

**Г.А.Заварзин  
Н.Н.Колотилова**

**Введение  
в природоведческую**

**М  
И  
К  
Р  
БИОЛОГИЮ**

УДК 502(07)  
ББК 74.262.0я7  
3-13

Книга издана при поддержке книоторговой фирмы  
ООО «Абрис Д»

РЕКОМЕНДОВАНО Отделением биологии  
УМО университетов России  
в качестве учебного пособия для студентов вузов

**Рецензенты:**

кафедра биологии почв факультета почвоведения  
МГУ им. М. В. Ломоносова  
(зав. каф. проф. Д. Г. Звягинцев),  
д. б. н., профессор кафедры общей экологии  
биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова  
А. М. Гиларов

Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н.  
3-13 Введение в природоведческую микробиологию: Учебное  
пособие. — М.: Книжный дом «Университет», 2001. —  
256 с., ил.

ISBN 5-8013-0124-0

Главный акцент в книге сделан на центральное понятие экологии микроорганизмов — микробное сообщество, его структуру и закономерности функционирования. Конспективно изложенные традиционные вопросы общей микробиологии — организация прокариотной клетки, физиология и метаболизм микроорганизмов, биоразнообразие и характеристика отдельных групп рассматриваются прежде всего с позиций экологии и служат вспомогательным материалом прежде всего для широкого круга естествоиспытателей. Книга является преддверием к основному курсу глобальной экологии микроорганизмов и адресована студентам, аспирантам, специалистам в различных областях естественных наук: биологам, геологам, геохимикам, палеонтологам, почвоведом, географам, экологам.

УДК 502(07)  
ББК 74.262.0я7

ISBN 5-8013-0124-0

© Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н., 2001

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Предисловие .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ. ПРЕДМЕТ ПРИРОДОВЕДЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ</b>	
1. Основные понятия .....	6
2. Область природоведческой микробиологии .....	11
3. Экосистема .....	13
4. Географическая среда .....	15
5. Система биогеохимических циклов .....	19
<b>ЧАСТЬ 1. КЛЕТКА</b>	
1. Прокариотная клетка как система .....	24
2. Энергетические механизмы .....	27
2.1. Термодинамика хемотрофных микроорганизмов (некоторые термодинамические соображения) .....	27
2.2. Механизмы получения энергии .....	31
2.3. Использование энергии при росте бактерий .....	36
3. Транспорт .....	37
4. Цитоплазма и пути метаболизма .....	41
5. Рибосомы и синтез белка .....	52
5.1. Экспрессия гена .....	52
5.2. Рибосомы и трансляция (синтез белка) .....	54
6. Репликация ДНК .....	58
6.1. Геном .....	58
6.2. Обмен генетической информацией и генетика бактерий .....	62
7. Адаптация .....	65
7.1. Адаптация клетки .....	65
7.2. Индукция энзиматической активности .....	68
7.3. Дифференциация .....	69
7.3.1. Образование эндоспор .....	69
7.3.2. Некультивируемое состояние .....	71
7.3.3. Прикрепленное состояние (био пленки) .....	72
8. Рост и размножение бактерий .....	73
8.1. Клеточный цикл .....	74
8.2. Размножение популяции .....	74
8.3. Рост и концентрация субстрата .....	78
9. Культивирование .....	83
9.1. Химический состав сред .....	83
9.2. Классификация сред .....	87
<b>ЧАСТЬ 2. БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ</b>	
1. Классификация .....	90
1.1. Биологическая систематика .....	91
2. Физиологические группы микроорганизмов .....	102
2.1. Типы питания .....	103

2.2. Экофизиологические группы	105
2.2.1. Температура	106
2.2.2. Кислотность и щелочность	109
2.2.3. Окислительно-восстановительные условия и отношение к кислороду	110
2.2.4. Соленость	114
2.2.5. Приспособление к неблагоприятным воздействиям	117
2.3. Физиологические группы организмов по местообитанию	120
2.4. Группирование организмов по используемым субстратам	120
2.4.1. Концентрация субстрата	120
2.4.2. Газы	121
2.4.3. Твердая фаза	122
2.5. Функциональное разнообразие микроорганизмов	124
3. Филогенетическая систематика	126
4. Основные группы зубактерий (по руководству Берджи, 9-е издание)	135
5. Архебактерии	165
6. Эукариоты	173
6.1. Протисты и их биоразнообразие	176
6.2. Фаготрофия	184
6.3. Симбиозы у протист	187
<b>ЧАСТЬ 3. СООБЩЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ</b>	
1. Микробное сообщество как целостность	192
2. Кооперативные взаимоотношения	193
2.1. Первичная продукция	196
2.2. Деструкция	199
2.3. Взаимодействие гидролитиков и диссипотрофов	202
2.4. Первичные и вторичные анаэробы	205
2.5. Межвидовой перенос водорода и синтрофия	210
2.6. Ацетатный путь и ацетогенез	215
2.7. Физическая кооперация в сообществе	217
3. Конкуренция в сообществе	226
3.1. Конкуренция за экологическую нишу и кинетика роста	227
3.2. Жизненные стратегии	230
3.3. Конкуренция между группами в сообществе	232
4. Общая схема трофических отношений в сообществе	235
4.1. Метаногенное сообщество	235
4.2. Сульфидогенное сообщество	238
4.3. Аноксигенное фототрофное сообщество	240
4.4. Бактериальный окислительный фильтр и газотрофы	242
4.5. Аэробное сообщество	244
4.6. Универсальность трофических отношений в сообществе	248
4.7. Сообщество и филогения	249
Литература	254
Список сокращений	255

## ПРЕДИСЛОВИЕ

«Введение в природоведческую микробиологию» представляет изложение части курса, который в течение четырех лет читался на кафедре микробиологии МГУ студентам старших курсов. В лекциях основное внимание уделялось роли микроорганизмов в глобальных геохимических процессах и предполагалось, что слушатели владеют основами микробиологии на базе вводных курсов. Однако оказалось, что лекции посещают не только микробиологи, но и геохимики, палеонтологи, географы, представители других специальностей. Для того чтобы понимать микробиологическую литературу и ориентироваться в проблемах микробиологии, необходимо владеть ее языком, т. е. знать названия и характеристики полутора сотен наиболее часто встречающихся родов микроорганизмов. Далее необходимо понимать, что может и, главное, чего не может бактерия в силу своего устройства. Именно эти вопросы обсуждаются в первой и второй частях книги, посвященных бактериальной клетке и биоразнообразию микроорганизмов. Они представляют собой конспект для не-микробиологов, и читателю, имеющему микробиологическую подготовку, достаточно лишь просмотреть их для мобилизации своих знаний под углом зрения роли организма как части природной системы. Для экономии места разделы, подробно изложенные в других доступных книгах, здесь не приводятся.

В третьей части излагаются общие закономерности взаимодействий в микробном сообществе как действующей в природе единице. Этот раздел в большинстве руководств опускается, и изложение основывается на аутоэкологии характерных для местообитаний видов. На самом деле сообщество представляет системное единство из взаимодействующих функционально разнородных организмов. Наиболее важными являются трофические отношения. Раздел, посвященный сообществу, безусловно нужен и микробиологам, и естествоиспытателям. Вопросы той «экологии», под которой сейчас понимается антропогенное воздействие на природу, упоминаются лишь бегло. Поэтому и название курса было выбрано таким, чтобы оно не вводило в заблуждение — «Природоведческая микробиология».

Авторы выражают глубокую признательность А. М. Гилярову, Д. Г. Звягинцеву, П. А. Кожевину, В. Д. Самуилову за чтение и обсуждение рукописи.

# ВВЕДЕНИЕ. ПРЕДМЕТ ПРИРОДОВЕДЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

## 1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Смысл жизни — самовоспроизведение. Организм, неспособный к самовоспроизведению, удаляется естественным отбором. Для бактерий понятие, противоположное жизни — естественная смерть в окончании жизненного цикла — имеет ограниченное значение, поскольку цикла нет, и слово «смерть» стараются не употреблять, заменяя словами «гибель» или «отмирание популяции». Самовоспроизведение означает воспроизведение всего организма как системы, а не только какой-либо одной его части.

Жизнь есть способ существования организмов. Вне организма жизнь не существует. Организм представляет собой дискретную самовоспроизводящуюся систему. Минимальный состав этой системы определяется взаимодействием ее компонентов. Части системы воспроизводятся только в организме при взаимодействии с другими ее частями. Прокариоты (или бактерии, по тривиальному словоупотреблению) представляют собой самые простые (минимальные) организмы. Все остальные организмы можно представить как результаты усложнения минимальной комбинации компонентов и взаимодействий, проявляющихся в прокариотах.

Отсюда следует, что не может быть «живого вещества» ни в понимании геохимиков (лучше заменять словом «биота»), ни в понимании вирусологов, рассматривающих вирусы как воспроизводящиеся в организме информационные макромолекулы, которые сами по себе организмами не являются. Уничтожение чужеродной информации является условием сохранения самостоятельности организма как и любой другой системы. Не обладающая способностью отторжения чужеродного — «гетерофобией» — система

разрушается и перестает быть самостоятельной системой. Принцип гетерофобии прослеживается на всех уровнях организации от кристаллизации минерала до сообщества. Гетерофобия определяет индивидуальность объекта. Смесь не представляет системы.

Системный анализ микробиологических объектов отличен от молекулярной биологии, сводящей рассмотрение системы организма к анализу ее компонентов (редукционизм), по простой причине: связи — это действия (взаимодействия), в то время как нуклеиновые кислоты — это информация, упорядоченное множество. Самовоспроизведение описывается как идея (ДНК), транскрибированная в слова (РНК), транслированная в действия (белки-ферменты), что не совсем точно, поскольку действия на самом деле — это процессы, катализируемые ферментами.

Системный анализ предполагает иерархическое построение, в котором элементы взаимодействуют друг с другом с образованием системы (подсистемы), которая в свою очередь взаимодействует с другими системами в составе большей системы. В результате необходимо знать не только особенности элементов (подсистем), входящих в рассматриваемую систему, но и систему высшего ранга, частью которой является наша система. Такие триады располагаются перекрывающимся образом. Сколь угодно глубокое знание одного элемента не означает понимания системы. Элемент рассматривается как «черный ящик» с некоторыми важными для взаимодействия в системе функциями. Разумеется, для понимания функционирования элемента важно общее понимание механизмов, определяющих его функции. Механизмы могут быть универсальные, свойственные любой бактериальной клетке, и специфические, обуславливающие разнообразие.

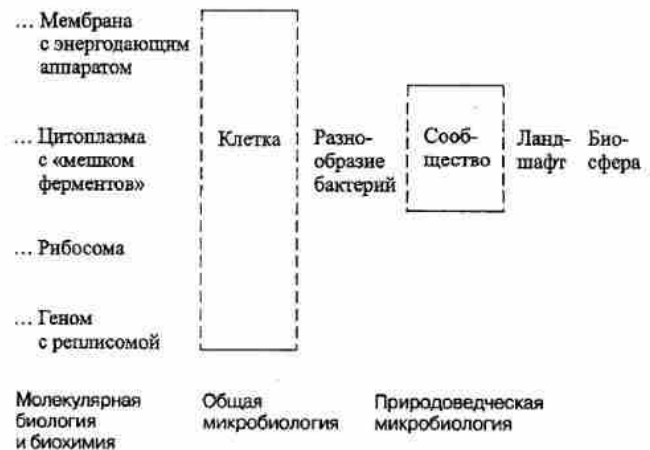
Для природоведческой микробиологии элементом является микроорганизм с определенными функциями. Множество одинаковых организмов представляет вид или род в зависимости от требуемой степени детализации. Множество видов или родов разных микроорганизмов представляет операционные единицы для анализа их взаимодействия в сообществе и сообщества с местом обитания — биотопом. В свою очередь, сообщество и биотоп объединяются в абстрактное понятие экосистемы, реализуемой в конкретном ландшафте. Экосистема описывается через

баланс массы веществ и баланс энергии. Обычно при описании экосистемы абстрагируются от физической структуры и транспортных процессов. Для ландшафта же эти характеристики представляются первоочередными.

