное (700–1100 нм) и видимую область (300–700 нм). Излучение может оказывать на микроорганизмы следующее воздействие:

- 1) физиологическое;
- 2) летальное и мутагенное;
- 3) тепловое и механическое.

Физиологическое действие оказывают ближний ультрафиолет, видимый свет и инфракрасные лучи (350–400–800–1100 нм). *Инфракрасные лучи* проявляют тепловое действие на микроорганизмы и используются зелеными и пурпурными бактериями в процессе фотосинтеза. *Видимая часть спектра* применяется для фотосинтеза цианобактериями и другими фототрофными бактериями. Разные фототрофные микроорганизмы поглощают свет различной длины волны. Пределы используемого спектра света определяются, с одной стороны, необходимостью наличия энергии для фотохимических реакций, с другой – необходимостью предотвращения деструкции пигментов. Электромагнитные волны важны для проявления фототаксиса. Существуют фотозависимые синтезы и у нефотосинтезирующих микроорганизмов (например, образование каротиноидов у микобактерий). Однако видимый свет и инфракрасное излучение не всегда положительно влияют на микроорганизмы. Под воздействием инфракрасных лучей может происходить перегрев клетки, а видимый свет в аэробных условиях приводит к образованию синглетного кислорода, что вызывает фотоокисление клеточных ферментов. В качестве защиты микроорганизмы синтезируют каротиноиды, служащие «тушителями» синглетного кислорода.

Ультрафиолет в зависимости от длины волны и дозы может оказывать на микроорганизмы летальный или мутагенный эффект. Наибольший летальный эффект УФ-лучей наблюдается при длине волны 260 нм, при которой происходит максимальное поглощение данного излучения молекулами ДНК. Летальное действие ультрафиолета обусловлено в первую очередь изменениями структуры ДНК (разрывом водородных связей, расщеплением связей между дезоксирибозой и фосфатом, образованием циклобутановых димеров тиминовых оснований, располагающихся в одной цепи), приводящими к ингибированию процессов репликации и транскрипции. Тиминовые димеры могут быть устранены двумя путями: фотореактивацией и темновой репарацией. В первом случае повреждение ДНК исправляется одним ферментом, активируемым видимым светом и устраняющим связи между тиминовыми основаниями в димерах. Во втором случае свет не нужен, и работают несколько ферментов: нуклеаза (вырезает поврежденный участок), ДНК-полимераза (синтезирует правильную структуру по комплементарной цепи) и лигаза (восстанавливает фосфодиэфирную связь).

Ультрафиолет с длиной волны 325—400 нм также вреден для микроорганизмов, поскольку наряду с формированием тиминовых димеров происходит разрушение триптофана и образование его токсичных фотопродуктов, действующих как химические мутагены. К воздействию ультрафиолета наиболее устойчивы микроорганизмы, в клетках которых содержатся каротиноиды. У гетеротрофных микроорганизмов каротиноиды служат защитной системой, уменьшающей повреждения нуклеиновых кислот, а у фототрофных бактерий они предохраняют бактериохлорофилл от фотоокисления.

При оценке зависимости выживаемости микроорганизмов от дозы УФ-облучения большое значение имеет плотность бактериальной суспензии. УФ-лучи интенсивно поглощаются бактериальной клеткой, поэтому при высокой концентрации клетки могут экранировать друг друга. Последнее обстоятельство не играет существенной роли в бактериальных суспензиях, в которых плотность не превышает 10^8 клеток/мл. При использовании густой бактериальной суспензии во время облучения ее необходимо постоянно перемешивать. Бактериальную суспензию следует распределять тонким слоем, поскольку УФ-лучи характеризуются низкой проникающей способностью, в силу чего клетки, располагающиеся более глубоко, не подвергаются их воздействию. Выживаемость клеток при действии УФ-излучения зависит от состава среды, используемой для их суспендирования. Облучение лучше всего проводить в буферных растворах. Жидкая полноценная питательная среда поглощает УФ-лучи интенсивнее, чем буферные растворы, поэтому получаемая клетками доза облучения уменьшается. В то же время при облучении в питательной среде могут образовываться токсические продукты, увеличивающие летальный эффект УФ-лучей, что затрудняет интерпретацию результатов. Летальный эффект УФ-лучей зависит от физиологического состояния, прежде всего возраста, бактериальной культуры. Клетки более чувствительны к действию УФ-лучей в экспоненциальной стадии роста.

Ионизирующее излучение — очень короткие волны с высокой энергией. Низкие уровни ионизирующего излучения могут вызывать у микроорганизмов мутации, а высокие почти всегда приводят к гибели. Основные повреждения клеток вследствие ионизирующего излучения включают разрушения водородных связей и кольцевых структур биологических молекул, их полимеризацию. В отличие от УФ-лучей ионизирующее излучение действует на биополимеры не напрямую, а опосредованно, вызывая образование свободных радикалов и органических перекисей, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами и белками, приводя к однонитевым и двунитевым разрывам цепей ДНК, изменениям азотистых оснований, окислению сульфгидрильных групп белков в дисульфидные.

Присутствие кислорода значительно усиливает действие ионизирующего излучения, вероятнее всего, из-за образования гидроксил-радикалов ($\text{OH}\cdot$). Микроорганизмы различных таксономических групп существенно отличаются чувствительностью к ионизирующему излучению. Например, бактерии *Clostridium botulinum* сохраняют жизнеспособность при дозе 1,5 Мрад, *Escherichia coli* – 0,18 Мрад. Существуют микроорганизмы, выделенные из облученных продуктов, воды атомных реакторов, залежей урановых руд, – *Deinococcus radiodurans*, *Shizosaccharomyces pombe*, устойчивые к дозе ионизирующего излучения в 2–3 Мрад, что объясняется наличием в их клетках мощных репарационных систем, исправляющих повреждения ДНК. Поскольку ультрафиолет и ионизирующее излучение в определенных дозах губительны для микроорганизмов, их используют для стерилизации.

Ультразвук – высокочастотные (~25 кГц) механические колебания упругой среды, не воспринимаемые органами слуха. При воздействии на микроорганизмы ультразвук создает большую разницу в давлении на отдельные части клетки, повреждая ее: разжижается и вспенивается цитоплазма, содержимое клетки смешивается с внешней средой. Чувствительность микроорганизмов к ультразвуку пропорциональна частоте колебаний, длительности воздействия и зависит от структурных особенностей и физиологического состояния клетки. Чем крупнее клетка, тем более она чувствительна к ультразвуку; палочки и извитые формы более чувствительны, чем кокки. При длительном воздействии ультразвука наблюдается полная гибель микроорганизмов, что используется в целях стерилизации. Ультразвук применяют также для разрушения бактериальных клеток с целью извлечения из них биологически активных веществ.

На развитие микроорганизмов оказывает воздействие изменение напряжения **магнитного поля**. Этот фактор в настоящее время рассматривается как экологический, определяющий протекание многих биологических процессов. Особенно чувствительны к изменению напряжения магнитного поля микроорганизмы, содержащие в клетках магнитосомы.

Следует отметить, что в природе микроорганизмы испытывают влияние не одного, а множества абиотических факторов (температура, свет, давление и др.), поэтому необходимо учитывать взаимодействие факторов друг с другом. Для каждого абиотического фактора, вызывающего необратимые изменения биомолекул большинства микроорганизмов, существует группа высокоспециализированных прокариот, оптимально развивающихся при экстремальных значениях определенного фактора.

Контрольные вопросы

1. На какие физиологические группы по отношению к температуре делят микроорганизмы?
2. Приведите пример низкотемпературных и высокотемпературных мест обитания микроорганизмов.
3. Каков механизм действия на микроорганизмы высокой и низкой температуры?
4. Перечислите морфологические и биохимические особенности термофилов и психрофилов.
5. На какие группы по отношению к гидростатическому давлению делятся микроорганизмы?
6. Перечислите повреждения клеток микроорганизмов, вызываемые повышенным гидростатическим давлением.
7. Какое действие оказывают на микроорганизмы излучения с разной длиной волны?
8. Перечислите основные повреждения прокариотической клетки, вызываемые УФ-излучением, и механизмы их репарации.
9. Назовите основные механизмы повреждающего действия ионизирующего излучения на микроорганизмы.
10. Какие факторы влияют на чувствительность микроорганизмов к ультразвуку?
11. Какие микроорганизмы наиболее чувствительны к изменению напряженности магнитного поля?
12. Приведите пример природного местообитания микроорганизмов, в котором сочетаются экстремальные значения нескольких абиотических факторов.

Лабораторная работа 2

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ И МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить влияние температуры культивирования на рост и метаболизм микроорганизмов разных систематических групп.

Материалы и оборудование: пептонно-дрожжевой агар (ПДА), пептонно-дрожжевой бульон (ПДБ), стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, стерильные пипетки на 1–2 и 5–10 мл, автоматический дозатор на 2–20 мкл, наконечники на 2–200 мкл, микробиологическая петля, стерильные шпильки, спиртовка, термостаты на 4, 10, 18, 28, 37, 42, 55 °С, вортекс, спектрофотометр или фотоколориметр.

Ход работы

1. Продукция красного пигмента (продигиозина) бактериями *Serratia marcescens* в зависимости от температуры культивирования.

- 1) Культуру *S. marcescens* засевают в две пробирки со скошенным ПДА.
- 2) Одну пробирку помещают в термостат при 28 °С, вторую – при 37 °С, инкубируют в течение 24–48 ч.
- 3) Продукцию красного пигмента (продигиозина) сравнивают при различной температуре культивирования.
- 4) Результаты записывают в лабораторный журнал, делают вывод о влиянии температуры культивирования на продукцию продигиозина.

2. Определение температурного диапазона и оптимальной температуры роста бактерий.

- 1) Накануне занятия в 2 мл ПДБ засевают исследуемые культуры бактерий родов *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Sarcina*. Инкубируют их при 28–37 °С в течение 18 ч.
- 2) В шесть стерильных пробирок вносят по 2 мл ПДБ.
- 3) По 20 мкл бактериальной культуры, тщательно перемешанной на вортексе, вносят в пробирки с ПДБ. Исходная концентрация клеток в каждой из 6 пробирок должна быть одинаковой для объективной оценки скорости роста бактерий при различной температуре культивирования.
- 4) Засеянные пробирки помещают в термостаты с соответствующей температурой (4, 10, 18, 28, 37, 42, 55 °С) и инкубируют в течение 24–48 ч.
- 5) Определяют оптическую плотность культуры при длине волны $\lambda = 600$ нм ($ОП_{600}$). За положительный рост принимают значение оптической плотности $ОП_{600} \geq 0,2$.
- 6) По результатам спектрофотометрических измерений строят график зависимости роста бактериальной культуры от температуры культивирования (рис. 3).
- 7) Делают вывод о температурном диапазоне и оптимальной температуре роста исследуемых культур бактерий.

3. Определение температурного диапазона роста бактерий.

- 1) Чашки с ПДА подписывают в соответствии с температурой инкубации (4, 10, 18, 28, 37, 42, 55 °С) и делят на сектора, на каждом из которых указывают название исследуемой культуры бактерий. Перед посевом чашки помещают в термостат с соответствующей температурой на 15–20 мин.
- 2) Бактериальные культуры с помощью бактериологической петли или шпигельки засевают на соответствующий сектор чашки Петри.