Общая микробиология представляет базовую дисциплину для естествоиспытателей по простой причине: прокариоты были первыми обитателями Земли и сформировали ту биосферную систему, в которой появились и могли существовать все остальные организмы. Эволюционный процесс основывается на том, что новый организм сначала согласуется с тем, что уже существует, и лишь потом изменяет систему отношений. Поэтому все существующее в биосфере согласовано с миром микробов, точнее с созданной ими биосферной системой. Эта система была единственной от начала развития жизни на Земле вплоть до перехода примерно 1 млрд лет назад, когда в мире микробов произошла «неопротерозойская революция» и стали распространяться эукариоты. Их появление рассматривается как результат эндосимбиоза прокариот с предшественником эукариот, обладавшим способностью к включению внутрь клетки твердых частиц, в том числе и бактерий. Эукариоты представляют комбинацию прокариот, т. е. систему разнородных компонентов, преобразовавшуюся в единство, в новый организм. Одноклеточные и колониальные эукариоты обозначаются сборным названием протисты и служат объектом протистологии. По сравнению с бактериями протисты гораздо менее разнообразны по своим функциям, но у них, в дополнение к питанию растворенными веществами (осмотрофии) и фототрофному обмену, получила развитие способность захватывать твердые частицы через поверхность клетки (фагоцитоз), а у животных — зоотрофия. По способу питания эукариоты разделились на осмотрофные грибы, фототрофные водоросли и растения и зоотрофные животные. Способность к фагоцитозу принципиально несовместима со строением прокариотной клетки, не имеющей внутри ограниченных мембраной частей (компарментов).

Возникновение эукариот в результате объединения прокариотных предшественников представляет вторую причину, по которой общая микробиология оказывается базовой: ее объектом слу-

жит бактериальная клетка как элементарная единица жизни. Поэтому общая микробиология разделяется на две большие части: 1) изучение строения и функционирования прокариотной клетки как универсальной основы жизни; 2) изучение разнообразия прокариот и их функций в природе. Сама бактериальная клетка представляет интегрированную систему разнородных, но взаимосвязанных частей. Поэтому если расположить области, с которыми приходится иметь дело общему микробиологу, то они распределяются следующим образом:



Каждая из этих областей является предметом отдельной дисциплины, и специалист в одной из них имеет лишь весьма общее представление о смежных дисциплинах, причем лишь о тех функциональных аспектах, с которыми взаимодействует объект его исследования. Специально следует оговорить, что общих микробиологов не следует спрашивать о медицинских аспектах: они обычно плохо знают патогенные организмы, с которыми не имеют права работать, и имеют довольно общие представления об организме человека.

Существующие в общей микробиологии взгляды выработаны на основе догмы о «чистой культуре» — потомстве единственной клетки. Оно получило в бактериологии название *штамм*, эквивалент *клона* для эукариот. Штамм представляет исключительно лабораторное понятие для организмов *ex situ* — вне местообитания. Штамм считается типовым для вида, но может представлять и отдельные линии внутри вида; такое дробное деление особенно важно для генетики бактерий, занимающейся почти исключительно внутривидовой наследственной изменчивостью и в этом отношении смыкающейся с молекулярной генетикой и вирусологией. Для природных условий употребляется термин популяция, конкретное содержание которого приходится извлекать из текста.

Разнообразие бактерий основывается прежде всего на катализируемых ими химических реакциях, служащих источником энергии. Они обуславливают тесное взаимодействие микробов с окружающей средой и между собой. Поэтому понимание Природы микробиологами заметно отличается от взглядов, выработанных ботаниками и тем более зоологами.

Под экологией микроорганизмов обычно понимается «аутэкология», подразумевающая взаимодействие со средой обитания одного вида, включающее его физиологические характеристики (т. е. набор используемых веществ и образуемых продуктов, области физических и химических факторов среды), жизненную стратегию, адаптационные приспособления к меняющимся условиям среды, характерные места обитания и поведение в них. Как правило, эти аутэкологические характеристики входят в описание вида как *минимальный набор признаков*, регламентируемый для каждой группы. Термин «синэкология» в микробиологии обычно не употребляется и заменяется «биогеохимией», относящейся к экосистеме, а не сообществу.

В природоведческой микробиологии основным операционным понятием служит *сообщество*, состоящее из нескольких, иногда многих, взаимодействующих разнородных видов. Сообщество служит объектом системного подхода и требует, с одной стороны, знания ключевых взаимодействующих видов, а с другой — условий, в которых сообщество действует и на которые оно влияет. Так же как компоненты клетки внутри нее, разные

виды организмов взаимодействуют в сообществе, образуя сложную систему связей, в том числе регуляторных положительных и обратных связей. Метаболизм сообщества, так же как и метаболизм клетки, представляет собой сеть взаимосвязанных реакций, но в роли ферментов в сообществе выступают виды организмов со специфическими функциями. Чтобы разобраться в деятельности сообщества, необходимо иметь общее представление об адаптационных возможностях отдельного вида и о функциональном разнообразии бактерий.

## 2. ОБЛАСТЬ ПРИРОДОВЕДЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Основными предметами обсуждения в природоведческой микробиологии являются: 1) микробные сообщества; 2) биогеохимические циклы; 3) историческая микробиология. Все эти три предмета тесно связаны между собой системным подходом. Основу природоведческой микробиологии составляет, но не исчерпывает экология микроорганизмов. Природоведческая микробиология включает также анализ среды, в которой действуют микробы, и ее изменения под непосредственным и опосредованным действием микроорганизмов.

Экология микроорганизмов представляет собой синтетическую дисциплину, предполагающую знакомство с основами физиологии микроорганизмов, кинетики их роста, условиями обитания, деятельностью их в природе. Она отличается от экологии животных или растений: 1) специфичностью и разнообразием химической деятельности микроорганизмов при исключительно осмотрофном питании бактерий; 2) непосредственным взаимодействием микроорганизмов с геосферой; 3) первичностью в истории Земли.

Основные положения микробной экологии были сформулированы более 100 лет тому назад в декабре 1896 г. С. Н. Виноградским на лекции в Императорском Институте Экспериментальной Медицины:

1. «... *Функции микробов в природе специализированы; для каждой работы есть свой специалист, приспособивший к ней весь химизм своего существования.*»

2. «...Микробы всегда оказываются там, где они нужны», обеспечивая «...самопроизвольность и неизбежность того или другого процесса в любой точке земного шара». Впоследствии этот тезис вошел в литературу как «постулат Бейеринка».

3. «...Вся живая материя возмат перед нами как одно целое, как один огромный организм, заимствующий свои элементы из резервуара неорганической природы, целесообразно управляющий всеми процессами своего прогрессивного и регрессивного метаморфоза, и наконец отдающий снова все заимствованное назад мертвой природе».

Слова *один огромный организм* требуют пояснения для современного читателя. В биологической литературе того времени не употреблялось слово «система», так как оно было тесно связано с систематикой — классификацией и таксономией живых организмов, доминирующим подходом в ботанике и зоологии. Здесь организм употребляется в современном значении как «система». Однако, это слово несет и дополнительный смысл: начиная с середины 1970-х гг. развилось представление о *геофизиологии* с тезисом — «Земля — живой организм» и концепцией «Геи», предложенной англичанином Д. Ловелокем (J. Lovelock). В этом смысле совершенно неслучайно и слово *целесообразность*, указывающее на взаимную согласованность процессов, обеспечивающих устойчивость, т. е. длительное существование всех компонентов системы. Целесообразность явно противоречит господствовавшему в конце XIX века примитивному дарвинизму, основывавшемуся на случайности и хаотичности явлений природы, которые упорядочивает лишь «творческая роль» отбора. Итак, уже 100 лет назад при самом своем зарождении экология микроорганизмов затронула основополагающие вопросы мировоззрения в естествознании.

Следует обратить особое внимание на приведенные выше формулировки, так как в научном исследовании наиболее важные положения, необходимые для формирования концепции — обобщенного образа реальности, воспринимаемого как сама реальность — содержатся в первом исследовании, при первой постановке проблемы. Концепция часто создается на совершенно недостаточном, с точки зрения современных критиков и последую-

ющих разработчиков, материале. Тем не менее она представляет независимое суждение и свободна от деталей.

В дальнейшем изложении важно проследить за употреблением двух слов: «множество» и «система». Под множеством понимается некий набор объектов, например микроорганизмов, способных к образованию сероводорода; это множество может быть упорядочено различными способами: по восстановлению сульфатов или серы, по температуре роста, по последовательности нуклеотидов в 16S рДНК-гене, по местообитаниям. Упорядоченное множество классифицируется, приложение названий к классам составляет содержание *номенклатуры*, а следование определенным правилам биологической систематики — *таксономии*. Правила суммированы в «Кодексе номенклатуры бактерий» и их следует знать как юридический кодекс. При всех этих операциях множество остается множеством отдельных объектов.

Под системой понимается множество объектов со связями между ними. Система как единое целое возникает в том случае, если связи между ее компонентами функциональны. Именно связи превращают множество в систему. При разрыве связей компонент перестает входить в систему. Система представляет некое единство и действует как целое, обладающее совокупными характеристиками. Нагляднее всего изобразить систему в виде графа: множества объектов («узлов»), соединенных связями («ребрами»). Граф может быть ориентированным (тогда ребра изображаются стрелками, указывающими направление движения или подчинения) или неориентированным.

### 3. ЭКОСИСТЕМА

Сообщество действует в природной системе, а не в инертной окружающей среде. Биотическая составляющая системы представлена сообществом, компоненты которого связаны друг с другом. Химическая составляющая системы представлена суммой разнообразных веществ, реагирующих между собой. Простейший подход к анализу химической составляющей — балансировый, при котором рассматриваются резервуары (пулы) и потоки между

ними. Поступающие вещества представляют «источники» [sources], а выходящие — «стоки» [sinks]. Физическая составляющая представлена пространственным распределением компонентов физическим переносом их — транспортом, включая перенос энергии в виде света или тепла. Все вместе называется *экосистемой*. Экосистема представляет некую абстракцию, подчеркивающую единство и взаимозависимость всех биотических и абиотических составляющих. Экосистема реализуется в географической среде. Локальное географическое место, в котором развивается сообщество, называется *биоотомом*. Совокупность живых существ, населяющих биоотом, называется *биоценозом*, термином который широко используется экологами высших организмов, и почти не употребляется микробиологами.

В экологии рассматриваются так называемые *фундаментальные экониши*, определяемые через сумму характеристик в многомерном пространстве свойств. Фундаментальные ниши могут быть сгруппированы для экосистем по взаимодействию между собой. В микробиологии фундаментальной нише соответствует *физиологическая группа* — множество организмов, обладающих одинаковыми функциональными характеристиками, например способностью окислять восстановленные соединения азота — нитриты и нитраты, как нитрификаторы, или ассимилировать азот, как азотфиксаторы. Сильной стороной, определившей успех общей микробиологии в естествознании, стала возможность выявления представителей физиологических групп с помощью электронной методики.

Связи между нишами, прежде всего, относятся к 1) *трофическим*, по используемым субстратам питания и 2) *топическим* по характеру местообитания. Наиболее важными в рассматриваемых экологических системах являются трофические связи. Эти связи изображают *графом*, в котором узлы представляют специфические группы организмов, трансформирующие входящие в них вещества, а ребра — потоки веществ. Они образуют в микробной системе транспортную сеть, в которой потоки веществ через разные сечения равны (теорема Форда-Фалькерсона). В результате микробная система оказывается формально крайне сходной с экономической или производственной. Граф потоков ве-

ществ в микробном сообществе представляет метаболические пути, связанные с преобразованием веществ специфическими функциональными группами организмов и определяемые термодинамикой экосистемы в целом.

Экосистема претерпевает закономерное развитие во времени, называемое *сукцессией*. Сукцессию вызывают накопление продуктов биоты (мортмассы и продуктов ее разложения) и истощение резервуаров. В сукцессии происходит смена форм от слабозависящих друг от друга эфемеров до членов климактерического, или зрелого, сообщества, где все компоненты взаимосвязаны и строго уравновешены. Каждому этапу развития сукцессии соответствует сообщество организмов со своей жизненной стратегией. Представление о сукцессии растительных форм особенно подробно разработано в геоботанике. Предполагается, что сукцессия обратима, хотя в природе нет ничего обратимого.

#### 4. ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ СРЕДА

Реализация экосистемы в географической среде происходит в *ландшафте*, географическом понятии, описывающем поверхность Земли. Именно с ландшафтом приходится иметь дело в практической работе эколога. Ландшафт характеризуется единством растительности и почвы. В пределах одного ландшафта можно найти разные экосистемы, например, в озерно-сопочном ландшафте каждая лужа представляет свою экосистему, а каждый овраг — свою сукцессию экосистем. Один ландшафт отделяется от другого *экотоном* — переходной зоной, в которой часто располагается геохимический барьер. Типичными экотонами могут служить опушка леса или заросли погруженных растений на берегу водоема. Ландшафты входят в биогеографические зоны, совокупности которых представлены *биотами*. Со времен А. Гумбольдта признается, что определяющим для биогеографической зоны является растительный покров, создающий ее «физиогномическую» характеристику — интуитивно воспринимаемую целостность системы. Биогеографические зоны распределяются закономерно в связи с климатом.



Для океанических систем существует своя классификация, важнейшими компонентами которой являются: 1) пелагиаль открытого океана с олиготрофными, бедными фитопланктоном участками и продуктивными зонами, например в Северной Атлантике или вокруг Антарктиды; 2) континентальный шельф с конусами выноса крупных рек и очень высокой продуктивностью; 3) окраинные моря, часто за островными дугами. В современную эпоху высокого стояния материков (геократическую) не развиты так называемые эпиконтинентальные моря, широко распространенные в талассократические эпохи высокого стояния уровня океана.

Все это входит в биосферу — гетерогенную систему различных участков, которые связаны между собой переносом вещества. Так, разные части океана связаны между собой океанскими течениями, образующими петлю поверхностных и глубинных течений в мировом океане. Перемешивание в океане осуществляется довольно медленно и требует более тысячи лет. Наиболее общей частью Земли, занятой биосферой, является хорошо перемешанная атмосфера, которая подвергается глобальной циркуляции вследствие разного количества энергии, получаемой на разных широтах. Ветры перемешивают атмосферу в широтном направлении за недели, но перенос через экватор требует около года. Из важнейших биогенных элементов, к которым относятся углерод, азот, кислород, фосфор, сера (CNO<sub>2</sub>S), — большинство имеет воздушную форму миграции, и они поэтому равно доступны для жизни всюду. Примечательное исключение составляет фосфор, мигрирующий либо в воде, либо с аэрозолем в воздухе. Твердая геологическая среда в рассматриваемом временном промежутке неподвижна, хотя образование осадков в бассейнах седиментации идет достаточно быстро, чтобы быть предметом внимания микробиологов. Тем более это относится к почве — тонкому поверхностному слою, обогащенному продуктами жизнедеятельности организмов.

Здесь следует обратиться к принципу, выдвинутому в конце XVIII века А. Гумбольдтом: рассматривать взаимодействие одновременно сосуществующих объектов. Невозможно взаимодействовать с тем, что было или будет. Для взаимодействия необходимо единство времени и пространства. Поэтому система рас-

сматривается как одномоментная. Вместе с тем неизбежно основываться на продуктах или результатах прошлого, пришедших в настоящее, и тем самым ввести принцип историзма. Но происхождение объектов не объясняет их взаимодействия в настоящем. Поэтому в анализе системы следует ограничиться горизонтальным временным срезом. Напротив, выясняя, почему объекты рассматриваются такие, а не иные, приходится обращаться к их происхождению, или *эволюции*, обусловленному вертикалями генеалогии или филогении. Между сукцессией, входящей в рассматриваемые временные рамки взаимодействий между существующими объектами, и эволюцией, приводящей к появлению новых объектов, располагается граница, определяемая *мерой* или *масштабом* проводимого анализа. Выход за пределы рамок принятого масштаба ведет к логическим ошибкам.

Из этого беглого обзора глобальной системы мы подходим к важнейшему методологическому принципу естествознания: *иерархическому* исследованию систем. Все перечисленные системы представляют ряд вкладываемых одна в другую матрешек. Биосфера сложена разными природными зонами с входящими в них биомами; природные зоны включают ряд ландшафтов, которые, будучи сходными, вместе с тем различны и неповторимы; в ландшафты входят экосистемы с их сообществами; сообщества слагаются видами; наконец, каждый вид представлен популяциями организмов, в нашем случае микроскопических; и здесь, минная область дифференциации, важнейшую для понимания многоклеточных организмов с тканевым строением, мы вступаем в область биологии клетки. Каждая клетка представляет собой строго организованную, целесообразную, в смысле устойчивости, систему. Но важнейший вопрос исследования систем состоит в том, в каком направлении двигаться: сверху вниз — от общего к частному, или же снизу вверх — от элемента к системе?

Тот или иной ответ на вопрос влечет за собой определенную мировоззренческую позицию. Путь сверху вниз носит название редукционизма. Рассмотрение общего называется холизмом. Можно ли понять систему, не зная ее элементов? Может ли изменение элемента изменить систему? Означает ли знание элементов знание системы? На последний вопрос ответ кажется несомненным:

нет, потому что в этом случае остаются неизвестными связи между элементами, делающие из множества систему. Отсюда вытекает и практическая рекомендация. При исследовании объекта определенного ранга необходимо представлять себе как систему высшего ранга, в которую он входит, так и те элементы, из которых он составлен. Природоведческая микробиология требует понимания и природы, и микроорганизмов.

Задача наша состоит в том, чтобы среди иерархически соподчиненных систем выбрать ту, которая более всего соответствует цели исследования. Экология микроорганизмов представляет собой приложение принципов системного анализа к миру микробов. Наиболее соответствующим профессиональной подготовке общих микробиологов является уровень микробного сообщества. В сообщество входят разнообразные по своим физиологическим особенностям организмы. Условия развития их в природе представляют область *аутэкологии*, в первую очередь определяемую экофизиологией данного вида. Она, в свою очередь, определяется биологией клетки данного вида, особенностями его обмена, в первую очередь энергетического, регуляцией, кинетикой роста, пределами устойчивости к факторам внешней среды. Совокупная деятельность микроорганизмов в природе, когда все микробное население представляется «черным ящиком», о деятельности которого судят по суммарным геохимическим реакциям, рассматривается *синэкологией* и, собственно говоря, не требует специально микробиологических знаний, кроме самых поверхностных. Такую задачу достаточно точно решает геохимик или агрохимик, понимающий условия среды, в которой действуют микроорганизмы, и оперирующий суммарными понятиями «сульфидогенеза», «метаногенеза», деструкции и продукции. Задача микробиолога — понять, что происходит внутри «черного ящика», каковы особенности взаимодействия функциональных группировок организмов друг с другом, где находятся механизмы, определяющие то или иное направление процессов.

Итак, центр тяжести в экологии микроорганизмов лежит в исследовании микробного сообщества. При этом используется вся сумма знаний, полученная при изучении разных функциональных, или, как их называют традиционно, физиологических групп

микроорганизмов, и требуется понимание общей системы действия микроорганизмов в природе на основе, прежде всего, биогеохимических циклов.

## 5. СИСТЕМА БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ

Связь между биогеохимическими циклами в биосферной системе осуществляется серией частных реакций в этих циклах. Традиционная общая микробиология оказалась подготовленной к решению такой задачи, разработав в течение столетия систему «физиологических групп» и «морфо-физиологическую» систематику бактерий, преимущественно на уровне родов и иногда семейств. По своим принципам эта система совпадает до известной степени с системой «жизненных форм» ботаников и зоологов.

Система биогеохимических циклов (рис. 1) определяется ведущим циклом *органического углерода*  $C_{орг}$  и сопряженными с ним в эквимолекулярном отношении 1:1:1 циклами *углекислоты*

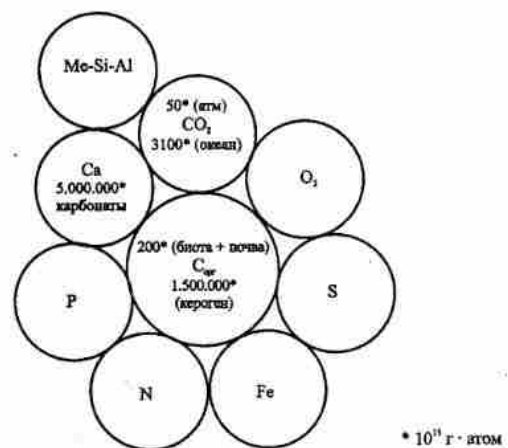
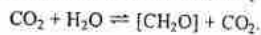


Рис. 1. Сопряжение основных биогеохимических циклов

CO<sub>2</sub> и кислорода O<sub>2</sub>. Эквивалентное соотношение между этими циклами следует из хорошо известного уравнения, описывающего фотосинтез (слева направо) и дыхание (в обратном направлении):



Цикл органического углерода обусловлен: 1) первичной продукцией за счет использования внешней солнечной энергии, прежде всего фотоавтотрофными кислородными организмами (цианобактериями, водорослями, растениями), и в небольшой степени хемоавтотрофами — за счет поступления эндогенного водорода в газогидротермах, 2) деструкцией, осуществляемой органотрофными организмами, аэробными и анаэробными. Деструкционная ветвь цикла органического углерода наиболее сложна, и поэтому ее следует рассмотреть подробнее отдельно, ознакомившись с общими принципами организации участия сообществ микробов в циклах. Конечным продуктом деструкции служит углекислота, замыкающая цикл органического углерода и сопрягающая его с циклом неорганического углерода и циклом кислорода.

Цикл органического углерода дополняется *циклом азота N*, в котором азот входит в органические соединения в соотношении C:N = 6:1, а также происходят превращения неорганических форм азота. Цикл азота с его этапами — азотфиксацией, аммонификацией, нитрификацией, денитрификацией — целиком определяется деятельностью бактерий.

*Цикл фосфора P* стехиометрически связан с циклом органического углерода в отношении C:P = 100:1 (в реакциях анаболизма). В цикле фосфора, как уже отмечалось, в отличие от других биогенных макроэлементов отсутствует стадия воздушной миграции, обеспечивающая равномерное распределение по всему земному шару с воздушными потоками.

*Цикл неорганического углерода* смыкается через углекислоту воздуха и ее растворенные формы в гидросфере с циклом органического углерода. В литосфере неорганический углерод представлен в основном карбонатными породами, прежде всего карбонатом кальция.

*Цикл кальция Ca* определяется, прежде всего, биологически опосредованными реакциями растворения (выщелачивания) и осаждения карбонатов, а также образованием минеральных ске-

летов некоторыми протистами и макроорганизмами. Цикл кальция сопряжен также с циклом фосфора через образование и растворение фосфатов кальция.

Первичное поступление кальция и магния в биологические циклы связано с *циклом кремния Si* и химическим выветриванием силикатных изверженных пород, идущим, вообще говоря, под воздействием углекислоты, но ускоряемым примерно в 100 раз под воздействием микроорганизмов и продуктов их обмена в биологически опосредованных процессах. Выщелачивание обуславливает поступление в водную фазу микроэлементов.

С циклом органического углерода сопрягается *цикл серы S* в катализируемых только бактериями реакциях сульфат- и сероредукции (сульфидогенеза), окисления соединений серы анаэробными фототрофными и аэробными хемотрофными организмами. В биогеохимическом цикле серы участвуют следующие формы соединений серы, создающие значительные резервуары: 1) сульфаты, преимущественно сульфаты моря; 2) сульфиды, в виде растворенного сероводорода H<sub>2</sub>S и нерастворимых сульфидов металлов, частично эндогенного (вулканического) и в основном экзогенного (биогенного) происхождения; 3) сера, в значительной части эндогенного происхождения. Разнообразные промежуточные соединения неполного окисления серы, как тиосульфат или SO<sub>2</sub>, появляются в транзитных формах и незначительной концентрации, не образуя резервуары. В цикле серы бактерии осуществляют окисление сероводорода и сульфидов либо при фотосинтезе, либо за счет внешних доноров электрона.

*Цикл железа Fe* сопрягается с циклом кислорода деятельностью аэробных железобактерий, окисляющих закисное железо в гидрат окиси железа, и с циклом органического углерода деятельностью железоредуцирующих бактерий, образующих восстановленное железо и магнетит. Цикл железа связан с циклом серы через образование сульфидов железа и их окисление бактериями.

Биогеохимическая машина планеты представляется системой взаимосвязанных циклов элементов. Эти циклы действуют как в планетарном масштабе, так и в конкретных ландшафтах-экосистемах. Общим правилом служит тезис «циклы в циклах», действующий на всех иерархических уровнях.