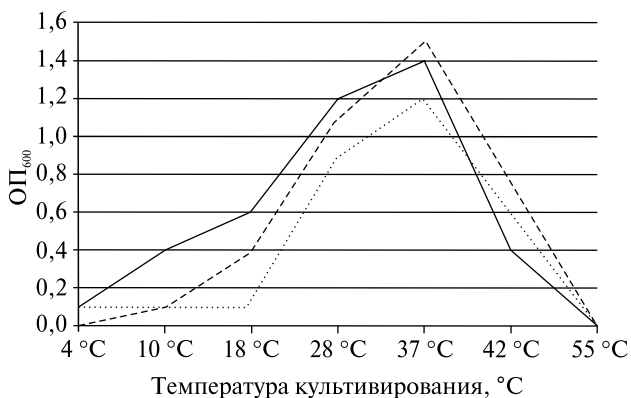


Рис. 3. Зависимость роста исследуемых культур бактерий от температуры культивирования:
 — культура 1; культура 2; ---- культура 3

3) Чашки помещают в термостаты с соответствующей температурой, инкубируют в течение 7 суток.

4) Результаты учитывают ежедневно, сравнивая рост бактерий при разной температуре. Результаты вносят в таблицу (табл. 1).

Таблица 1

Рост исследуемых культур микроорганизмов при разной температуре

Микроорганизм	Температура культивирования, °C						
	4	10	18	28	37	42	55

Примечание: «++++» – обильный рост, «+++» – хороший рост, «++» – умеренный рост, «+» – слабый рост, «-» – отсутствие роста.

Лабораторная работа 3

ДЕЙСТВИЕ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Цель работы: изучить действие экстремально высокой температуры (теплового стресса) на микроорганизмы разных систематических групп.

Материалы и оборудование: ПДБ, ПДА, стерильные пипетки на 1–2 мл, микробиологическая петля, шпатель, водяная баня, термометр, спиртовка, термостаты на 28 и 37 °С.

Ход работы

1. Накануне занятия культуры бактерий *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* засевают в 10 мл ПДБ и культивируют при 28–37 °С в течение 24 ч.

2. Перед началом эксперимента исследуемые культуры (по 0,1 мл) высевают шпателем на чашки Петри с ПДА (контроль).

3. Изучаемые культуры в количестве 2 мл вносят в шесть стерильных пробирок и помещают на водяную баню при 60, 80 или 100 °С (по две пробирки на каждую температуру). Одну из пробирок открывают и помещают в нее термометр для контроля температуры (контрольная пробирка), вторую оставляют для отбора проб (опытная пробирка).

4. Когда температура в контрольной пробирке достигнет необходимого значения, отмечают время начала эксперимента.

5. Через 10, 20, 30 и 40 мин после начала эксперимента из опытной пробирки отбирают пробы (по 0,1 мл) и высевают шпателем на чашки Петри с ПДА.

6. Засеянные чашки инкубируют при 28–37 °С в течение 48 ч.

7. Проводят учет результатов (табл. 2), определяют ТТО и ТВО исследуемых бактерий.

Таблица 2

Выживаемость исследуемых культур бактерий при действии теплового стресса

Микроорганизм	Температура, °С / время инкубации, мин											
	60 °С				80 °С				100 °С			
	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
<i>B. licheniformis</i>												
<i>S. aureus</i>												
<i>E. coli</i>												

Примечание: «+++» – хороший рост, «++» – умеренный рост, «+» – слабый рост, «-» – отсутствие роста.

Лабораторная работа 4

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Цель работы: исследовать чувствительность к УФ-излучению микроорганизмов различных систематических групп, определить зависимость выживаемости микроорганизмов от продолжительности УФ-облучения.

Материалы и оборудование: ПДБ, ПДА, физиологический раствор, пипетки на 1–2 мл, микробиологическая петля, шпатель, пинцет, стерильные диски плотной бумаги, бактерицидная лампа ДБ-15, термостат.

Ход работы

1. Изучение чувствительности бактерий к УФ-излучению.

1) Накануне занятия культуры бактерий засевают в 5 мл ПДБ и культивируют с аэрацией при 28–37 °С в течение 24 ч.

2) Исследуемые бактериальные культуры (0,1 мл) шпателем засевают на чашки Петри с ПДА.

3) На поверхность среды в центре чашки Петри помещают диск плотной бумаги, служащий экраном, защищающим клетки бактерий от воздействия УФ-лучей.

4) Облучение проводят в открытых чашках Петри с помощью бактерицидной лампы ДБ-15 в течение 3 мин на расстоянии 40 см.

5) По окончании облучения диск бумаги снимают стерильным пинцетом, чашки Петри закрывают и помещают в термостат для инкубации при оптимальной температуре.

6) Учет результатов проводят через 24 ч культивирования. Бактериальная культура чувствительна к УФ-свету, если сплошной рост наблюдается только в зоне помещенного диска, а на остальной поверхности среды отмечаются единичные колонии или отсутствие роста.

2. Зависимость выживаемости бактерий от дозы УФ-облучения.

1) Накануне занятия исследуемые культуры бактерий засевают в 5 мл ПДБ и культивируют с аэрацией при 28–37 °С в течение 18 ч.

2) Отдельно в колбочку наливают 27 мл стерильного ПДБ и помещают ее в термостат при соответствующей температуре.

3) Бактериальную культуру (3 мл) переносят в колбочку с 27 мл ПДБ и культивируют с аэрацией в течение 2 ч.

4) Клетки бактерий отмывают от питательной среды центрифугированием, ресуспендируют в 30 мл физиологического раствора.

5) По 5 мл бактериальной суспензии переносят в пять стерильных чашек Петри, которые помещают под УФ-лампу на расстоянии 40 см.

6) Чашки Петри открывают, включают УФ-лампу. Начало эксперимента отмечают сразу после включения лампы.

7) Бактериальную культуру облучают заданное время (30, 60, 90, 120 и 240 с), перемешивая содержимое чашек путем легкого покачивания.

8) Для определения количества жизнеспособных клеток из каждой чашки и необлученной суспензии отбирают пробы по 0,5 мл. Вносят в 4,5 мл физиологического раствора и готовят десятикратные разведения.

9) По 0,1 мл из 10^{-3} – 10^{-5} разведений бактериальной культуры (в соответствии с табл. 3) высевают на поверхность ПДА в двух чашках Петри.

Таблица 3

Жизнеспособность бактерий при действии УФ-излучения

Время облучения, с	Разведение	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Выживаемость, %
0 (контроль)	10^{-5}		100
30	10^{-5}		
60	10^{-4}		
90	10^{-3}		
120	10^{-3}		
150	10^{-2}		
180	10^{-2}		
240	10^{-2}		

10) Чашки инкубируют при оптимальной температуре в течение 48 ч.

11) Подсчитывают количество сформировавшихся колоний, определяют титр клеток и выживаемость облученных УФ-светом клеток.

12) Результаты вносят в таблицу (см. табл. 3). Строят график зависимости выживаемости бактерий от времени облучения (рис. 4).

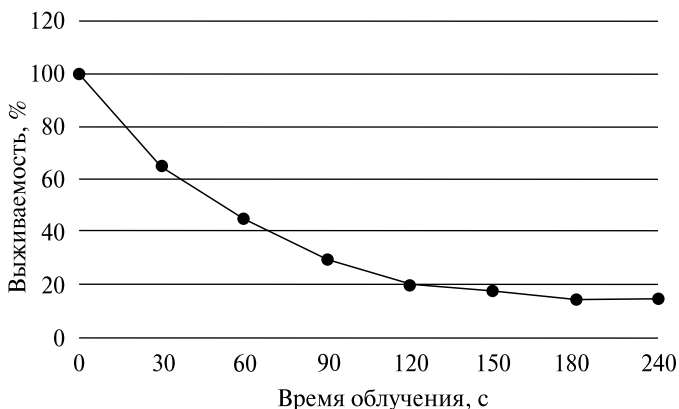


Рис. 4. Зависимость выживаемости исследуемых культур бактерий от продолжительности УФ-облучения

Тема 3. АУТЭКОЛОГИЯ. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Осмотическое давление в значительной степени зависит от активности воды (a_w), т. е. количества растворенных в ней веществ. В случае, когда концентрация солей в среде меньше, чем в клетке (*гипотонические растворы*), вода по градиенту концентрации растворенных веществ стремится внутрь клетки, и осмотическое давление возрастает, что может привести к лизису. Благодаря наличию клеточной стенки такое состояние не является опасным для большинства бактерий. При высоком содержании солей в среде (*гипертонические растворы*) происходит обезвоживание клеток (плазмолиз) и подавление их роста. Степень подавления роста зависит от типа среды и свойств микроорганизма.

По отношению к солёности среды микроорганизмы подразделяют на следующие группы:

- *пресноводные (негалофильные)*, в том числе обитатели ультрапресных вод, – развиваются в среде с содержанием солей менее 0,01 % и обычно чувствительны к концентрации NaCl 3,0 %;

- *морские* – как правило, растут в узком диапазоне концентрации соли (2,5–5,0 % NaCl); оптимум солёности составляет около 3,5 %. Типичными морскими бактериями являются *Photobacterium*, *Vibrio*, *Alteromonas*;

- *галотолерантные* – обычно выдерживают более высокие концентрации солей (до 13,0 % NaCl) и часто обитают в местах с изменяющейся солёностью, например в почве;

- *слабогалофильные* – растут при 1,5–5,0 % NaCl;

- *умеренные галофилы* – растут в диапазоне солёности примерно 5,0–15,0 % NaCl;

- *экстремальные галофилы* – развиваются при концентрации NaCl от 12,0–15,0 % вплоть до насыщенных растворов соли.

Особую группу составляют *галоалкалифилы*, растущие при высоких концентрациях соды и сочетающие свойства гало- и алкалифилов. Типичными местообитаниями данных микроорганизмов являются высокоминерализованные содовые озера.

Основным механизмом адаптации микроорганизмов к высокому осмотическому давлению окружающей среды служит синтез *осмопротекторов (осмолитов)* – низкомолекулярных органических соедине-

ний, нейтральных по отношению к метаболитам клетки, концентрация которых в цитоплазме уравнивает внешнее осмотическое давление. К осмопротекторам относятся аминокислоты и их производные (глицин-бетаин, пролин, глутамат), сахара (сахароза, трегалоза), спирты (глицерол, маннитол), гетерогликозиды. Состав осмолитов зависит от концентрации NaCl в среде и не одинаков у разных микроорганизмов, иногда они образуются в значительных количествах. Например, *Dunaliella viridis* накапливает до 30 % глицерола от общей массы клетки. Осмолиты хорошо удерживают воду, поэтому применяются в косметической промышленности в составе увлажняющих кремов (например, эктоин из галофильных аноксигенных фототрофов). Адаптация к повышенной солености у экстремально галофильных архей (порядок *Halobacteriales*) основана на аккумуляции ионов K^+ . Внутриклеточная концентрация ионов калия может быть в 1000 раз выше, чем в окружающей среде, т. е. ферменты галобактерий работают в солевом растворе. Подобная стратегия осмоадаптации обнаружена у некоторых эубактерий – *Salinibacter ruber* и представителей порядка *Haloanaerobiales*. Белки галофилов более «кислые» (содержат много аспартата и глутамата), в них устанавливаются гидрофобные взаимодействия, приводящие к более плотной упаковке глобул. На поверхности клеток работает механизм «белкового щита» (S-слои), когда наружу экспонируются COOH-группы аминокислот, удерживающие ионы Na^+ . Эти же группы формируют «гидратированную» оболочку клеток за счет электростатического ориентирования диполей воды. Галофилы осуществляют активный транспорт ионов из клетки, поддерживая таким образом определенный «осмостаз».