Итак, интересы микробиологии четко разделяются на три области.

1. Биология прокариотной клетки как простейшей единицы живого мира рассматривает универсальные, свойственные всем бактериям свойства. Она основывается на знании путей метаболизма в цитозоле, биоэнергетики мембран, механизма синтеза белков на рибосоме, генетики и генома. В отличие от биохимиков и молекулярных биологов, микробиологи имеют дело с микробной клеткой как организованной единой *системой*, представляющей *целостный организм* с его реакциями, обусловленными взаимодействием компонентов клетки.

2. Разнообразие микробного мира охватывает *множество видов микроорганизмов* в их функциональном и филогенетическом упорядочении. Характеристики множества разных бактерий составляют комбинаторную матрицу, основанную на разнообразии осуществляемых бактериями химических реакций, включая пути обмена с набором соответствующих ферментов и с транспортными механизмами; физических характеристиках — морфологии, жизненных циклах, адаптационных механизмах; генетических свойствах. Главным методом изучения разнообразия бактерий служит чистая культура микроорганизма в контролируемых условиях. Эта область находится в руках исключительно микробиологов и требует эвристического подхода к поиску, опознанию, культивированию, описанию, классификации множества организмов на основе сравнительного подхода. Изучение поведения вида микроорганизма в местообитаниях дает сведения о его аутоэкологии.

3. Природоведческая микробиология рассматривает деятельность микроорганизмов в природе. Центральным объектом исследования является микробное *сообщество* как система взаимодействующих между собой разнообразных организмов. Сообщество функционирует в экосистеме, реализующейся в ландшафте. К изучению сообщества есть два пути: один, основанный на определении состава сообщества, взаимодействий в нем, путей метаболизма, организмов ответственных за ключевые реакции, или второй — «бескультурный», где культура не используется, а описываются суммарные процессы химическими методами в рамках синэкологии. В определенной части синэкологическая микробио-

логия сливается с биогеохимией и геобиофизикой, предоставляющих знания о химических, минералогических, транспортных процессах, геологической среде обитания микробного сообщества.

В двух следующих частях, написанных для не-микробиологов, кратко описывается устройство прокариотной клетки и перечисляются группы организмов, с которыми придется встретиться в природе. Эти две части представляют собой очень сжатый конспект обычных курсов общей микробиологии, сосредоточенный на вопросах, которые понадобятся при обсуждении вопросов природоведческой микробиологии, т. е. описываются те компоненты сообщества как системы, с которыми придется столкнуться в дальнейшем. Необходимо специально подчеркнуть, что эта часть книги является вспомогательной и не предназначена для изучения цитологии, генетики или метаболизма прокариот. Одним из серьезных упрощений служит предположение, что с объектами не происходит генетических изменений, и что все, с чем сталкивается естествоиспытатель в рассматриваемом временном масштабе, предсуществует в природе, но может переходить от малозаметного состояния к доминирующему. Вопрос, на который следует ответить при обсуждении клетки как системы, состоит в том, какие свойства ее важны для системы высшего уровня — сообщества и экосистемы, — а какие останутся скрытыми в ее внутренней сфере, «черном ящике».

## ЧАСТЬ 1

## КЛЕТКА

## 1. ПРОКАРИОТНАЯ КЛЕТКА КАК СИСТЕМА

Прокариотная клетка может рассматриваться как система, сложенная четырьмя подсистемами: *генам* — хромосомой с аппаратом репликации; аппаратом синтеза белка (*рибосомой*); *цитозолем*, включающим сеть метаболических путей с обслуживающими их ферментами; *мембраной* с энергодающим аппаратом синтеза АТФ и транспортными системами, осуществляющими взаимодействие клетки с внеклеточной средой. В общем виде взаимодействие этих подсистем можно представить схемой (рис. 2).

1. Энергодающая мембрана, осуществляющая электрохимическое преобразование энергии во внутреннюю энергию мембраны и синтез АТФ. В мембране расположен механизм трансмембранного переноса веществ: субстратов — внутрь клетки и продуктов — наружу. Система транспорта определяет средство клетки к субстратам метаболизма и соответственно эффективность осуществляемых ею химических реакций. Исследование энергетического механизма было в основных чертах завершено в 1980-х гг. О его активности судят по «энергетическому заряду», соответствующему относительному содержанию АТФ, энергизации мембраны.

2. Рибосома, представляющая РНК-содержащий аппарат синтеза белка из аминокислот-предшественников, поступающих из цитоплазмы, и расходующая энергию, поступающую от энергодающего мембранного аппарата. Она действует в соответствии с командами, получаемыми через РНК-полимеразу от хромосомы. Рибосомальный аппарат может подвергаться самосборке во время роста клетки при необходимости синтеза белков. Он оценивается по суммарному содержанию РНК в клетке, различному в покое состоянии и в период активного роста.

3. Хромосома, содержащая, во-первых, генетическую информацию для собственной репликации за счет предшественников (азотистых оснований), поступающих из цитоплазмы, и энергии, поступающей от энергодающего мембранного аппарата; во-вторых, информацию для синтеза белка РНК-полимеразным блоком в соответствии с регуляторными сигналами в виде белков-активаторов и репрессоров, поступающих из цитоплазмы. Геном бактерии представляет постоянную для

вида компоненту и может быть оценен анализом ДНК. Важным итогом изучения генетической информации бактерий в 1990-х гг. было установление последовательностей оснований, соответствующих многим отдельным генам.

4. Цитоплазма, представляющая, во-первых, «котел» метаболических превращений поступающих извне веществ, с образованием энергетических субстратов для АТФ-продуцирующего блока (катаболизм) и соединений-предшественников для синтеза компонентов клетки (анаболизм), и, во-вторых, собственно место действия ферментов. Здесь же находятся компоненты сигнальных путей, обеспечивающих регуляцию экспрессии генов. Цитоплазматический «котел» был в общих чертах исследован к 1960-м гг., что привело к созданию метаболических карт, представляющих граф транспортной сети аналогичный сети промышленного производства. Различают более или менее сходный для всех организмов «центральный метаболизм» (с циклом трикарбоновых кислот и образованием предшественников аминокислот) и «подготовительный метаболизм», различный у разных организмов и служащий для совмещения разнообразных используемых субстратов с реакциями центрального метаболизма. У некоторых организмов реакции

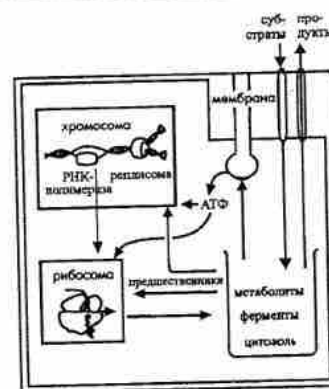


Рис. 2. Основные подсистемы прокариотной клетки

катаболизма и анаболизма представляют два отдельных потока. Однако эта сеть не составляет вполне саморегулирующейся системы и поэтому за описанием последовало изучение сигнальных путей, служащих для регуляции обмена. Метаболизм бактерий стал важнейшей характеристикой их функционального разнообразия.

Взаимодействие между подсистемами клетки ведет к тому, что ни одна из них не способна к самостоятельному существованию. Например, на поверхности клеток иногда образуются вздутия, превращающиеся в «мини-клетки» — везикулы, содержащие мембрану и цитоплазму, но не геном, и поэтому не способные к самовоспроизведению. Напротив, разнообразные внехромосомные элементы вне клетки являются вполне инертным материалом. При поступлении в клетку они становятся объектом воздействия разнообразных рестриктаз, представляющих механизм гетерофобии, и только в специальных условиях могут реплицироваться. Таким образом, клетка представляет систему, все части которой взаимозависимы, хотя и индивидуальны.

Подсистемы клетки, перечисленные выше, достаточно сложны сами по себе и, чтобы получить представление, как они действуют, необходимо кратко рассмотреть их устройство и вторгнуться в область биоэнергетики, молекулярной биологии и биохимии. Главная задача при этом — понять, что несовместимо с действием этих механизмов. Рассмотрение поневоле будет очень кратким, предназначенным преимущественно для не-микробиологов и имеет целью ограничить полет фантазии у неспециалистов о всемогуществе бактерий или простоте их возникновения. Особое внимание будет обращено на взаимодействие подсистем между собой и их значение для клетки как целостной системы.

Для более подробного ознакомления с работой бактериальной клетки и ее подсистем следует обратиться к учебным пособиям по общей микробиологии: Шлегель Г. «Общая микробиология» (1987), Готшалк Г. «Метаболизм бактерий» (1982), Скулачев В. П. «Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии» (1989), Спирина А. С. «Молекулярная биология. Структура рибосомы и синтез белка» (1986). Особенно рекомендуются доступные обзорные статьи А. С. Спирина, В. П. Скулачева, А. Д. Виноградова, О. Н. Кулаевой и ряда других авторов в Соросовском общедоступном журнале (1998–2000).

## 2. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Реакции энергетического обмена представляют важнейшую функцию микроорганизмов, связанную с их преимущественно химическим взаимодействием со средой. Это взаимодействие полностью определяется термодинамическими закономерностями. Бактерии удивительно полно используют возможности получения энергии, но в этом отношении действует ряд ограничений, обусловленных способами ее превращения.

Источниками энергии для организмов могут служить свет и восстановленные химические соединения. Способность использовать энергию света свойственна фотосинтезирующим микроорганизмам, представляющим несколько филогенетически и функционально различных групп. Наибольшее распространение получил кислородный фотосинтез, осуществляемый цианобактериями и всеми фототрофными эукариотами. Для природоведческой микробиологии его значение связано прежде всего с первичной продукцией, представляющей исходный этап большинства трофических цепей, и с образованием молекулярного кислорода, обеспечивающего существование аэробов.

Способность использовать химическую энергию присуща всем без исключения организмам. Особенно многообразны возможности прокариот. Это относится как к природе окисляемых субстратов, которыми могут быть неорганические (например,  $H_2$ ,  $S^{2-}$ ,  $S^0$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $NH_3$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $CO$ ) или многочисленные органические соединения, так и окислителей ( $O_2$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $S^0$ ,  $CO_2$ , органические вещества). Организмы используют в первую очередь субстраты, дающие наибольший выигрыш энергии.

### 2.1. ТЕРМОДИНАМИКА ХЕМОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. (НЕКОТОРЫЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СООБРАЖЕНИЯ)

Возможность использовать энергию химической реакции для роста организмов определяется изменением свободной энергии,  $\Delta G$  (т. е. той энергией, которая при постоянном давлении и температуре может быть превращена в работу). Понятие свободной



Связь стандартной свободной энергии реакции с окислительно-восстановительным потенциалом выражается уравнением:

$$\Delta G^{\circ} = -nF \Delta E_0^{\circ},$$

где  $n$  — число перенесенных протонов;

$F$  — число Фарадея;

$\Delta E_0^{\circ}$  — разность стандартных окислительно-восстановительных потенциалов ( $E_0^{\circ}$ ) акцептора и донора электронов (табл. 2). В условиях контакта с атмосферой веществом, задающим окислительно-восстановительный потенциал, в первую очередь, является  $O_2$ .

Таблица 2

Окислительно-восстановительные потенциалы некоторых веществ, участвующих в энергетическом метаболизме микроорганизмов\*

Окислительно-восстановительная пара	$E_0^{\circ}, V$	Окислительно-восстановительная пара	$E_0^{\circ}, V$
$SO_4^{2-} / HSO_3^-$	-0,52	Фумарат / сукцинат	+0,33
$CO_2 /$ формат	-0,43	Цитохром $v$ ок. / восст.	+0,035
$2H^+ / H_2$	-0,41	Убихинон ок. / восст.	+0,113
$S_2O_3^{2-} / HS^- + HSO_3^-$	-0,40	Диметилсульфоксид / диметилсульфид	+0,16
Ферредоксин ок. / восст.	-0,39	$Fe(OH)_3 + HCO_3^- / FeCO_3$	+0,20
Флаводоксин ок. / восст.	-0,37	$S_2O_4^{2-} / S_2O_3^{2-} + HSO_3^{2-}$	+0,225
НАД / НАДН	-0,32	Цитохром $c_1$ ок. / восст.	+0,23
Цитохром $c_2$ ок. / восст.	-0,29	$NO_2^- / NO$	+0,36
$CO_2 /$ ацетат	-0,29	Цитохром $a_3$ ок. / восст.	+0,385
$S^0 / HS^-$	-0,27	$NO_3^- / NO_2^-$	+0,43
$CO_2 / CH_4$	-0,24	$ScO_4^{2-} / ScO_3^{2-}$	+0,475
$SO_4^{2-} / HS^-$	-0,217	$Fe^{3+} / Fe^{2+}$	+0,77
Ацетальдегид / этанол	-0,197	$Mn^{4+} / Mn^{2+}$	+0,798
Пируват / лактат	-0,19	$O_2 / H_2O$	+0,82
Флаводоксин ок. / восст.	-0,12	$NO / N_2O$	+1,18
$SO_4^{2-} / HS^-$	-0,116	$N_2O / N_2$	+1,36
Менахинон ок. / восст.	-0,075		

\* по Thauer R., Jungerman K., Decker K. 1977.

Для природоведческой микробиологии важнейшим показателем служит окислительно-восстановительное состояние среды обитания микроорганизмов. Для реакций неорганических веществ были рассчитаны поля устойчивости соединений и минералов в координатах окислительно-восстановительного потенциала Eh и pH (диаграмма Пурбэ). Eh характеризует восстановленность среды, а pH отражает концентрацию протонов. В качестве примера на рис. 3 приведена диаграмма устойчивости соединений железа.

Микроорганизмы развиваются в поле

устойчивости продукта реакции и неустойчивости (метастабильности) субстрата. Поэтому геохимические поля устойчивости минералов и области развития микроорганизмов и их сообществ коррелируют между собой, что принципиально важно для геохимии.

## 2.2. МЕХАНИЗМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЭНЕРГИИ

Часть свободной энергии, высвобождаемой в окислительно-восстановительных реакциях, может быть использована для синтеза АТФ, который служит важнейшим, но не единственным переносчиком энергии в клетке. Помимо АТФ в метаболизме клетки участвуют другие богатые энергией соединения, к ним относятся другие нуклеотид ди- и трифосфаты, аденозинфосфосульфат, ацилфосфаты (например, карбамоилфосфат), фосфоенолпируват. Важнейшим макроэргическим соединением для анаэробов служит ацетил-КоА. Однако все эти соединения обмениваются с АТФ и поэтому представления об АТФ, как универсальном переносчике энергии, достаточно.

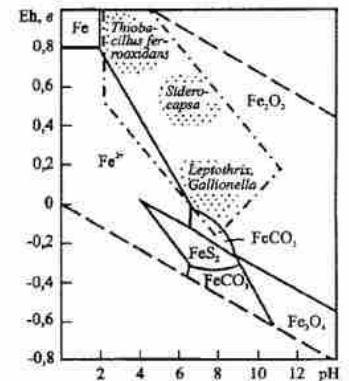


Рис. 3. Поля устойчивости соединений железа в координатах Eh-pH. Показаны области развития основных групп железобактерий. Пунктир — поле устойчивости воды



АТФ может синтезироваться путем *субстратного фосфорилирования*, чаще всего за счет переноса фосфорильной группы от богатого энергией соединения на АДФ. Такой способ реализуется при гликолизе, разнообразных видах брожения и некоторых других процессах. Субстратное фосфорилирование осуществляется в цитоплазме и может быть воспроизведено в бесклеточных экстрактах.

Второй механизм синтеза АТФ, *мембранное фосфорилирование*, необходимо зависит от наличия энергизованной мембраны и связан с использованием энергии трансмембранного электрохимического градиента ионов (в общем случае  $\Delta\mu$ ), чаще всего ионов водорода ( $\Delta\mu\text{H}$ ). Этот механизм реализуется в процессах дыхания (*окислительное фосфорилирование*) и фотосинтеза (*фотофосфорилирование*).

Окислительно-восстановительные реакции, в результате которых бактерии получают энергию, представляют собой перенос электронов от окисляемого вещества (донора электронов) к окислителю (акцептору). Перенос электронов от донора к акцептору осуществляется по градиенту редокс-потенциала через ряд последовательно функционирующих переносчиков. Часть из них закреплена в мембране, а часть находится в цитоплазме и сопрягает эти два компонента клетки. Набор переносчиков характерен для каждого организма.

Комплекс переносчиков электронов работает как универсальная структура для всех окисляемых веществ, лишь бы в метаболизме была реакция, совмещающая окислительное преобразование субстрата с цепью переноса электронов, на конце которой находится окислитель, например для  $\text{O}_2$  — цитохромоксидаза. Вместе с тем универсальным продуктом реакции должна быть генерация АТФ. Она осуществляется мембранным ферментом АТФ-синтазой, катализирующим синтез АТФ путем конверсии энергии трансмембранного электрохимического градиента протонов  $\mu\text{H}$  в энергию АТФ.

У аэробных органотрофов донором электронов служат органические вещества, окисление которых приводит к восстановлению переносчика водорода НАД в НАДН. Последний реагирует с электронтранспортной цепью. Моделью для окислительного фосфорилирования служит митохондрия зукариот (рис. 4).

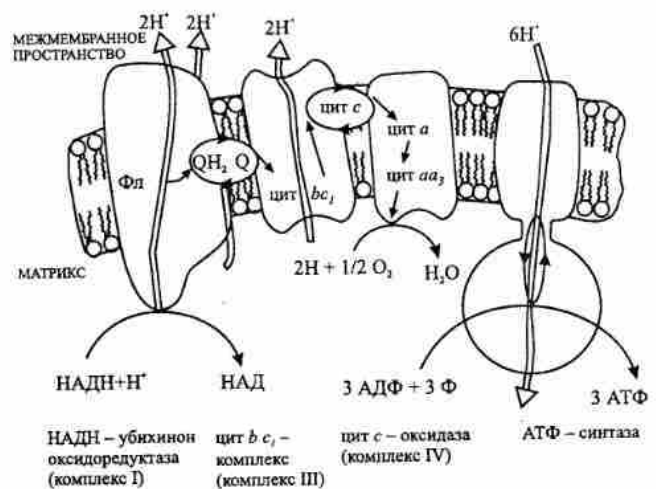


Рис. 4. Дыхательная цепь митохондрий

Цит — цитохром, Q — хинон, Фл — флавопротеин. Суммарный процесс переноса электронов разбит на три стадии, которые катализируются комплексами I, III и IV. Каждый комплекс представляет собой весьма крупное образование, построенное из многих полипептидных цепей. Первая стадия окисления НАДН катализируется комплексом I (НАДН: убихинон-оксидоредуктазой) и ведет к восстановлению убихинона Q. В состав комплекса I входит флавопротеин и Fe-S-кластеры. Вторая стадия, реакция окисления восстановленного убихинона и сопряженного восстановления цит *c* катализируется комплексом III (убихинон: цит *c*-оксидоредуктазой или *bc*-цитохромным комплексом). В его состав входит Fe-S-белок Риске, цит *c*, или *l*, цит *v*. Третья стадия, перенос электронов от цит *c* на  $\text{O}_2$ , катализируется комплексом IV, цитохромоксидазой. Перенос электронов сопряжен с переносом протонов через сопрягающую мембрану и генерацией  $\Delta\mu\text{H}$ . Превращение энергии  $\Delta\mu\text{H}$  в энергию АТФ осуществляется АТФ-синтазой.

У фотосинтезирующих организмов процессы преобразования световой энергии, приводящие к синтезу АТФ и образованию восстановителя, необходимого, например, для фиксации  $\text{CO}_2$ , включают следующие этапы. Энергия света поглощается пигментами светособирающих антенных комплексов и передается в реакционный центр (РЦ), в котором происходит превращение электромагнитной формы энергии в энергию электрохимического

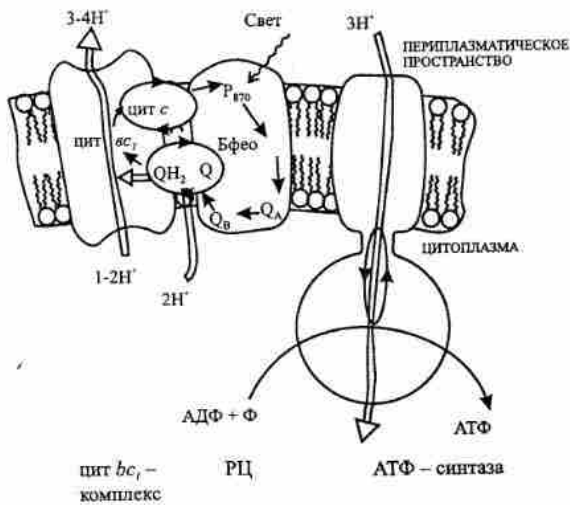


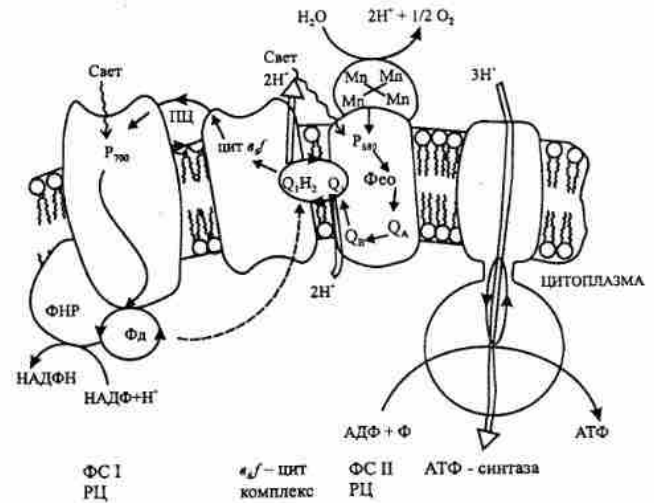
Рис. 5. Цепь переноса электронов при фотосинтезе  
А. Аноксигенный фотосинтез (пурпурные бактерии)

$P_{870}$  — бактериохлорофилл; Бфео — бактериофеофитин; Q — хинон (Q — пластохинон); цит — цитохром;  $P_{800}$ ,  $P_{700}$  — хлорофилл; Фео — феофитин; Фд — ферредоксин; ПЦ — пластоцианин; ФС — фотосистема; РЦ — реакционный центр; ФНР — ферредоксин:НАДФ оксидоредуктаза.

Электроны от фотовозбужденного  $P_{870}$  передаются на убихинон Q, восстанавливая его, далее на цит bc<sub>1</sub> комплекс и через цит c и c<sub>2</sub>, возвращаются к молекуле окисленного  $P_{870}$ . Перенос электронов сопряжен с трансмембранным переносом протонов при окислении убихинола цит bc<sub>1</sub> комплексом, что ведет к генерированию  $\Delta pH$ . Результатом циклического переноса электронов является синтез АТФ.

разделения зарядов. Фотохимически активный хлорофилл (или бактериохлорофилл) РЦ, обозначаемый обычно буквой Р (от англ. pigment), переходит в электронно-возбужденное состояние и окисляется, отдавая электрон первичному акцептору. Перенос электрона на вторичный акцептор и восстановление окисленного Р первичным донором электронов стабилизирует разделение зарядов в РЦ. Дальнейшие процессы связаны с переносом электрона по электронтранспортной цепи, сопряженным с синтезом АТФ

2-2



Б. Оксигенный фотосинтез

У оксигенных фототрофов имеются две фотосистемы: ФС I (с  $P_{700}$ ) и ФС II (с  $P_{680}$ ). В состав ФС II входит Mn-содержащий комплекс, осуществляющий разложение  $H_2O$ . Электроны от фотовозбужденного  $P_{680}$  через ряд переносчиков РЦ передаются на пластохинон, далее в цит  $b_6/f$  комплекс и через пластоцианин на  $P_{700}$ . От фотовозбужденного  $P_{700}$  (через ряд переносчиков РЦ) электроны поступают на Фд, связывающий ФС I с НАДФ-редуктазой (ФНР), которая восстанавливает НАДФ. Таким образом, происходит последовательный перенос электронов от воды к НАДФ. Реакции электронного транспорта, связанные с разложением воды в ФС II и окислением молекулы пластохинола цит  $b_6/f$  комплексом, сопровождаются трансмембранным переносом протонов, сопряженным с генерированием  $\Delta pH$  и синтезом АТФ. Образование АТФ возможно и в результате связанного с ФС I циклического переноса электронов (показан пунктиром).