Для организмов, обитающих на суше, большое значение имеет приспособление к сухости и контакту с воздухом. Условия водного стресса и опасность высыхания создаются на поверхности скал, камней, деревьев, различных сооружений, в почве, особенно почве пустынь. Основным механизмом защиты от высыхания служит образование слизистых капсул и переживающих клеток (спор, конидий, цист). Высокую устойчивость к высыханию обнаруживают некоторые микобактерии с высоким содержанием липидов в клеточной стенке.

Кислотность среды является важным фактором, определяющим существование прокариот. Концентрация ионов водорода, с одной стороны, непосредственно влияет на клетку, ее электрический заряд, состояние мембраны, возможность протекания окислительно-восста-

новительных реакций; с другой – косвенно, определяя ионное состояние металлов и кислот, их доступность и токсичность.

Значения кислотности среды различных природных вод и растворов, где развиваются микроорганизмы, охватывают почти весь теоретически возможный диапазон рН – от 1–2 в кислых источниках до 10 в содовых озерах. По отношению к рН среды микроорганизмы подразделяют на ряд физиологических групп:

- *нейтрофилы* – микроорганизмы, для которых оптимальное значение рН близко к нейтральному (6,0–8,0), а рост возможен в диапазоне рН 4,0–9,0 (например, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis* и др.). Большинство природных местообитаний (пресноводные озера и реки, многие почвы, внутренняя среда растительных и животных организмов) имеют близкую к нейтральной реакцию среды; слабощелочной является морская вода;

- *ацидофилы* – микроорганизмы, оптимум рН у которых смещен к области кислотных значений (как правило, ниже 4,0), а рост возможен в диапазоне рН 0–5,5. Ацидофильные микроорганизмы делят на облигатные и факультативные, способные расти при нейтральном значении рН среды. Примером ацидофилов служат молочнокислые и уксуснокислые бактерии;

- *алкалофилы* – микроорганизмы, растущие в диапазоне рН 8,5–11,5, которые также делятся на факультативные (способны расти в нейтральной среде) и облигатные. Примером алкалофилов служат уробактерии и цианобактерии.

Несмотря на экстремальные значения рН окружающей среды, значение внутриклеточного рН достаточно стабильно и поддерживается у алкало- и ацидофильных микроорганизмов на уровне рН ~7,5. Постоянству внутриклеточного значения рН (*pH-гомеостаза*) способствует низкая проницаемость цитоплазматической мембраны для протонов H^+ . Однако, поскольку протоны медленно диффундируют по градиенту концентраций, клетка использует энергозависимые механизмы их выброса. При небольшом закислении среды бактерии применяют антипорт протонов Na^+ и K^+ . При скачкообразном падении рН включается синтез специальных шаперонов (белков «кислотного шока»), которые предотвращают кислотную денатурацию цитоплазматических белков и восстанавливают конформацию денатурированных белков.

В процессе жизнедеятельности микроорганизмы могут изменять рН среды, продуцируя кислые или щелочные продукты. Например,

E. coli реагирует на повышение кислотности среды синтезом декарбок-силаз аминокислот. Образующиеся в результате амины подщелачивают среду. И наоборот, повышение рН среды стимулирует синтез дезаминаз аминокислот, что ведет к подкислению среды. Яркий пример регулирования рН среды бактериями – двухфазный процесс ацетонобутилового брожения у *Clostridium acetobutylicum*. Первая фаза – кислотная, в которой при сбраживании глюкозы образуются масляная и уксусная кислоты. Вторая фаза – ацетонобутиловая, в которой по мере подкисления среды (до рН ниже 5,0) индуцируется синтез ферментов, приводящих к образованию и накоплению нейтральных продуктов, в первую очередь *n*-бутанола, ацетона и этанола.

Микроорганизмы используют энергию окислительно-восстановительных реакций, поэтому одним из важнейших факторов, влияющих на их развитие, является **окислительно-восстановительный потенциал** среды (Eh). Значение Eh характеризует восстановленность среды и определяет термодинамическую возможность окислительно-восстановительных реакций. Жизнедеятельность микроорганизмов приводит к изменению окислительно-восстановительного потенциала среды. Основными восстановителями в природе служат H_2 и H_2S , часто образующиеся бактериями; главный окислитель – молекулярный кислород. Окислительно-восстановительный потенциал, изменяющийся от –500 до +800 мВ, может служить показателем наличия кислорода в среде: чем больше его отрицательное значение, тем более восстановлена среда (анаэробные условия).

Молекулярный кислород выступает по отношению к микроорганизмам не только как фактор, определяющий окислительно-восстановительные условия среды и возможность протекания химических реакций, но и как важнейший катаболический субстрат, акцептор электронов для аэробных микроорганизмов. Концентрация кислорода в природных местообитаниях варьирует в широких пределах. Атмосферный воздух содержит 21 % кислорода. Растворимость O_2 в воде мала (около 8 мг/л при 20 °С) и значительно снижается с ростом температуры и солености. При наличии в среде легкоокисляемых субстратов, прежде всего органических соединений, кислород быстро потребляется аэробами и в условиях ограниченного обмена с атмосферой становится лимитирующим фактором. Во многих природных местообитаниях (ил, цианобактериальные маты) в пределах долей миллиметра создаются резкие градиенты концентрации O_2 , вплоть до полного его исчерпания. Аналогичный перепад кон-

центраций кислорода наблюдается в почве, где в пределах одной почвенной частицы имеются аэробные и анаэробные микрзоны.

По отношению к кислороду микроорганизмы делятся на две группы: *аэробы*, растущие только при наличии кислорода, и *анаэробы*, способные расти без него (табл. 4). Среди бактерий и простейших имеются как аэробные, так и анаэробные формы. Грибы — аэробы, хотя некоторые виды, как правило дрожжевые анаморфы, — факультативные анаэробы. Существует небольшое количество и облигатно анаэробных видов.

Таблица 4

Группы микроорганизмов по отношению к молекулярному кислороду

Группа микроорганизмов	Характеристика	Пример
Облигатные аэробы	Требуют наличия молекулярного кислорода; тип метаболизма — аэробное дыхание	<i>Micrococcus luteus</i>
Факультативные анаэробы	Не требуют наличия молекулярного кислорода, но лучше растут в его присутствии; тип метаболизма — аэробное или анаэробное дыхание, брожение	<i>Escherichia coli</i>
Микроаэрофилы	Требуют наличия молекулярного кислорода, но в концентрации ниже атмосферной; тип метаболизма — аэробное дыхание	<i>Spirillum volutans</i> , <i>Beggiatoa spp.</i>
Аэротолерантные анаэробы	Могут расти при наличии небольшого количества кислорода; тип метаболизма — брожение	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
Облигатные анаэробы	Молекулярный кислород угнетает их рост или приводит к гибели; тип метаболизма — брожение или анаэробное дыхание	Гелиобактерии, метаногенные бактерии

Токсическое действие O_2 на микроорганизмы заключается в инактивации чувствительных к кислороду белков (например, нитрогеназы), а также получении высокорекреационных форм кислорода. Образование активных форм кислорода происходит при участии нескольких ферментов:

1) $O_2 + 4e^- \rightarrow 2O^{2-}$ (оксид-анион) – цитохромоксидаза, лакказы, тирозиназа;

2) $O_2 + 2e^- \rightarrow O_2^{2-}$ (H_2O_2) – флавиновые ферменты (глюкозооксидаза, оксидаза аминокислот, ксантинооксидаза);

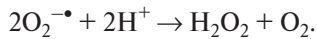
3) $O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ (супероксидрадикал);

4) $O_2^{\bullet -} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow H_2O + O_2 + OH^{\bullet}$ (гидроксиладикал) – альдегидоксидаза, НАДН-оксидаза.

Наиболее часто образующиеся перекись водорода и супероксидрадикал удаляются специальными ферментами.

Каталаза разлагает перекись в реакции $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$, пероксидаза – в реакции $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$, где R – окисленный субстрат пероксидазной реакции.

Супероксидрадикал удаляется супероксиддисмутазой (СОД):



В присутствии света может образовываться синглетный кислород:



где P – пигмент-сенсбилизатор.

Функцию «тушения» синглетного кислорода в клетке выполняют каротиноиды.

У аэробов и факультативных анаэробов в клетках присутствуют СОД, каталаза, пероксидаза, в то время как у облигатных анаэробов данные ферменты отсутствуют. Однако у некоторых метаногенов и кластридий обнаружены каталаза и СОД, имеющие важное значение при существовании в условиях нестабильного анаэробноза. Сульфатредукторы, использующие водород, способны активно бороться с кислородом, осуществляя сульфатное дыхание. Необходимо отметить, что у аэробов также имеются ферменты, чувствительные к кислороду (например, нитрогеназа). В таких случаях клетки обладают определенными механизмами защиты (например, клубеньки – у *Rhizobium*, капсулы – у *Azotobacter*, гетероцисты без фотосистемы II – у цианобактерий). Несмотря на токсичность кислорода для облигатных анаэробов, они могут существовать в постоянно аэробных местообитаниях в сообществе с аэробными и факультативно анаэробными микроорганизмами, которые поглощают O_2 . Примерами таких сообществ являются цианобактериальные маты, где верхний слой аэробный и кислородный, а нижний – анаэробный; микробиота ротовой полости, где облигатно анаэробные бактерии *Porphyromonas gingivalis* обитают в отложениях зубного камня.

Контрольные вопросы

1. Какое воздействие на микроорганизмы оказывают гипо- и гипертонические условия окружающей среды?
2. На какие физиологические группы делят микроорганизмы по отношению к солености среды?
3. Назовите механизмы адаптации микроорганизмов к обитанию в условиях повышенного осмотического давления среды.
4. На какие группы делят микроорганизмы по отношению к кислотности среды? Приведите примеры представителей каждой группы.
5. Назовите основные механизмы поддержания внутриклеточного рН-гомеостаза в бактериальной клетке.
6. Какие группы микроорганизмов выделяют по отношению к кислороду?
7. Чем обусловлено токсическое действие кислорода на клетки микроорганизмов?
8. Перечислите механизмы защиты микроорганизмов от высокорекреационных форм кислорода.

Лабораторная работа 5 **ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ И КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ** **НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Цель работы: изучить рост микроорганизмов различных систематических групп на питательных средах с разной кислотностью и соленостью (осмотическим давлением).

Материалы и оборудование: ПДБ с различными значениями рН (3,0; 5,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0), ПДА с добавлением 0,5, 5, 10, 15 % NaCl, автоматический дозатор на 2–20 мкл, стерильные пипетки на 1–2 мл, наконечники на 10–200 мкл, микробиологическая петля, спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, спиртовка, термостат.

Ход работы

1. Влияние осмотического давления на рост микроорганизмов.

- 1) Культуры исследуемых бактерий штрихом засевают на чашки Петри с ПДА с добавлением 0,5, 5, 10, 15 % NaCl.
- 2) Чашки инкубируют при температуре 28–37 °С в течение 48–72 ч.
- 3) Результаты учитывают визуально, сравнивая рост бактерий на чашках с разной концентрацией NaCl. Результаты вносят в таблицу (табл. 5).
- 4) Делают вывод об устойчивости исследуемых штаммов микроорганизмов к солености среды.

Рост исследуемых микроорганизмов при разных концентрациях NaCl

Микро- организм	Концентрация NaCl, %			
	0,5	5	10	15

Примечание: «+++» – хороший рост, «++» – умеренный рост, «+» – слабый рост, «–» – отсутствие роста.