(рис. 5 А, Б). Природа акцепторов электронов в РЦ и состав переносчиков электронов у разных групп фототрофов различаются. Существенно, что часть переносчиков являются общими для фотосинтетической и дыхательной электронтранспортной цепи, обуславливая у бактерий взаимосвязь процессов фотосинтеза и дыхания.

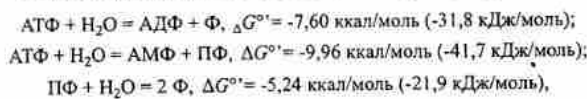
2\*

Различают циклический или нециклический пути переноса электронов. Циклический путь, свойственный, например, пурпурным бактериям, обеспечивает синтез АТФ (см. рис. 5 А), но не восстановителя. Поэтому восстановление НАД у этих микроорганизмов происходит в результате АТФ-зависимого обратного переноса электронов. У зеленых серобактерий перенос электронов осуществляется по нециклическому пути, обеспечивая синтез АТФ и восстановление НАД. Донорами электронов у анаэробных, т. е. не выделяющих  $O_2$ , организмов служат восстановленные соединения серы,  $S^0$ ,  $H_2$ ,  $Fe^{2+}$  или некоторые органические вещества. Цианобактерии и эукариотные фототрофы используют в качестве донора электронов  $H_2O$  и осуществляют фотосинтез с выделением  $O_2$  — кислородный. В отличие от анаэробных бактерий, имеющих одну фотосистему (ФС), у них последовательно функционируют две фотосистемы (см. рис. 5 Б) и может осуществляться как нециклический (так называемая Z-схема), так и индуцируемый ФС I циклический перенос электронов. Окисление  $H_2O$  осуществляется Mn-содержащим комплексом, связанным с ФС II.

Особый тип фотосинтеза известен у экстремально галофильных археобактерий (галобактерий). В этом случае трансмембранный перенос  $H^+$  и конверсия энергии света в энергию  $\Delta pH$  с последующим синтезом АТФ осуществляются в результате светоиндуцированных преобразований бактериородопсина — пигмент-белкового комплекса, содержащего каротиноид ретиналь.

### 2.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ ПРИ РОСТЕ БАКТЕРИЙ

Реакция гидролиза АТФ соответствует следующим уравнениям:



где  $\Delta G^{\circ}$  — свободная энергия реакции при концентрации  $Mg^{2+}$  0,001M, ионной силе 0,25 и pH7. С учетом реальных концентраций в клетке АТФ (по оценкам около 10 мМ), АМФ (1 мМ), фосфата (6 — 60 мМ) и других компонентов свободная энергия гидролиза составляет АТФ от 10 до 12 ккал/моль.

Концентрация АТФ в клетке определяет ее энергетический заряд

$$\frac{[\text{АТФ}] + \frac{1}{2}[\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}$$

Максимальный энергетический заряд достигается в период интенсивно идущего катаболизма и минимального потребления на анаболизм, но в общем поддерживается в клетке примерно постоянным.

Рост бактерий определяется возможностями синтеза биомассы за счет потребленной энергии. Одним из важных параметров, используемых при оценке роста, является так называемый энергетический коэффициент  $Y_{\text{АТР}}$ , который рассчитывают, как урожай, т. е. число граммов биомассы, синтезированной за счет 1 моля АТФ. У большого числа анаэробов эта величина оказалась близкой к 10 г абсолютно сухой биомассы (а. с. б.) / моль АТФ.  $Y_{\text{АТР}}$  — это не константа, и его величина зависит от условий роста, природы используемых соединений, характера синтезируемых запасных продуктов, скорости роста. Теоретически рассчитано, что при росте за счет использования глюкозы  $Y_{\text{АТР}}$  может составлять 27 г а. с. б./моль АТФ, ацетата и  $CO_2$  — 15, только  $CO_2$  — 5. Экспериментально полученный урожай обычно не превышает 50% от теоретического, остальное расходуется на «энергию поддержания». Основной расход АТФ идет на синтез белка (около 40%) и транспортные процессы (25%).

### 3. ТРАНСПОРТ

Транспорт обеспечивает поступление веществ из среды в клетку и выделение продуктов обмена, определяя взаимодействие клетки со средой. В деятельности осмотрофного организма в природе первостепенное значение имеет его способность быстро и до минимальной концентрации использовать субстрат катаболизма из среды. Мембрана бактерий в принципе селективна и может пропускать лишь некоторые вещества, не допуская в то же время выноса веществ из клетки. Разделение зарядов липидной мембраной как основа энергетического обмена и окислительного фосфорилирования сразу же ограничивает возможность проникновения

в нее заряженных ионов. Некоторые молекулы поступают в клетку путем *пассивной диффузии* до выравнивания концентраций. Если в клетке происходит потребление такого вещества, то создается направленный градиент и вещество проходит через липофильную мембрану. Важнейшим веществом, пассивно проходящим через мембрану, является кислород, реагирующий на внутренней стороне мембраны с цитохромоксидазами. Свободно проходят через мембрану молекулы воды, для которых имеются водяные поры, но не растворенные в ней вещества; вода обеспечивает осмотическое состояние клетки. Пассивная диффузия свойственна липофильным соединениям, включая спирты, жирные кислоты. Диффузия важна не только для проникновения веществ в клетку, но и для удаления из клетки продуктов обмена.

Скорость диффузии может быть увеличена за счет механизма *облегченной диффузии*, в котором участвуют пермеазы — пересекающие мембрану белки-переносчики. Связываясь с транспортируемым веществом, они претерпевают конформационные изменения, в результате чего вещество переносится через мембрану в область его более низкой концентрации (рис. 6, 7). Облегченная диффузия ускоряет процесс выравнивания концентраций, но не может привести к концентрированию вещества внутри клетки по сравнению с внешней средой.



Рис. 6. Поступление вещества в клетку (по Г. Шлегелю, 1987)  
S — концентрация субстрата; V — скорость поступления субстрата в клетку

Трансмембранные белки представляют важнейшее приспособление клетки для взаимодействия с окружающей средой. Они осуществляют не только перенос молекул через мембрану, но и *активный транспорт*, который позволяет избирательно концентрировать внутри клетки необходимые ей вещества против градиента и, по сути, представляют специфическую химическую реакцию. Активный транспорт осуществляется с затратой энергии

либо АТФ, либо за счет протон-движущей силы энергизованной мембраны. От активного транспорта зависит аффинность (сродство) клетки к субстрату — важнейший признак, определяющий и набор, и концентрацию используемых веществ, т. е. зависящую от концентрации кинетику роста.

Один из механизмов, *транслокация групп*, осуществляется при химической модификации переносимого вещества. Лучше всего изучена фосфотрансферная система сахаров. Механизм ее действия заключается в фосфорилировании сахаров на наружной поверхности трансмембранного белка и переносе внутрь фосфорилированного соединения, например, глюкозо-6-фосфата. Фосфотрансферная система сахаров представляет собой сложный мультиферментный комплекс, в котором важно отметить два основных компонента: один, ответственный за фосфорилирование данного сахара, а другой (НРГ), ответственный за перенос к первому компоненту фосфатной группы, поступающей в конечном итоге от фосфоенолпирувата. Фосфотрансферная система используется также при переносе пуринов, некоторых жирных кислот.

Перенос через мембрану веществ без их химической модификации, осуществляемый с использованием энергии трансмембранного потенциала, включает три основных механизма: 1) *унипорт*, когда субстрат (обычно катион, органический или неорганический) транспортируется белком-переносчиком через мембрану, причем другие ионы при этом не переносятся; 2) *симпорт*, когда транспортный белок обеспечивает перенос через мембрану молекулы субстрата одновременно с переносом в том же направлении протона

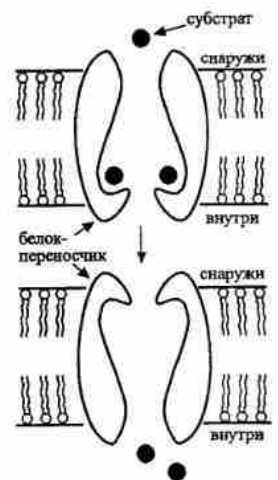


Рис. 7. Перенос вещества через мембрану за счет конформационных изменений белков-переносчиков (по M. Madigan et al., 1997)

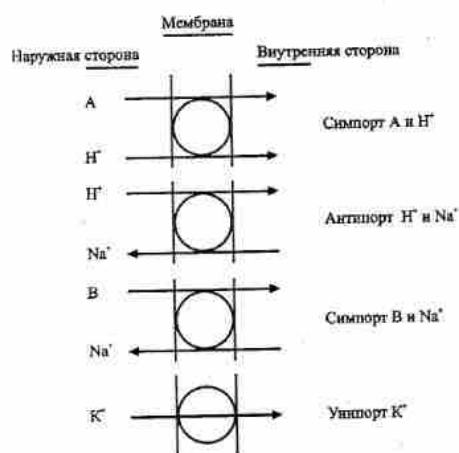


Рис. 8. Активный транспорт за счет энергии протонного потенциала

или иного иона; 3) *антипорт*, когда осуществляется перенос субстрата одновременно с противоположно направленным переносом протона или другого иона (рис. 8). В двух последних случаях молекула транспортируемого субстрата может быть как заряженной, так и незаряженной.

Другой пример системы переноса представляет перенос  $Fe^{3+}$  внутрь клетки. В этом случае железо связывается с комплексообразующими веществами, *сидерофорами*, например, гидроксаматом или производными катехина. Образуется комплекс, который и переносится в клетку. Аффинность бактериальной клетки к железу оказывается очень высока. По-видимому, сходные механизмы комплексообразования действуют и для других поливалентных металлов. Специфическая система акцептирования  $Fe^{2+}$  имеется у ацидофильных окисляющих железо литотрофов, как *Thiobacillus ferrooxidans*. В этом случае на поверхности клетки есть переносчик — рустицианин, который и вступает в реакцию с электронтранспортной цепью.

Перечисленные примеры далеко не исчерпывают разнообразие механизмов транспорта. Следует заметить, что у эукариот разделение клетки на отдельные пространства, ограниченные мембранами (компарментализация), заставляет осуществлять трансмембранный перенос и внутри клетки, что может требовать иных механизмов, чем обмен с внеклеточным пространством.

В природоведческой микробиологии особенности транспорта вещества, определяющие набор используемых веществ и средство клетки к ним, имеют едва ли не большее значение, чем метаболические пути внутри клетки. Особо следует отметить, что клетки обладают разными системами транспорта вещества, включающимися при высокой или низкой концентрации субстрата. Для этих систем транспорта значения  $K_m$  (константы, равной половине максимальной скорости реакции) отличаются на 1–3 порядка.

#### 4. ЦИТОПЛАЗМА И ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА

Обмен клетки направлен на поддержание и умножение вещества, из которых состоит клетка. Для этого необходимы энергия и строительные блоки. И то и другое получается в результате переработки поступающих извне веществ внутри клетки. Энергетический обмен, или *катаболизм*, ведет к получению энергии, а конструктивный обмен, или *анаболизм* — к образованию строительных блоков. Они составляют серии последовательных реакций, образующих пути метаболизма и объединенных в метаболическую сеть. Катаболизм и анаболизм в той или иной степени сопряжены, и общую их часть иногда называют *амфиболизмом* или центральными метаболическими реакциями. Следует заметить, что специальные пути катаболизма свойственны литотрофным микроорганизмам, окисляющим неорганические вещества. В этом случае промежуточные метаболиты не обязательно принадлежат амфиболическим реакциям.

Метаболизм бактерий определяет «типы обмена» или «трофи» — основу группирования их по «физиологическим группам» (см. часть 2). Каждый тип питания характеризуется определенными

путями обмена и соответствующими ключевыми ферментами. Пути метаболизма составляют существенную часть биохимии. Здесь нет возможности излагать их, и придется ограничиться лишь кратким перечислением и ролью в системе. На русский язык переведены краткие учебники Г. Шлегеля «Общая микробиология» и Г. Готтшалка «Метаболизм бактерий», сконцентрированные на обмене бактерий, где этот аспект изложен достаточно подробно и ясно для неспециалиста.

Среди процессов *катаболизма*, осуществляемых микроорганизмами, первостепенное значение имеет разложение углеводов (глюкозы). Наиболее распространенным является путь *Эмбдена-Мейергофа*, или гликолиз (рис. 9), в котором при окислении одной молекулы глюкозы образуются в конечном итоге две молекулы пирувата, выигрываются две молекулы АТФ и две молекулы восстановителя (НАДН). Такой путь характерен для многих анаэробных органотрофных сахаролитических организмов, осуществляющих брожение углеводов. Проблему для анаэробов представляет удаление избытка восстановителя и регенерация НАД как окислителя. Обычно акцепторами служат органические соединения, в результате их восстановления образуются летучие жирные кислоты (ЛЖК), спирты и  $H_2$ . По набору образуемых продуктов различают спиртовое, маслянокислое, молочнокислое, пропионое, смешанное брожения (рис. 10) и соответствующие функциональные группы анаэробов.

Многие бактерии окисляют глюкозу и по другому пути, *Этнера-Дудорова*, с промежуточным образованием 2-кето-3-дезоксиглюконовой кислоты. Итогом являются 2 молекулы пирувата, 2 молекулы НАДН и АТФ.

Наконец, разложение глюкозы через *пентозофосфатный окислительный цикл* включает ряд реакций окисления и декарбоксилирования глюкозо-6-фосфата с образованием рибулозо-5-фосфата и  $CO_2$ . Далее следует серия превращений фосфатов сахаров и регенерация глюкозо-6-фосфата. Одним из интермедиатов пути является 3-фосфоглицерат, который легко может быть превращен в пируват. Пентозофосфатный цикл имеет ряд сходных ступеней с циклом Кальвина — циклическим путем фиксации  $CO_2$  у большинства автотрофов, а также с путем ассимиляции формальдеги-

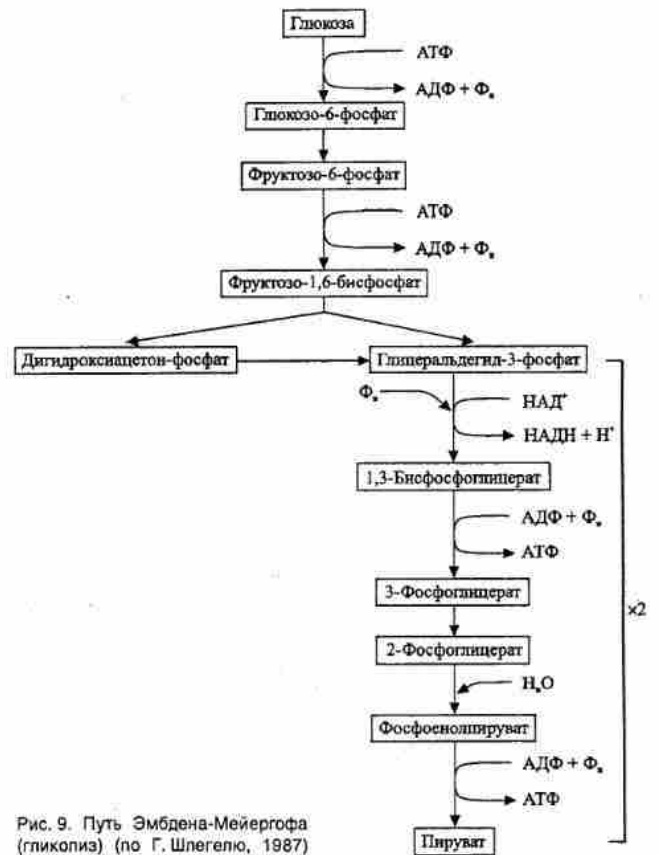


Рис. 9. Путь Эмбдена-Мейергофа (гликолиз) (по Г. Шлегелю, 1987)

да у метилотрофов. Это обеспечивается полной обратимостью реакций между фосфосахарами, находящихся в равновесии между собой, благодаря действию ферментов трансальдозазы и транскеталазы.

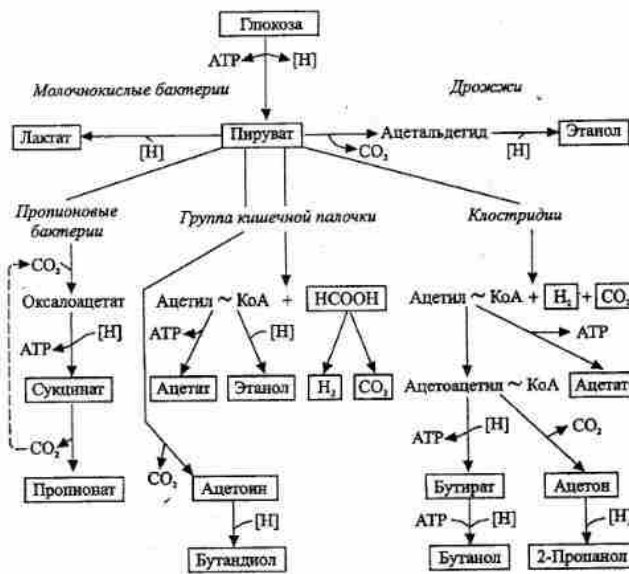


Рис. 10. Продукты брожения глюкозы у важнейших групп организмов-брождильщиков (по Г. Шлегелю, 1987)

Пируват, образованный в реакциях катаболизма глюкозы, является исходным компонентом *центрального метаболизма*. При его окислительном декарбоксилировании образуется ацетил-кофермент А (ацетил-КоА). Он может вступать в *цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)*, называемый иначе *циклом Кребса* (рис. 11), в котором последовательные реакции дегидрогенизации и декарбоксилирования составляют циклическую серию превращений три- и дикарбоновых кислот. Действуя в катаболическом направлении, ЦТК ведет к разложению ацетата на 2 молекулы CO<sub>2</sub> и 4 молекулы восстановителя, НАД(Ф)Н и ФАДН, которые могут затем окисляться в дыхательной цепи с образованием АТФ. Конечным акцептором электронов может служить O<sub>2</sub> или при анаэ-

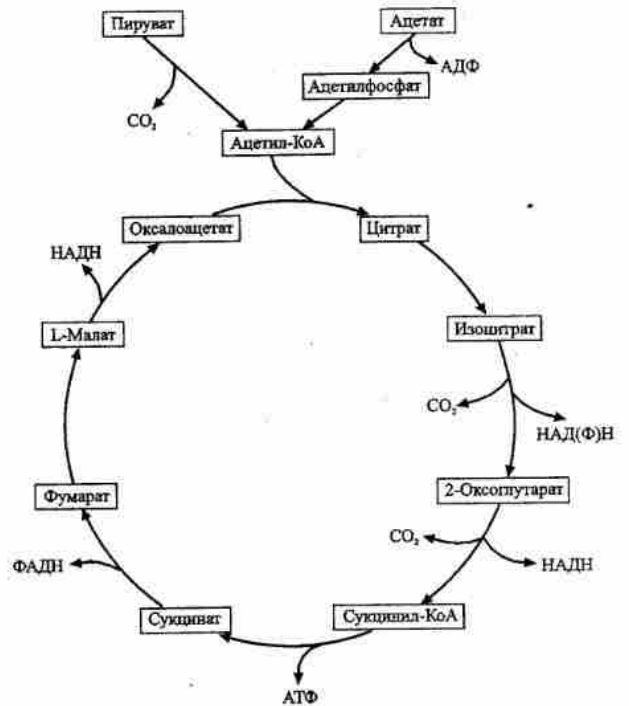


Рис. 11. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)

робном дыхании, свойственном вторичным анаэробам, другие неорганические и органические вещества. Окисление при этом может идти до конца или же быть неполным. Значительное число веществ, используемых микроорганизмами, может быть превращено в ацетат и, следовательно, вступать в ЦТК и другие важнейшие метаболические пути.

Промежуточные продукты центрального метаболизма служат исходными для синтеза строительных блоков в реакциях

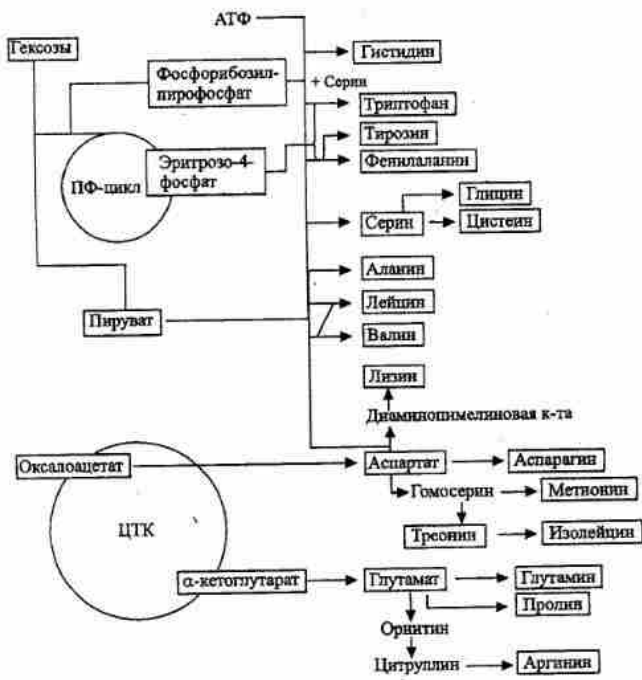


Рис. 12. Основные пути биосинтеза аминокислот (по Г. Шлегелю, 1987) ПФ — пентозофосфатный окислительный путь; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот

анаболизма. Так, большинство углеродных скелетов аминокислот для синтеза белков поставляет ЦТК. Для синтеза 20 аминокислот достаточно всего 6 исходных метаболитов (рис. 12). Другие пути ведут к пуринам, пиримидинам, липидам, фосфолипидам, углеводам и всем другим компонентам клетки, образуя сложную транспортную сеть веществ (рис. 13). В этой метаболической сети важная регуляторная функция принадлежит концентрации метаболитов.

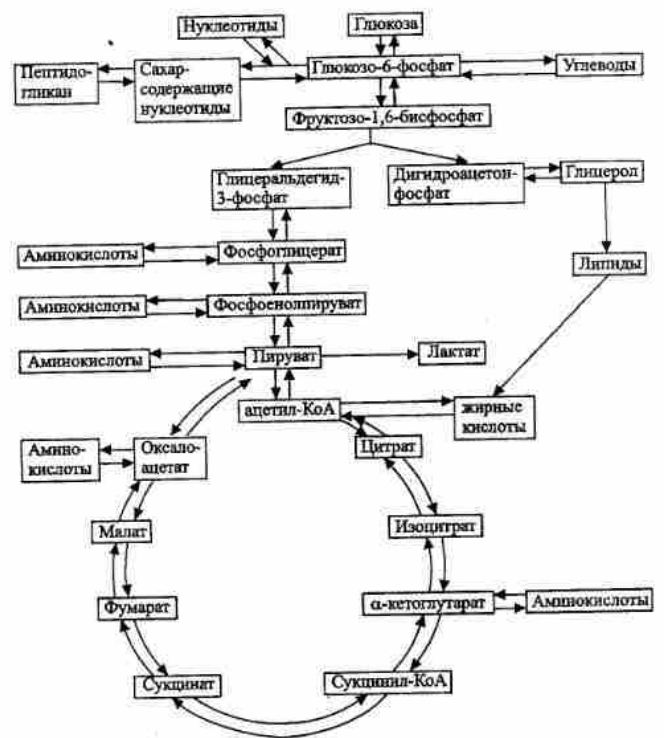


Рис. 13. Взаимосвязь путей катаболизма и анаболизма (по G. Tortora et al., 1998)

Двойными стрелками показаны амфиболические пути

Из строительных блоков, представляющих активированные формы метаболитов в виде фосфатных эфиров, аденилатов, соединений, связанных с коферментом А, образуются макромолекулы. Среди них выделяют необходимые, как нуклеиновые кислоты, белки, фосфолипиды мембраны, компоненты клеточной стенки, и необязательные, как полимерные запасные соединения



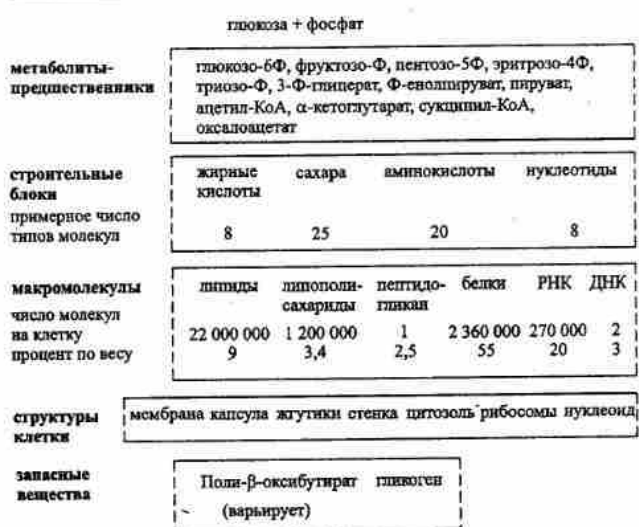


Рис. 14. Общая схема анаболизма хемоорганогетеротрофа

или вещества капсулы (рис. 14). Запасные полисахариды, характерные для организмов, способных к их анаэробному использованию, образуются путем глюконеогенеза. Синтез липидов, в том числе характерного для многих бактерий поли-β-оксибутирата, осуществляется с использованием ацетил-КоА.