2. Рост микроорганизмов при разных значениях pH среды.

1) Накануне занятия исследуемые культуры бактерий засевают в ПДБ и культивируют при оптимальной температуре в течение 24–48 ч.

2) По 10 мкл выросшей культуры вносят в шесть пробирок, содержащих 2 мл ПДБ с разными значениями pH (3,0; 5,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0). Необходимо, чтобы начальное количество клеток во всех пробирках было одинаковым.

3) Пробирки с изучаемыми культурами инкубируют при оптимальной температуре в течение 24–48 ч.

4) Учет результатов проводят с использованием спектрофотометра или фотоэлектроколориметра. Показатель оптической плотности культуры сравнивают с оптической плотностью ПДБ с соответствующим значением pH (контроль). Измерения проводят при длине волны 600 нм (OP_{600}).

5) По результатам измерений строят график (рис. 5).

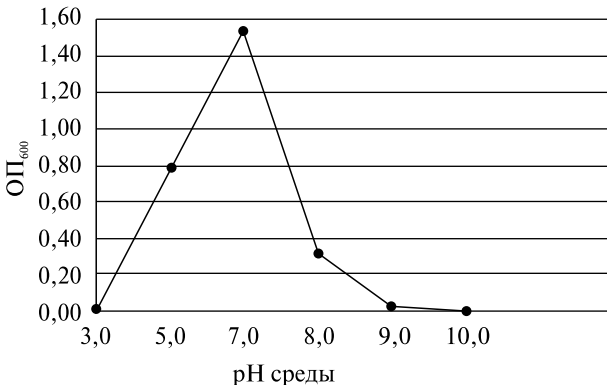


Рис. 5. Показатели накопления биомассы бактериальных культур в зависимости от pH питательной среды (24 ч культивирования)

6) Делают вывод об оптимальном значении pH для роста исследуемых микроорганизмов.

Тема 4. МИКРОБИОЦЕНОЗЫ ВОЗДУХА, ВОДОЕМОВ И ПОЧВ

В природных условиях микроорганизмы не существуют в виде чистых культур. Они растут в смешанных культурах, являясь при этом частью более сложного сообщества, включающего организмы других систематических групп. Места обитания микроорганизмов имеют сложный и постоянно меняющийся характер и зависят от градиентов питательных веществ, лимитирующих факторов (температура, рН, свет, активность воды и др.), наличия токсических соединений. Сочетание вышеперечисленных факторов определяет экологическую нишу конкретного микроорганизма.

Воздух — неблагоприятная среда для микроорганизмов. В воздухе нет питательных веществ, постоянной оптимальной температуры, часто отсутствует влага, губительно действуют солнечные лучи. Микроорганизмы попадают в воздух главным образом с пылью или каплями жидкости с поверхности почвы, воды, растений, животных, транспорта. Микроорганизмы в воздухе распространены неравномерно. Атмосферный и воздух закрытых помещений значительно отличаются по качественному и количественному составу микроорганизмов. Количество микроорганизмов в атмосферном воздухе зависит от погоды (в дождливую погоду их меньше, чем в сухую), времени года (летом их больше, чем зимой), места (над крупными населенными пунктами их больше, чем над сельской местностью). Микроорганизмов мало в воздухе над лесами, садами, лугами, озерами, океаном, высоко в горах. Микробиота воздуха характеризуется наличием большого количества кокковых форм (микрококков, диплококков, сарцин, стафилококков), бацилл (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mesentericus*), грибов (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*), устойчивых к недостатку влаги и ультрафиолетовым лучам.

Содержание микроорганизмов в воздухе жилых помещений выше, чем в атмосферном воздухе. При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задачи исследования определяют общее микробное число, наличие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков, α - и β -гемолитических стрептококков). При исследовании воздуха медицинских учреждений (хирургические клиники, родильные дома) основное внимание направлено на выявление патогенных стафилококков, синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) и других грамотрицательных условно-патогенных бактерий — возбудителей внутрибольничных инфекций. На предприятиях микробиологической промышленности

выявляют наличие и количественное содержание микроорганизмов-продуцентов (*Candida* на гидролизно-дрожжевых заводах и заводах по производству белково-витаминных концентратов; *Aspergillus* и спорообразующие бактерии на ферментных заводах; *Bacillus thuringiensis* и сальмонеллы — при производстве бактериальных средств защиты растений).

Для изучения микробиоты воздуха, в том числе определения содержания патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, используют специальные дифференциально-диагностические среды. Исследование микробиоты воздуха осуществляют с помощью нескольких методов:

- *седиментационного (метод Коха)* — базируется на оседании частиц и капель, содержащих бактерии, на поверхности питательной среды открытой чашки Петри. Затем проводят перерасчет по Омелянскому: на поверхность 100 см² плотной среды оседает за 5 мин такое количество бактерий, которое содержится в 10 л воздуха. Метод не точен и не пригоден для исследования микробиоты атмосферного воздуха, где наблюдаются большие скорости его движения;

- *аспирационных* — основаны на принудительном осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхность плотной питательной среды или в улавливающую жидкость. С использованием прибора Дьяконова происходит улавливание бактерий в жидкости при продувании через нее воздуха, после чего жидкость высевают на различные дифференциально-диагностические среды. С помощью прибора Речменского происходит осаждение микробных аэрозолей паром или распыленной жидкостью. Аппарат Кротова функционирует по принципу ударно-прибивного действия воздушной струи. Струя воздуха проходит через узкую клиновидную щель и с большой скоростью ударяется о влажную поверхность питательной среды. В результате удара находящиеся в воздухе аэрозоли, в том числе пылевые частицы и капли, содержащие бактерии, прибиваются к поверхности питательного агара или элективных сред. Данные методы наиболее точны и надежны.

Вода водоемов содержит большое количество микроорганизмов, относящихся к автохтонной микробиоте, а также попадающих в нее с осадками, сточными водами и другими загрязнениями аллохтонных микроорганизмов. Количественный и видовой состав микробиоты воды в значительной степени зависит от условий среды (наличие питательных веществ, температура, аэрация, окислительно-восстановительные условия, рН и др.).

Автохтонная микробиота рек, озер, морей и океанов представлена аэробными видами водных бактерий различных таксономических и физиологических групп. Общее количество автохтонной микробиоты в открытых водоемах зависит от вида водоема, состава и концентрации орга-

нических и неорганических веществ, метеорологических условий, поры года. Водные микроорганизмы осуществляют в водоемах замкнутые циклы основных биогенных элементов, поскольку в микробных сообществах присутствуют первичные продуценты органического вещества (эукариотические и прокариотические фототрофы, прокариоты-хемоавтотрофы), консументы (простейшие) и редуценты (большинство гетеротрофных бактерий и грибов). В *поверхностной зоне водоема* преобладают микроорганизмы, способные находиться во взвешенном состоянии: клетки, имеющие жгутики, простеки, прикрепительные диски, газовые вакуоли или организмы малых размеров. В этой зоне доминируют олиготрофы и простекобактерии родов *Hyphomicrobium*, *Planctomyces*, *Blastobacter*, *Pasteuria*, *Caulobacter*, *Asticcacaulis*, *Prosthecomicrobium*, *Seliberia*, *Prosthecochloris* и др. К типично планктонным бактериям относятся спириллы. Преобладающими типами метаболизма являются фототрофия, метилотрофия, нитрификация. В зависимости от градиента факторов *толща воды* делится на подзоны фотосинтеза, продукции биомассы гетеротрофных и хемолитотрофных микроорганизмов, деструкции органического вещества и термоклина. В аэробной толще воды (на глубине до 10 м) разлагается основная масса органического вещества, синтезированного в водоеме и привнесенного извне. Миксобактерии, а также бактерии родов *Flexibacter* и *Cellvibrio* способны лизировать живые клетки цианобактерий и зеленых водорослей. Биополимеры мертвой массы микроорганизмов, фитопланктона, высших растений и животных разлагают миксобактерии и представители родов *Sporocytophaga*, *Lysobacter*, *Beneckea*, *Alginomonas*, *Vibrio*, *Cytophaga*. В поверхностном слое ила обитают прикрепленные или скользящие микроорганизмы: микроаэрофильные бактерии родов *Flexibacter*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, факультативно-анаэробные цитофаги и бациллы, нитчатые бактерии *Pelonema*, *Peloploca*, *Leucothrix*, *Metallogenium*, *Hyphomicrobium*, *Seliberia*, зеленые нитчатые бактерии. Анаэробный распад органического вещества в приповерхностном слое донных осадков осуществляют кластридии и энтеробактерии. Нижние слои ила составляют сульфатредукторы и метаногены, завершающие анаэробную деструкцию упавших на дно растительных и животных остатков.

В *олиготрофных* и бедных органическим веществом водах присутствуют скользящие и простековые бактерии, способные прикрепляться к доступному субстрату и обрастать его, образуя хлопья (флоки).

В *морских водах* находится большое количество вирусов, архей, ультрамикробактерий (нанобактерий). Археи, традиционно обнаруживаемые в экстремальных местообитаниях, составляют приблизительно третью часть пикопланктона (клетки размером менее 2 мкм). Морские ультрами-

кробактерии, главным образом представители рода *Sphingomonas*, устойчивы к голоданию и имеют чрезвычайно малые размеры, благодаря которым не поедаются даже нанофлагеллятами.

В *прибрежных зонах* водоемов численность и видовой состав водных микроорганизмов резко возрастает. Это связано с их загрязнением аллохтонной микробиотой, попадающей из почвы с ливневыми, тальными и сточными водами. Микробиота сточных вод содержит обитателей кишечника человека и животных, включая представителей нормальной и условно-патогенной микробиоты. Патогенные бактерии слабо приспособлены к существованию в воде, где на них оказывают неблагоприятное воздействие солнечный свет и другие факторы окружающей среды, включая конкурентную водную микробиоту. Тем не менее многие из них могут сохраняться в водной среде довольно продолжительное время.

Микробиологические методы исследования воды сводятся к определению общего количества микроорганизмов в 1 мл воды и выявлению патогенных микроорганизмов (сальмонелл, холерных вибрионов, лептоспир, шигелл и энтеровирусов). Поскольку прямое выделение патогенных бактерий из воды требует специальных исследований, существуют косвенные методы, позволяющие количественно оценить степень загрязнения воды (выявление бактерий группы кишечной палочки – БГКП, энтерококков, стафилококков). Обязательному санитарно-микробиологическому исследованию подлежит вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, плавательных бассейнов. Пробы воды для санитарно-микробиологического исследования из открытых водоемов (бассейнов, баков и др.) отбирают с глубины 10–15 см, при малой глубине – не менее 10–15 см от дна. Пробы из проруби берут на глубине 10–15 см от нижней поверхности льда. Пробы воды из желаемого водного горизонта открытых водоемов (колодцев, озер, рек) отбирают с помощью батометра. Микробиологическое исследование отобранных проб воды должно осуществляться не позднее, чем через 2 ч после отбора. В случае невозможности соблюдения этих сроков допускается проведение анализа воды не позднее чем через 6 ч хранения пробы при температуре 1–6 °С. Исследование микробиоты воды осуществляют с помощью следующих методов:

- *определение общего микробного числа воды* – количества микроорганизмов в 1 мл воды. Питьевая вода считается хорошей, если общее количество бактерий в 1 мл не превышает 100, сомнительной – 100–150, загрязненной – 500 и более;

- *определение коли-титра и коли-индекса воды*. Коли-титр – минимальное количество воды (мл), в котором обнаруживаются БГКП.

Коли-индекс — количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды (по международному и европейскому стандарту — в 100 мл). Эти показатели устанавливают с помощью двухэтапного бродильного (титрационного) метода или метода мембранных фильтров. *Бродильный метод* основан на посеве определенных объемов анализируемой воды и подрачивании при 37 °С в средах накопления с последующим высевом на плотную среду Эндо, дифференцировании выросших бактерий и выявлении наибольшего вероятного числа БГКП в 1 л воды по таблицам. *Метод мембранных фильтров* включает концентрирование бактерий из определенных объемов анализируемой воды на мембранном фильтре, выращивание их при 37 °С на среде Эндо, дифференцирование выросших колоний, подсчет количества БГКП в 1 л воды.

Почва — благоприятная среда для развития микроорганизмов, она обильно населена ими и является основным источником их распространения. В почве есть все необходимое для жизнедеятельности микроорганизмов — органические и минеральные вещества, влага, защита от губительных ультрафиолетовых лучей солнца. Количество микроорганизмов в почве и их видовой состав зависят от различных почвенно-климатических факторов: механического состава почвы, ее влагоемкости, кислотности, вида обработки, времени года и др. В почве много палочковидных бактерий, актиномицетов, плесневых грибов. При анализе микробиоты почвы следует учитывать, что культивируемыми в лабораторных условиях являются только 1–10 % почвенных микроорганизмов. Некультивируемые формы выявляются с помощью молекулярно-генетических методов: полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ее различных модификаций, лигазной цепной реакции (ЛЦР), ДНК-ДНК гибридизации, гибридизации тотальной клеточной РНК.

Почвы содержат множество поверхностей, влияющих на доступность питательных веществ, а различный размер пор делает их в разной степени доступными для колонизации микроорганизмами. Почвы состоят из песка, глины, ила и других частиц. Постоянно прибывающие в виде растительных и животных остатков органическое вещество постепенно трансформируется в богатый питательными веществами гумус. Перечисленные компоненты формируют гетерогенные агрегаты, или почвенные частицы, пронизанные сложной сетью пор. Бактерии и грибы используют разные стратегии для получения преимуществ в этом физически сложном субстрате. На поверхности почвенных частиц бактерии обычно присутствуют в виде микроколоний, в почвенном растворе в порах — в виде суспензии. Бактерии нуждаются в непо-

средственной близости воды и питательных веществ. Мицелиальные грибы растут на почвенных агрегатах или между ними и могут формировать мостики между отдельными агрегатами, добираясь в места, где влага более доступна. Простейшие обитают в водной пленке.

Почвы формируются в различных условиях окружающей среды. В местах выветривания нового геологического материала после землетрясения или извержения вулкана начинается его колонизация микроорганизмами. «Пионерами» здесь выступают цианобактерии, способные к фотосинтезу и азотфиксации. Большую роль в формировании и функционировании почв играют грамположительные бактерии: коринеформные и нокардиоформные бактерии, актиномицеты.

Критическим является распределение микроорганизмов по почвенному профилю: 1) на поверхности почвы в области подстилки и опада; 2) в аэрируемом слое с развитой корневой системой растений; 3) ниже уровня почвенных вод.

Разлагающийся растительный опад – область развития гидролитических аэробных микроорганизмов, оптимальная среда для развития сапротрофных грибов, поскольку опад представлен в первую очередь лигноцеллюлозой. К характерным сапротрофным грибам в подстилке относятся *Alternaria* и *Cladosporium*, в нижележащем гумусовом слое доминируют *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*. Продукты разложения грибами опада, а также отмерший мицелий служат субстратом для развития микофильных бактерий и актиномицетов.

Большой интерес представляет ассоциация микроорганизмов почвы с корневой системой растений. Корни располагаются в почвенном горизонте, наиболее богатом органическим веществом. Взаимодействие микроорганизмов с корневой системой растений включает в себя:

- 1) область почвы, прилегающую к корням растения и попадающую под непосредственное действие корневых выделений, – ризосферу;
- 2) поверхность корня – ризоплану;
- 3) ткань корня.

В ризосфере наблюдается действие корневых экссудатов, содержащих различные органические вещества (углеводы, аминокислоты, органические кислоты), и корневого опада. Разнообразие микроорганизмов вблизи корня определяется множеством поступающих веществ, трофических взаимодействий микроорганизмов между собой и влиянием специфических веществ растений. Здесь обнаруживается широкий спектр органотрофных аэробных бактерий, пищевые потребности которых ориентированы на экссудаты. Как правило, эта область развития микроорганизмов

характеризуется избытком органического углерода и лимитирующим содержанием азота и фосфора. На поверхности листьев в филлосфере развиваются организмы, специфически взаимодействующие с растением, а также паразитические бактерии и грибы.

Сапротрофные микроорганизмы, ведущие процессы минерализации веществ органического опада, С. Н. Виноградский предложил называть *зимогенной* микробиотой, а микроорганизмы, разлагающие гумус почвы, — *автохтонной* микробиотой. Микроорганизмы, развивающиеся за счет минимальных концентраций органических веществ, завершающие минерализацию органического опада в почве, получили название *олиготрофной* микробиоты. Среди этой группы микроорганизмов выделяются *олигонитрофилы*, нуждающиеся в минимальной концентрации органических азотсодержащих веществ, и *олигокарбофилы*, потребляющие остаточные органические углеродсодержащие соединения. Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода CO_2 или карбонаты и получающие энергию за счет реакций окисления минеральных соединений, объединены в группу *автотрофной* микробиоты.

Значительный вклад почвенных микроорганизмов в процессы трансформации основных биогенных элементов в природе обусловлен сложной структурой микробиоценоза почвы. Процесс разложения веществ органического опада, поступающего в почву, начинается зимогенная микробиота, представленная различными сапротрофными микроорганизмами. На первых этапах минерализацию легкодоступных органических соединений ведут неспорообразующие бактерии родов *Pseudomonas*, *Proteus* и др. Дальнейший процесс глубокой минерализации органических веществ сопровождается сукцессией микроорганизмов. На смену неспорообразующим бактериям приходят различные виды бацилл (*B. subtilis*, *B. mesentericus* и др.). Частично продукты растительного и животного опада, а также микробные метаболиты превращаются в перегной, который постепенно минерализуется автохтонной микробиотой. Последняя представляет собой специфическую подгруппу сапротрофных микроорганизмов, обладающих более мощным ферментативным аппаратом, способным окислять сложные циклические соединения. К таким микроорганизмам относятся актиномицеты, коринеформные и нокардиоформные бактерии. Конечные этапы минерализации остаточных продуктов распада органических веществ и гумуса в минимальной концентрации осуществляют олиготрофные микроорганизмы. Эта группа микроорганизмов включает ряд специфических

видов сапротрофных микроорганизмов, приспособившихся к развитию на бедных субстратах. Неорганические соединения (NH_3 , H_2S , H_2 и др.), образующиеся при минерализации органических веществ, трансформируются в процессе жизнедеятельности автотрофных микроорганизмов. Последние используют минеральные соединения как источники энергии, окисляя их в реакциях энергетического метаболизма клетки. Соотношение вышеперечисленных групп микроорганизмов определяет характерную структуру микробиоценоза каждого зонального типа почвы. При составлении микробиологической характеристики почвы необходимо учитывать неравномерность распределения микроорганизмов в почвенных микролокусах, высокую динамичность численности и качественного состава почвенной микробиоты, а также недостаточную разработанность систематики и идентификации большинства видов почвенных микроорганизмов.

Помимо автохтонной микробиоты в почве обнаруживаются попавшие туда представители нормальной микробиоты человека и животных, а также патогенные микроорганизмы. Аллохтонные микроорганизмы в почве обычно долго не выживают, однако некоторые представители нормальной микробиоты человека способны включаться в состав биоценоза почвы, а отдельные виды остаются ее постоянными обитателями. На выживаемость патогенных бактерий в почве влияют состав и тип почвы, температура, влажность, атмосферные осадки, степень и характер загрязненности (органическое, химическое или микробное загрязнение). Патогенные микроорганизмы, обнаруживаемые в почве, разделяют на три группы:

- постоянно обитающие в почве (например, *Clostridium botulinum*, представители рода *Actinomyces* – возбудители подкожных микозов, некоторые возбудители микотоксикозов);

- спорообразующие, для которых почва является вторичным резервуаром (например, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, некоторые виды *Clostridium*, вызывающие анаэробные инфекции). Бактерии попадают в почву с выделениями человека и животных, а также трупами животных. При благоприятных условиях они могут размножаться, а при неблагоприятных – сохраняться в почве в виде спор длительное время;

- не образующие спор, попадающие в почву с выделениями человека и животных и сохраняющиеся сравнительно недолго – в течение нескольких недель или месяцев (например, бактерии родов *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Brucella*, *Francisella*, *Mycobacterium*, *Leptospira*, *Pseudomonas*).

Оценку санитарного состояния почв проводят с учетом комплекса показателей: подсчитывают общее количество сапротрофных микроорганизмов и определяют наличие санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП, *Clostridium perfringens* и др.). Высокая численность сапротрофной микробиоты свидетельствует об органическом загрязнении, при микробной контаминации преобладают санитарно-показательные микроорганизмы. При необходимости исследуют состав нитрифицирующих и аммонифицирующих бактерий, актиномицетов, грибов, целлюлолитических микроорганизмов.

Контрольные вопросы

1. Каковы особенности воздуха как среды обитания микроорганизмов?
2. Какими группами микроорганизмов представлена микробиота воздуха?
3. Какие методы используются для исследования микробиоты воздуха?
4. Какими группами микроорганизмов представлена автохтонная микробиота водоемов?
5. Какие факторы влияют на качественный и количественный состав водных микроорганизмов?
6. Какие микробиологические методы применяются для исследования воды?
7. Каковы особенности почвы как среды обитания микроорганизмов?
8. Назовите основные физиологические и таксономические группы микроорганизмов, обитающих в почве.
9. На какие группы разделяют патогенные микроорганизмы, обнаруживаемые в почве?
10. Какие показатели используют для оценки санитарного состояния почв?

Лабораторная работа 6

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ ВОЗДУХА, ПОЧВЫ И ВОДЫ

Цель работы: освоить методы определения качественного и количественного состава микробиоты воздуха, почвы и воды.

Материалы и оборудование: физиологический раствор, ПДА, среда Эндо, среда Эшби, среда Чапека, казеиново-глицериновый агар (КА), стерильная дистиллированная вода, стерильные пробирки, стериль-

ные чашки Петри, стерильные флаконы (объемом 500 мл), пипетки на 1–2 мл и 5–10 мл, шпатели, спиртовка, термостат, предметные стекла, реактивы для окраски по методу Грама.

Ход работы

1. Исследование микробиоты воздуха методом Коха.

1) Чашки Петри с ПДА и средой Эндо открывают в исследуемом помещении (учебная аудитория, лаборатория, коридор, буфет, лестница) и оставляют открытыми в течение 5 мин, после чего закрывают крышкой и помещают в термостат при 28–30 °С на 24 ч.

2) Описывают морфологические признаки сформировавшихся колоний.

3) Из морфологически различающихся колоний готовят препараты, окрашивают их по методу Грама, микроскопируют.

4) На основании морфологического разнообразия и количества выросших колоний делают вывод о качественном и количественном составе микробиоты воздуха.

5) Рассчитывают количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха для каждого изученного помещения по формуле

$$M = \frac{aV_2S_1}{\pi d^2V_1},$$

где M – количество КОЕ в 1 м³ воздуха; a – количество колоний, сформировавшихся на чашке; V_1 – объем воздуха (л), из которого осаждаются микроорганизмы на поверхности среды площадью S_1 (см²) ($V_1 = 10$ л, $S_1 = 10$ см²); V_2 – объем воздуха, для которого производится расчет (л); d – диаметр чашки Петри.

6) Результаты вносят в таблицу (табл. 6).

Таблица 6

Качественный и количественный состав микробиоты воздуха помещений

Помещение	Общее число бактерий, КОЕ/м ³	Количество морфотипов

2. Исследование микробиоты воды.

1) Воду из водоема (400–500 мл) отбирают в стерильные флаконы объемом 500 мл непосредственно перед высевом. Отбор проб проводят на глубине не менее 10–15 см от дна.

2) Водопроводную воду (400–500 мл) отбирают из крана, предварительно протертого ватным тампоном, смоченным спиртом, после 10–15 мин спуска воды. При проведении анализа хлорированной воды во флакон для отбора проб перед стерилизацией вносят дехлоратор – 10 мг гипосульфита натрия.

3) Из каждой пробы воды готовят последовательные десятикратные разведения в стерильной воде (до 10^{-4}).

4) По 1 мл исходной пробы воды и соответствующих разведений (10^{-1} – 10^{-4}) вносят в стерильные чашки Петри (по 2 серии чашек для каждого разведения), заливают 20 мл расплавленного и остуженного до 45–50 °С ПДА, тщательно перемешивают круговыми движениями.

5) После застывания агара одну серию чашек помещают в термостат при 37 °С на 24 ч, вторую – при 20 °С на 48 ч.

6) Подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине агара колоний и вычисляют микробное число воды. Делают вывод о качестве водопроводной воды и воды из водоема.

7) Из колоний различных морфотипов готовят фиксированные препараты, окрашивают их по Граму и микроскопируют. На основании морфологического разнообразия выросших колоний делают вывод о качественном составе микробиоты воды. Результаты вносят в таблицу (табл. 7).

Таблица 7

Качественный и количественный состав микробиоты воды

№ пробы	Место отбора	Микробное число	Количество морфотипов	Качество воды

3. Исследование микробиоты почвы.

1) Образцы почвы (200–300 г) отбирают стерильным ножом на глубине 10–15 см, помещают их в стерильную банку или пакет.

2) Из образцов почвы готовят навеску (10 г), которую переносят в стерильную ступку, добавляют 2–3 мл стерильной воды и растирают до пастообразного состояния.

3) Полученную почвенную суспензию вносят в колбу со стерильной водой (90 мл), тщательно размешивают в течение 5 мин, дают отстояться 30 мин. Это первое разведение (10^{-1}) исследуемой пробы почвы.

4) Готовят ряд десятикратных разведений (до 10^{-6}).

5) По 0,1 мл из 10^{-4} – 10^{-6} разведений высевают шпателем на поверхность питательных сред (каждое разведение на 4 чашки):

- ПДА – для определения общего количества бактерий;
- среду Чапека и КГА – для учета и выделения актиномицетов;
- среду Эшби – для учета и выделения азотобактера.

6) Засеянные чашки Петри помещают в термостат при 28 °С. Общее количество бактерий на ПДА учитывают через 1–5 суток, актиномицетов и азотобактера – 5–7 суток.

7) Из колоний с разной морфологией готовят фиксированные препараты, окрашивают их по методу Грама и микроскопируют.

Таблица 8

Качественный и количественный состав микробиоты почвы

№ пробы	Место отбора	Общее число бактерий (КОЕ/г)	Количество в 1 г почвы	
			актиномицетов	азотобактера

8) На основании морфологического разнообразия и количества выросших колоний делают вывод о качественном и количественном составе микробиоты почвы. Результаты вносят в таблицу (табл. 8).

Тема 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ РЕШЕНИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ

Благодаря неисчерпаемому метаболическому потенциалу микроорганизмы используются человеком в самых различных целях, в том числе для решения экологических проблем. *Экобиотехнология* – направление науки и прикладной биотехнологии, изучающее теоретические и практические аспекты использования живых организмов в природоохранных целях.

Одним из наиболее важных направлений экобиотехнологии является очистка окружающей среды от загрязнений природного и техногенного происхождения с помощью биологических объектов (биоремедиация). Впервые микроорганизмы стали использовать для очистки сточных вод от бытовых отходов еще в XIX в. Уже в начале XX в. начали применять систему аэробной очистки сточных вод с помощью активного ила и принудительной аэрации, что позволило существенно повысить скорость и эффективность процессов биоремедиации.

В настоящее время микроорганизмы используются для очистки сточных вод, газовой воздушных выбросов, почв и водоемов, загрязненных в результате человеческой деятельности. Для очистки сточных вод применяют аэротенки, биофильтры, анаэробное сбраживание органических отходов в метантенках и биореакторах других конструкций.

В процессах биологической очистки принимает участие сложная биологическая ассоциация, состоящая не только из бактерий, но и одноклеточных эукариотических организмов – грибов, простейших (амебы, жгутиковые и ресничные инфузории), микроскопических животных (коловратки, нематоды, водные клещи) и др. Эта сложная ассоциация в процессе биологической очистки формируется в виде активного ила или биопленки. *Активный ил* представляет собой темно-коричневые хлопья размером до сотен микрон, состоящие на 70 % из живых микроорганизмов и на 30 % из частиц неорганической природы. Микроорганизмы прикреплены к твердому носителю и вместе с ним образуют зооглей – симбиоз популяций микроорганизмов, покрытый общей слизистой оболочкой. *Биопленка* – это слизистое обрастание материала фильтрующего слоя очистных сооружений живыми микроорганизмами толщиной 1–3 мм.

Аэротенк – это открытое сооружение, через которое пропускается аэрированная сточная вода и суспензия активного ила. Аэротенки относятся к гомогенным биореакторам. Типовая конструкция аэротенка представляет собой железобетонный герметичный сосуд прямоугольного сечения, связанный с отстойником. Аэротенк разделяется продольными перегородками на несколько коридоров (3–4). Процесс биоочистки в аэротенке состоит из двух этапов:

1) взаимодействие отстоявшихся сточных вод, содержащих взвешенные частицы и органические вещества, с воздухом и частицами активного ила в аэротенке в течение некоторого времени (от 4 до 24 ч и более, в зависимости от типа стоков, требований к глубине очистки и др.). Окисление органических веществ стоков микроорганизмами активного ила осуществляется в две стадии. На первой стадии микроорганизмы адсорбируют загрязняющие вещества стоков, на второй – окисляют их и восстанавливают свою окислительную способность. В ходе очистки происходит прирост биомассы активного ила, что приводит к его «старению» и снижению биокаталитической активности. Поэтому большая часть ила выводится из системы, а часть возвращается в реактор;

2) разделение вод и частиц активного ила во вторичном отстойнике.

Биофильтр – это наиболее распространенный тип биореактора с неподвижной биопленкой, применяемый для очистки стоков и газовой воздушных выбросов. В биофильтрах сточные воды или загрязненный воз-

дух пропускают через слой крупнозернистого материала (фильтрующий слой), покрытого тонкой бактериальной пленкой, благодаря которой интенсивно протекают процессы биологического очищения. Особенностью насадки, или фильтрующего слоя, является высокая удельная поверхность для развития микроорганизмов и большая пористость. Пористость придает необходимые газодинамические свойства слою и способствует прохождению воздуха и жидкости через него. При просачивании сточных вод через материал фильтрующего слоя происходит ряд последовательных процессов:

1) контакт с биопленкой, развивающейся на поверхности частиц фильтрующего материала;

2) сорбция органических веществ поверхностью микробных клеток;

3) окисление веществ стоков в процессе микробного метаболизма.

В биофильтре происходят непрерывный прирост и отмирание биопленки. Отмершая биопленка смывается током очищаемой воды и выносится из биофильтра. Очищенная вода поступает в отстойник, в нем освобождается от частиц биопленки и далее сбрасывается в водоем.

Кроме аэробных способов очистки сточных вод существуют анаэробные, несомненным преимуществом которых является высокая степень превращения углерода загрязняющих веществ при относительно низкой степени прироста биомассы. В процессе *анаэробного сбраживания органических отходов* сточных вод получают такой ценный продукт, как биогаз. Анаэробные процессы очистки происходят в *септик-тенках, метантенках*, причем процессу сбраживания подвергаются не сами сточные воды, а осевший ил. Биодegradация загрязняющих веществ протекает в септик-тенках на основе сложной микробной ассоциации и включает гидролитические процессы с участием ацидогенных, гетероацетогенных бактерий и метаногенерацию с участием метаногенов. Часто септик-тенки используют для сбраживания ила из первичных отстойников (входящих в состав аэротенков). При этом объем ила заметно снижается, уменьшается количество патогенных микроорганизмов. Сброженный ил затем ликвидируют или закапывают.

Очистка газовоздушных выбросов может осуществляться в *биореакторах с орошаемым слоем*. Микроорганизмы-деструкторы в таких биореакторах иммобилизованы на искусственных носителях (например, полиамидных волокнах). Важное условие эффективного функционирования биореакторов такого типа – поддержание влажности на постоянном оптимальном уровне, что достигается путем равномерного орошения носителя микроорганизмов.

Для очистки загрязненных водоемов и почв используют *биопрепараты* на основе микроорганизмов-деструкторов. Микроорганизмы вносятся в почву или водоем в виде суспензии, а они также могут быть иммобилизованы на различных носителях, чаще всего природного происхождения (торф, древесные опилки, лузга). Нередко для повышения эффективности процессов очистки биопрепараты используются в комплексе с минеральными удобрениями.

Первое место среди загрязнителей почвы и водоемов занимают нефть и нефтепродукты. Их нежелательное попадание в окружающую среду происходит на этапах добычи нефти, ее транспортировки и переработки. Нефть представляет собой сложную смесь, состоящую из более 1000 органических соединений различных классов (алифатические, ароматические моно- и полициклические, алициклические углеводороды) и неорганических примесей.

Микроорганизмы, способные утилизировать нефть, распространены очень широко и могут быть выделены из любого типа почвы и воды. Однако при попадании нефти в почву или водоем в больших количествах происходит угнетение естественной микробиоты и резкое снижение ее численности, поэтому процессы самоочищения происходят крайне медленно. Восстановление микробиоты начинается с постепенного увеличения численности деструкторов нефти (углеводородокисляющих микроорганизмов). В средах с постоянным загрязнением нефтепродуктами наблюдается заметное преобладание данной группы микроорганизмов по численности.

Способность использовать нефть в качестве источника углерода и энергии присуща не единичным специализированным формам, а многим группам микроорганизмов. Однако сложно представить себе организм, который мог бы утилизировать все компоненты нефти. Для каждого микроорганизма-деструктора характерен определенный спектр утилизируемых соединений, входящих в состав нефти. Наиболее часто деструкторы нефти встречаются среди представителей родов бактерий *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, мицелиальных грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, дрожжей *Candida*, *Endomyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*.

Среди приспособлений, выработанных бактериями – деструкторами нефти, следует отметить способность к продукции поверхностно-активных веществ (ПАВ). Поскольку компоненты, входящие в состав

нефти, преимущественно гидрофобные, их проникновение в клетку затруднено. Различные группы микроорганизмов решают эту проблему разными путями: одни продуцируют ПАВ во внешнюю среду, повышая тем самым растворимость углеводородов нефти и их биодоступность (например, бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*); другие вырабатывают клеточносвязанные ПАВ, которые повышают гидрофобность клеточной поверхности (*Rhodococcus* и иные нокардиоформные бактерии).

В клетке углеводороды подвергаются ферментативному расщеплению моно- и диоксигеназами. Гены, кодирующие данные ферменты, организованы в кластеры и часто имеют плазмидную локализацию. Например, для бактерий рода *Pseudomonas* описаны такие плазмиды, как OСТ (определяет утилизацию алканов), TOL (определяет утилизацию моноароматических углеводородов), NАН (детерминирует утилизацию полиароматических углеводородов).

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию «экобиотехнология».
2. Что представляют собой активный ил и биопленки?
3. Каково устройство и принцип действия аэротенка?
4. Каково устройство и принцип действия биофильтра?
5. Каковы преимущества анаэробного сбраживания органических отходов сточных вод перед аэробными способами очистки?
6. Почему при очистке почв и водоемов от загрязнений с использованием иммобилизованных микроорганизмов применяются преимущественно природные носители?
7. Приведите примеры нефтеоксиляющих микроорганизмов.
8. Чем можно объяснить таксономическое разнообразие нефтеоксиляющих микроорганизмов?

Лабораторная работа 7 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ НЕФТИ

Цель работы: оценить микробиологическую деструкцию нефти представителями разных родов бактерий при различной температуре.

Материалы и оборудование: ПДБ, жидкая минеральная среда М9, нефть, стерильные пробирки, пипетки на 1–2 мл и 5–10 мл, дозатор на 20–200 мкл, наконечники для дозатора на 20–200 мкл, спиртовка, шейкер, термостаты на 25 и 37 °С.

Ход работы

1. Культуры микроорганизмов – деструкторов нефти различных родов (*Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и др.), выращенные в ПДБ, в количестве 0,1 мл вносят в пробирки с 4 мл жидкой минеральной среды М9 (в двух повторях). В качестве контроля используют минеральную среду М9 без бактериальной культуры.

2. В пробирки вносят нефть (1 %) в качестве единственного источника углерода.

Таблица 9

Микробная деградация нефти

Температура инкубирования, °С	Название образца	Время инкубирования, сут							
		0	1	2	3	4	5	6	7
25	Контроль								
37	Контроль								

3. Одну серию пробирок, включая контрольную, инкубируют с аэрацией при температуре 25 °С, вторую – при температуре 37 °С в течение 7–14 суток, регистрируя изменения по сравнению с контролем каждый день. Результаты наблюдений вносят в таблицу (табл. 9).

КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

1. Какой из разделов экологической микробиологии изучает влияние внешних абиотических факторов на микроорганизмы:

- а) демэкология;
- б) комэкология;
- в) аутэкология;
- г) синэкология?

2. Кто считается основоположником экологической микробиологии:

- а) А. Левенгук;
- б) Л. Пастер;
- в) С. Н. Виноградский;
- г) Д. К. Заболотный;
- д) Д. И. Ивановский;
- е) В. Л. Омелянский?

3. Метабиоз – тип взаимоотношений между микроорганизмами, при котором:

- а) два или более вида микроорганизмов создают взаимовыгодные условия для развития друг друга;
- б) выгоду извлекает только один партнер;
- в) одна группа организмов использует в пищу другую группу?

4. С помощью чего получают накопительные культуры фотоавтотрофных, хемолитотрофных и хемогетеротрофных микроорганизмов:

- а) колонки Виноградова;
- б) колонки Виноградского;
- в) батометра;
- г) камеры Горяева?

5. Как называют организмы, способные существовать в относительно узких пределах изменений экологического фактора:

- а) амфибионты;
- б) эврибионты;
- в) стенобионты;
- г) гидробионты;
- д) эвритрофы?

6. Как называют интервал значений абиотического фактора, в котором наблюдаются оптимальные показатели жизнедеятельности организма:

- а) зона лимитирования;
- б) область толерантности;
- в) зона оптимума;
- г) зона ингибирования?

7. Как называют группу микроорганизмов, способных расти при температуре от 0 до 35 °С, оптимальная температура роста которых сдвинута в сторону максимальной:

- а) психрофилы;
- б) психротрофы;
- в) мезофилы;
- г) термотолерантные микроорганизмы?

8. К какой физиологической группе по отношению к температуре относят бактерии *Escherichia coli*:

- а) психрофилы;
- б) психротрофы;
- в) мезофилы;
- г) термотолерантные микроорганизмы?

9. К какой физиологической группе по отношению к температуре относят бактерии родов *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermoplasma*:

- а) психрофилы;
- б) психротрофы;
- в) мезофилы;
- г) термофилы?

10. Чем обусловлено летальное действие высоких температур на микроорганизмы:

- а) денатурацией клеточных белков;
- б) возникновением мутаций в ДНК;
- в) изменением проницаемости клеточной мембраны;
- г) нарушением синтеза пептидогликана;
- д) повышением вязкости цитоплазмы?

11. Какой параметр ограничивает нижний предел роста микроорганизмов:

- а) температура «застывания» мембраны;
- б) температура инактивации белков;
- в) температура ингибирования биосинтеза белка;
- г) температура нарушения проницаемости клеточной стенки?

12. Как называют микроорганизмы, оптимум роста которых находится в области низких температур:

- а) мезофилы;
- б) термофилы;
- в) ксерофилы;
- г) психрофилы;
- д) ксилофилы;
- е) галофилы?

13. Какой количественный параметр используют для оценки летального действия температуры на клетки микроорганизмов:

- а) термическую точку отмирания;
- б) летальную температуру;
- в) температурную точку ингибирования роста;
- г) точку термотолерантности?

14. Каким микроорганизмам для роста необходимо повышенное гидростатическое давление:

- а) барочувствительным;
- б) баротолерантным;
- в) барофильным?

15. Какие виды электромагнитного излучения оказывают физиологический эффект на клетки микроорганизмов:

- а) ионизирующее излучение (до 10 нм);
- б) ультрафиолетовое излучение (10–350 нм);
- в) ультрафиолетовое излучение (350–400 нм);
- г) видимый свет (400–800 нм);
- д) инфракрасное излучение (800–1100 нм)?

16. Какие биополимеры имеют максимум поглощения УФ-света в области 260 нм:

- а) ДНК;
- б) муреин;
- в) липополисахариды;
- г) белки?

17. Какие типы повреждений ДНК наиболее часто вызывает УФ-излучение:

- а) образование пуриновых димеров;
- б) образование пиримидиновых димеров;
- в) образование циклобутановых мостиков между пурином и пиримидином одной цепи?

18. Какие существуют механизмы устранения повреждений ДНК, вызванных действием УФ-лучей на микробную клетку:

- а) фотореактивация;
- б) световая репарация;
- в) фотоокисление;
- г) темновая репарация;
- д) пострепликативная репарация?

19. Бактерии какой формы более чувствительны к ультразвуку:

- а) кокки;
- б) палочки;
- в) извитые формы?

20. Как называют клеточные структуры, позволяющие микроорганизмам ориентироваться в магнитном поле:

- а) мезосомы;
- б) рибосомы;
- в) магнитосомы;
- г) магнитофоры?

21. Как называется среда, концентрация солей в которой выше, чем в клетке:

- а) изотоническая;
- б) гипертоническая;
- в) гипотоническая?

22. Какой процесс происходит при помещении клетки в гипертонический раствор:

- а) плазмолиз;
- б) метастаз;
- в) цитолиз;
- г) гидролиз?

23. В каком диапазоне концентраций соли растут умеренные галофилы:

- а) 5–15 %;
- б) 10–12 %;
- в) 5–10 %;
- г) 3–5 %;
- д) 5–7 %?

24. Как называют низкомолекулярные нейтральные по отношению к метаболитам клетки органические соединения, уравнивающие внешнее осмотическое давление:

- а) ксеропротекторы;
- б) осмопротекторы;
- в) баропротекторы;
- г) криопротекторы?

25. Галоалкалифилы – физиологическая группа микроорганизмов, способная развиваться:

- а) при повышенных концентрациях NaCl;
- б) при пониженных концентрациях NaCl;
- в) при повышенных концентрациях NaHCO₃;
- г) при пониженных концентрациях NaHCO₃?

26. К какой физиологической группе по отношению к pH среды относят бактерии *Escherichia coli*:

- а) галофилы;
- б) алкалофилы;
- в) ацидофилы;
- г) нейтрофилы?

27. Как называют микроорганизмы, оптимум pH среды для которых смещен в щелочную сторону (pH 8,5–11,5):

- а) ацидофилы;
- б) нейтрофилы;
- в) алкалофилы;
- г) алкалифилы;
- д) ксерофилы?

28. Какими требованиями относительно содержания молекулярного кислорода в среде характеризуются микроаэрофилы:

- а) требуют наличия молекулярного кислорода, но в концентрации, ниже атмосферной;
- б) требуют наличия молекулярного кислорода, но в концентрации, выше атмосферной;
- в) не требуют наличия молекулярного кислорода;
- г) молекулярный кислород угнетает их рост?

29. Чем обусловлено токсическое действие молекулярного кислорода на клетки микроорганизмов:

- а) инаktivацией ферментов;
- б) нарушением синтеза белка;
- в) образованием высокореакционных форм кислорода;

- г) изменением проницаемости цитоплазматической мембраны;
- д) повреждениями ДНК?

30. Как называют микробиоту, характерную для данного местообитания:

- а) аллохтонная;
- б) автохтонная;
- в) сапротрофная;
- г) автотрофная?

31. С помощью какого прибора осуществляется забор проб воды с разных глубин:

- а) барометра;
- б) батометра;
- в) статометра;
- г) камеры Горяева?

32. Какие группы бактерий относят к санитарно-показательным:

- а) актиномицеты;
- б) бактерии группы кишечной палочки;
- в) энтерококки;
- г) стафилококки?

33. Какие из перечисленных патогенных микроорганизмов постоянно обитают в почве:

- а) *Clostridium botulinum*;
- б) *Salmonella typhi*;
- в) *Bacillus anthracis*;
- г) *Staphylococcus aureus*?

34. Какой санитарный показатель называют коли-индексом:

- а) минимальное количество воды (мл), в котором обнаруживаются БГКП;
- б) количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды;
- в) количество БГКП, содержащихся в 100 мл исследуемой воды?

35. Как называют направление прикладной биотехнологии, рассматривающее теоретические и практические аспекты использования живых организмов в природоохранных целях:

- а) эковиотехнология;
- б) агробиотехнология;
- в) агробиоценология;
- г) биоремедиация;
- д) микробиоценология?

36. Какие ферменты участвуют в расщеплении нефти в клетках бактерий-деструкторов:

- а) оксигеназы;
- б) оксидазы;
- в) гидролазы;
- г) лиазы;
- д) лигазы?

37. Какие микроорганизмы продуцируют клеточносвязанные ПАВ:

- а) бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*;
- б) бактерии родов *Rhodococcus* и *Nocardia*;
- в) бактерии родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*;
- г) бактерии родов *Bacillus* и *Arthrobacter*?

38. Как называют открытое очистное сооружение, через которое пропускаются аэрированная сточная вода и суспензия активного ила:

- а) биофильтр;
- б) аэротенк;
- в) септиктенк;
- г) метантенк;
- д) биореактор с орошаемым слоем?

39. Какие типы установок обеспечивают анаэробное сбраживание органических отходов:

- а) аэротенки;
- б) биофильтры;
- в) септиктенки;
- г) метантенки?

40. Утилизацию какого класса углеводов обеспечивают гены, расположенные на НАН-плазмидах бактерий рода *Pseudomonas*:

- а) алифатических;
- б) гетероциклических;
- в) моноциклических ароматических;
- г) полициклических ароматических?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Волова, Т. Г.* Биотехнология / Т. Г. Волова. — Новосибирск, 1999.
- Заварзин, Г. А.* Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. — М., 2001.
- Лысак, В. В.* Микробиология / В. В. Лысак. — Минск, 2008.
- Лысак, В. В.* Микробиология : метод. рекомендации к лаб. занятиям, контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. — Минск, 2002.
- Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхарда [и др.]. — М., 1983.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. — М., 1991.
- Нетрусов, А. И.* Микробиология. Университетский курс / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М., 2012.
- Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. — М., 2005.
- Экология микроорганизмов / под ред. А. И. Нетрусова. — М., 2013.
- Юхневич, Г. Г.* Микроорганизмы в биоиндикации и биотестировании : лаб. практикум / Г. Г. Юхневич, И. М. Колесник. — Гродно, 2012.
- Leboffe, M. J.* Microbiology : laboratory theory and application / M. J. Leboffe, В. E. Pierce. — Colorado, 2010.

ПРОГРАММА КУРСА «ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

Введение

Основные законы экологии микроорганизмов. Биосферное значение микроорганизмов. Предмет экологии микроорганизмов. Общее и различное в дисциплинах «Общая экология» и «Экология микроорганизмов». Предмет экологической микробиологии. Разделы экологической микробиологии (аутэкология, синэкология, комэкология). Законы Виноградского – Бейеринка, Вольтерры – Гаузе. Энергетическая, концентрационная, деструктивная, транспортная и средообразующая роль бактерий в биосфере. Значение работ Г. А. Надсона, В. Л. Омелянского, В. С. Буткевича, Б. Л. Исаченко и других авторов для развития экологической микробиологии. Развитие экологической микробиологии в Республике Беларусь.

Влияние физических факторов среды обитания на жизнедеятельность микроорганизмов

Влияние магнитных полей на микроорганизмы. Магнетотаксис. Влияние температур, температурные оптимумы и пределы толерантности бактерий. Понятие о психрофилах, мезофилах и термофилах. Молекулярные особенности, определяющие границы температурной толерантности бактерий. Влияние излучений. Фототаксис, фотохромность и фотосинтез у микроорганизмов. Механизмы повреждающего действия УФ-лучей и ионизирующего излучения. Радиорезистентность микроорганизмов и ее молекулярные механизмы.

Влияние химических факторов среды обитания на жизнедеятельность микроорганизмов

Понятие о водной активности и водном потенциале. Негалофильные и галофильные микроорганизмы. Молекулярные механизмы осмо- толерантности. Кислород как акцептор электрона. Активные формы кислорода и этапы их восстановления в микробной клетке. Отношение микроорганизмов к рН. Ацидофилы, нейтрофилы и алкалофилы. Влияние рН среды на формирование трансмембранного электрохимического потенциала в бактериальной клетке.

Взаимодействие бактерий с бактериями, простейшими и беспозвоночными животными

Типы взаимодействий между биологическими объектами. Комменсализм, мутуализм, паразитизм, конкуренция и аллелопатия (антибиоз). Факультативные и облигатные симбиозы. Понятие о консорциуме. Взаимодействие бактерий с простейшими. Тройственные симбиозы. Внутриядерный паразитизм бактерий в простейших. Взаимодействие бактерий с насекомыми и его контроль со стороны хозяина. Микробные симбионты глубоководных погонофор. Светящиеся бактерии – симбионты энтомопатогенных нематод.

Взаимодействие бактерий с растениями

Микробиота филлосферы и ризосферы растений. Симбиоз бобовых с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями. Этапы формирования симбиоза (аттракция, адгезия, интернализация). Понятие о лектинах. Фитопатогены. Особенности паразитизма агробактерий. Понятие о генетической колонизации.

Взаимодействие бактерий с организмами позвоночных и человека

Понятие об автохтонной и аллохтонной микробиоте тела позвоночных. Микробиоценозы рубца жвачных животных. Органы свечения глубоководных рыб. Микробная экология тела человека. Нормальная микробиота кожи, репродуктивного тракта, органов системы пищеварения. Микробиота ротовой полости. Микробиота толстого кишечника. Понятие о дисбактериозе. Болезнетворные микроорганизмы и факторы их патогенности.

Демэкология. Микробиоценозы воздуха и почв

Основные понятия демэкологии. Ареалы бактерий. Бактерии как космополиты и их связь с определенными экосистемами. Типичная структура микробиоценоза. Понятие о сукцессии. Аэромикрофлора и источники ее формирования. Факторы, оказывающие влияние на количественный и качественный состав аэропланктона. Микробиологический контроль качества воздушной среды. Микробиота почв. Структура почвенных микробных сообществ. Представления о г- и К-стратегиях микроорганизмов. Роль микроорганизмов в формировании плодородия почв.

Микробиоценозы морей и пресных водоемов

Гидромикробиота и ее особенности. Микробиота стратифицированных пресных водоемов. Движение веществ и энергии в микробиоценозе пресного водоема. Олиготрофные и эвтрофные водоемы и факторы, их определяющие. Понятие о сапробности. Методы санитарно-микробиологического контроля качества вод.

Использование микроорганизмов при решении экологических проблем

Биоремедиация. Искусственные микробиоценозы очистных сооружений. Микроорганизмы как биодеструкторы. Использование микроорганизмов при очистке окружающей среды от техногенных загрязнений. Микробиологическая очистка сточных вод. Микробиоценоз активного ила. Перспективы генной инженерии в решении экологических проблем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

Гусев, М. В. Микробиология : учеб. для студентов биол. специальностей вузов. – 4-е изд. / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М., 2003.

Заварзин, Г. А. Введение в природоведческую микробиологию : учеб. пособие / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. – М., 2001.

Современная микробиология : в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М., 2005. – 2 т.

Экология микроорганизмов / под ред. А. И. Нетрусова. – М., 2004.

Дополнительный

Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов. – М., 2002.

Вятчина, О. Ф. Малый практикум по микробиологии : учеб.-метод. пособие / О. Ф. Вятчина, Н. Е. Буковская, О. А. Жилкина. – Иркутск, 2009.

Громов, Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Л., 1989.

Емцев, В. Т. Микробиология : учеб. для вузов / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – 5-е изд., перераб. и доп. – М., 2005.

Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях / под ред. Д. Кашнера. – М., 1981.

Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. – М., 2005.

Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шегель. – М., 1987.

СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

Пептонно-дрожжевой бульон (ПДБ)

Пептон ферментативный	10,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
NaCl	8,0 г
Вода дистиллированная	до 1 л
pH	7,0–7,2
Стерилизовать автоклавированием при 1,0–1,5 атм.	

Пептонно-дрожжевой агар (ПДА)

Пептон ферментативный	10,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
NaCl	8,0 г
Агар микробиологический	15,0 г
Вода дистиллированная	до 1 л
pH	7,0–7,2
Стерилизовать автоклавированием при 1,0–1,5 атм.	

Среда Эшби

Маннит	20,0 г
K ₂ HPO ₄	0,2 г
MgSO ₄	0,2 г
NaCl	0,2 г
K ₂ SO ₄	0,1 г
CaCO ₃	5,0 г
Агар микробиологический	20,0 г
Вода дистиллированная	до 1 л
pH	7,1–7,3
Стерилизовать автоклавированием при 1,0 атм.	

Казеиново-глицериновый агар (КГА)

Гидролизат казеина	0,3 г
Дрожжевой экстракт	0,3 г
Глицерин	10,0 мл
KNO ₃	2,0 г
K ₂ HPO ₄	2,0 г
MgSO ₄ · 2 H ₂ O	0,05 г
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 г
CaCO ₃	0,02 г

NaCl	2,0 г
Агар микробиологический	20,0 г
Вода дистиллированная	до 1 л
pH	7,0–7,2
Стерилизовать автоклавированием при 1,0–1,5 атм.	

Среда Чапека

Крахмал растворимый	30,0 г
NaNO ₃	3,0 г
KH ₂ PO ₄	1,0 г
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 г
KCl	0,5 г
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 г
Агар микробиологический	15,0 г
Вода дистиллированная	до 1 л
pH	7,0–7,3
Стерилизовать автоклавированием при 1,5 атм.	

Среда Эндо

Пептон	10,0 г
Лактоза	10,0 г
K ₂ HPO ₄	3,5 г
Na ₂ SO ₃	2,5 г
Фуксин основной	0,5 г
Агар микробиологический	15,0 г
Вода дистиллированная	до 1 л
pH	7,3–7,5
Стерилизовать автоклавированием при 1,0 атм.	

Жидкая минеральная среда М9

Солевой концентрат М9	25,0 мл
Дистиллированная вода	73,0 мл
0,1 М MgSO ₄	1,0 мл
0,1 М CaCl ₂	1,0 мл
pH	7,0–7,2

Солевой концентрат М9

Na ₂ HPO ₄	24,0 г
KH ₂ PO ₄	12,0 г
NaCl	2,0 г
NH ₄ Cl	4,0 г
Вода дистиллированная	до 1 л
pH	7,0–7,2
Стерилизовать автоклавированием при 1,0–1,5 атм.	

0,1 М MgSO₄

MgSO₄ (MgSO₄ · 7 H₂O) 1,20 г (2,46 г)

Вода дистиллированная до 1 л

Стерилизовать кипячением или автоклавированием при 0,5 атм.

0,1 М CaCl₂

CaCl₂ (CaCl₂ · 2 H₂O) 1,11 г (1,47 г)

Вода дистиллированная до 1 л

Стерилизовать кипячением или автоклавированием при 0,5 атм.

Физиологический раствор

NaCl 8,5 г

Вода дистиллированная до 1 л

pH 7,2–7,5

Стерилизовать автоклавированием при 1,5 атм.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Тема 1. КОЛОНКА ВИНОГРАДСКОГО	7
<i>Лабораторная работа 1.</i> Получение накопительной культуры фотоавтотрофных и хемолитотрофных микроорганизмов	9
Тема 2. АУТЭКОЛОГИЯ. ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ	10
<i>Лабораторная работа 2.</i> Влияние температуры на рост и метаболизм микроорганизмов.....	18
<i>Лабораторная работа 3.</i> Действие теплового стресса на микроорганизмы	21
<i>Лабораторная работа 4.</i> Действие ультрафиолетового излучения на микроорганизмы	22
Тема 3. АУТЭКОЛОГИЯ. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ	24
<i>Лабораторная работа 5.</i> Влияние осмотического давления и кислотности среды на рост микроорганизмов	30
Тема 4. МИКРОБИОЦЕНОЗЫ ВОЗДУХА, ВОДОЕМОВ И ПОЧВ	32
<i>Лабораторная работа 6.</i> Исследование микробиоты воздуха, почвы и воды	40
Тема 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ РЕШЕНИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ	43
<i>Лабораторная работа 7.</i> Микробиологическая деструкция нефти.....	47
КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ	49
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	56
Приложение 1. ПРОГРАММА КУРСА «ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»	57
Приложение 2. СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ	60

Учебное издание

Чернявская Мария Ивановна
Сидоренко Анастасия Вячеславовна
Голенченко Сергей Георгиевич и др.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Редактор *Т. А. Беланко*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Т. К. Раманович*
Компьютерная верстка *В. Н. Васиной*
Корректоры *Е. В. Демидова, О. С. Гладкова*

Подписано в печать 26.02.2016. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Ризография. Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,5.
Тираж 100 экз. Заказ 100.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.