Развитые реакции центрального метаболизма позволяют организму осуществлять биосинтетические функции за счет единственного, иногда даже необычного по строению органического вещества. Напротив, яркий случай гетеротрофии представляют организмы, нуждающиеся для биосинтеза во многих предшественниках. Примером может служить молочнокислая бактерия *Leuconostoc mesenteroides*, для роста которой в синтетическую среду следует добавлять 19 аминокислот и 4 пурина и пиримидина. При культивировании гетеротрофных микроорганизмов сумма возможно необходимых строительных блоков заменяется вне-

сением в среду дрожжевого экстракта и набора витаминов. Особенно сложными пищевыми потребностями обладают паразитические микроорганизмы, часть из которых вообще не растет вне хозяина.

Чтобы оказаться совместимыми с реакциями центрального метаболизма, вещества, потребляемые клеткой в качестве субстратов катаболизма, должны претерпеть ряд предварительных превращений, своих для каждого соединения. Эти реакции, иногда называемые *подготовительным метаболизмом*, у бактерий чрезвычайно разнообразны.

Возможность использования субстратов микроорганизмами определяется способом превращения их в транспортируемые в клетку вещества и от совместимости с имеющимся в клетке ферментным аппаратом. Полисахариды гидролизуются экзоферментами до дисахаридов, при этом легко гидролизуются растворимые полисахариды, как гликоген или крахмал, и труднее нерастворимые, как целлюлоза. Дисахариды обычно разлагаются на моносахариды. Гексозы используются многими организмами и для этого имеются специальные транспортные системы. Пентозы обычно трансформируются в гексозы и глицеральдегид-фосфат. Набор углеводов, используемых микроорганизмами, видоспецифичен и особенно широко применялся для идентификации энтеробактерий.

Белки гидролизуются в пептиды и далее в аминокислоты, поступающие в клетку, где они дезаминируются и превращаются в органические кислоты. Однако часть аминокислот, например аргинин, разлагается своими путями. У анаэробных протеолитических организмов имеются различные пути брожения аминокислот и других органических соединений азота. Конечными продуктами здесь являются аммиак, жирные кислоты, обычно разветвленные, и ацетат.

На органических кислотах многие аэробные бактерии растут очень быстро и охотно. Основным путем их превращений является ЦТК, причем возможность использования в реакциях и катаболизма, и анаболизма обеспечивается дополнительными (анаэробными) метаболическими путями, ключевая роль в которых принадлежит  $C_2$ -соединениям, как ацетил-КоА. Рост на среде с ацетатом может осуществляться за счет ЦТК и реакций глиоксилатного цикла с ключевыми ферментами малатсинтазой и

изоцитратлиазой. Этот путь является основным для использования липидов и углеводов, где ацетил-КоА образуется в реакциях  $\beta$ -окисления. Возможность расти на гликолизате, продукте разложения пуринов, обеспечивается его превращением в ацетил-КоА в гликолатном пути.

Одноуглеродные соединения не могут быть использованы обычным путем, и для перехода к анаболизму требуется превращение их в многоуглеродные соединения, т. е. синтез С-С связи. Поэтому к использованию  $C_1$ -соединений способны только специалисты. Восстановленные  $C_1$ -соединения, как метан и метанол, включаются в обмен после окисления в формальдегид. Последний может вступить в центральный метаболизм либо через рибулозомонофосфатный цикл с образованием гексозо-6-фосфата, либо через сериновый путь с фиксацией формальдегида на глицине и образованием серина. Оксид углерода служит субстратом для карбоксидобактерий, которые окисляют его в диоксид. СО может также включаться в обмен через СО-дегидрогеназу и вступать в путь Льюнгдала-Вуда, или ацетил-КоА путь, свойственный анаэробным гомоацетатным бактериям. У ряда прокариот восстановительный ацетил-КоА путь обеспечивает автотрофную ассимиляцию углекислоты в результате образования из двух молекул  $CO_2$  молекулы ацетата.

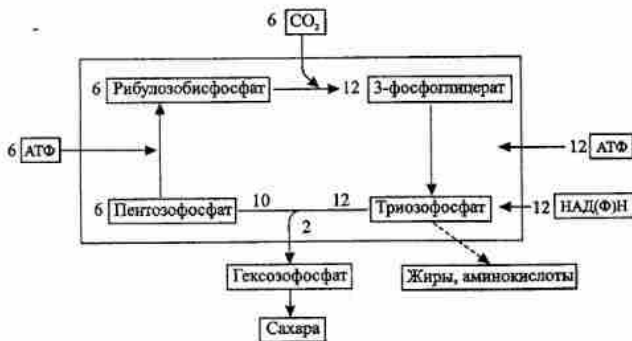
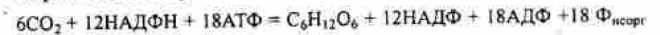


Рис. 15. Схема автотрофной ассимиляции  $CO_2$  (цикл Кальвина)

Подавляющая часть автотрофных организмов ассимилирует  $CO_2$  по *восстановительному пентозофосфатному пути (циклу Кальвина)* с ключевым ферментом рибулозобисфосфат карбоксилазой (рубиско). Этот путь (рис. 15) включает карбоксилирование рибулозобисфосфата с образованием двух молекул трехуглеродного фосфоглицерата и последующие циклические превращения фосфатов сахаров с регенерацией рибулозобисфосфата, и в конечном итоге выходом из цикла молекулы глюкозы. Цикл Кальвина работает с потреблением 18АТФ и 12НАДФН:



Некоторые автотрофы, например *Hydrogenobacter (Calderobacterium)* или зеленая серная бактерия *Chlorobium*, используют для автотрофной ассимиляции  $CO_2$  восстановительный ЦТК. У автотрофных организмов анаболические реакции отделены от катаболических. Чтобы блокировать сгорание органического вещества, ЦТК у автотрофов часто бывает разорван и служит лишь для синтеза предшественников.

Суммируя, надо сказать, что каждая функциональная группа бактерий может быть охарактеризована свойственным ей путем обмена. В свою очередь, для каждого пути обмена существуют характерные ферменты или комбинации ферментов, измеряя активность которых можно определить функционирование этого пути. Ферменты представляют собой специфические белки, структура которых кодирована в ДНК определенной последовательностью нуклеотидов, составляющих ген. Отсюда есть возможность определить *потенциальную* способность к осуществлению тех или иных реакций по анализу ДНК в чистой культуре или даже в суммарной ДНК сообщества. Такой подход сейчас широко развивается на основе *геновых проб* на определенные гены.

С другой стороны, значительная часть метаболических путей, в особенности направленных на биосинтетические нужды, универсальна и соответствующие ферменты и гены могут быть обнаружены у широкого круга организмов.

Блок цитоплазмы связан с генетическим аппаратом клетки посредством регуляторных и/или сигнальных путей, которые определяют экспрессию синтеза ферментов в процессе адаптации. Блок цитоплазмы связан с мембранным аппаратом, а через него с внешней средой — процессами транспорта.

## 5. РИБОСОМЫ И СИНТЕЗ БЕЛКА

### 5.1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА

ДНК сама по себе представляет инертную молекулу и должна быть таковой по своей природе. Поэтому утверждение «жизнь — это ДНК» следует воспринимать очень и очень осторожно. Для того чтобы информация, заложенная в ДНК, превратилась в жизненные функции, она должна быть превращена в действия, которые по частям представлены активностью белков-ферментов, а в полной мере — размножающимся организмом.

Переход представляет собой экспрессию генетической информации и осуществляется в два этапа. На первом действует аппарат РНК, включающий *транскрипцию* с ДНК на РНК с помощью РНК-полимеразы и *трансляцию* с РНК, с помощью рибосомы, в белки. Именно эти последние и используются для образования как конститутивных компонентов клетки, в том числе клеточных структур, так и ферментов, необходимых лишь на определенных этапах клеточного цикла или при адаптации. Действие РНК-полимеразы основано на матричном копировании необходимого участка ДНК (гена или группы связанных генов — оперона) в одностороннюю нить матричной РНК (мРНК), которая переносится затем к рибосоме, точнее, рибосомы нанизываются на нить мРНК с образованием полирибосомы. Синтез белка осуществляется путем присоединения в рибосоме молекулы транспортной РНК (тРНК) с аминокислотой к соответствующему участку на нити мРНК с образованием полипептидной цепи, соответствующей последовательности нуклеотидов мРНК.

Между аминокислотами и основаниями существует «генетический код», в котором каждой аминокислоте соответствуют кодоны, содержащие три нуклеотида. Существование генетического кода позволяет согласовывать последовательность аминокислот в продукте синтеза с определенной последовательностью оснований.

РНК синтезируется на матрице ДНК посредством фермента *РНК-полимеразы*, использующего макроэргические нуклеозидтрифосфаты АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ, с отщеплением двух фосфатов. У эубактерий, архебактерий и эукариот РНК-полимеразы различаются. РНК-полимераза состоит из четырех субъединиц и  $\sigma$ -фактора, обеспечивающего распознавание участка старта. Свя-

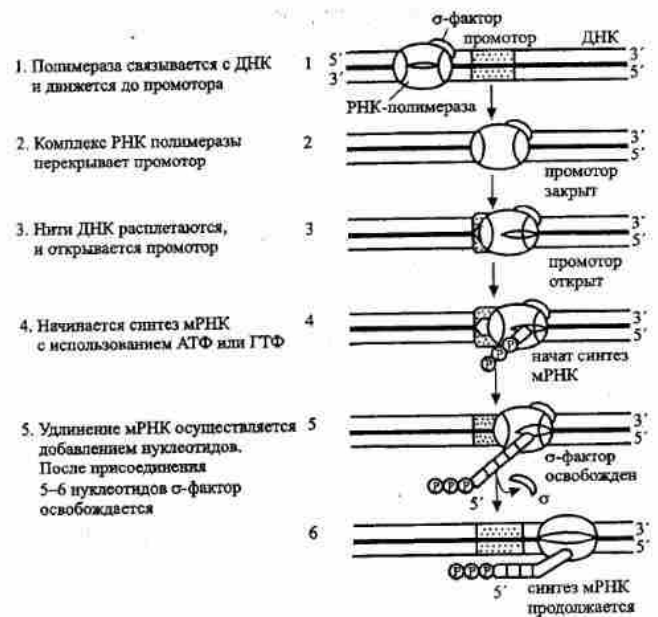


Рис. 16. Действие РНК-полимеразы (по J. Perry, J. Staley, 1997)

зывание начинается с участка, называемого *промотором* (рис. 16). Двойная нить (дуплекс) ДНК в этом месте расплетается, и считывается лишь одна нить. Синтез мРНК требует затраты одного эквивалента АТФ на нуклеотид. Промотор может начинать отдельный ген или же комбинацию генов для ферментов, объединенных общей функцией, — оперон. В конце гена или оперона располагается стоп-сигнал, позволяющий РНК-полимеразе отделиться.

Нить ДНК бактерий в этот момент напоминает «ламповый ерш» с висящими на ней мРНК, и это состояние можно увидеть на электронных фотографиях, где нити нуклеиновых кислот, благодаря фосфатам, видны как темные участки. На нити мРНК, еще не отделившейся от ДНК, может уже начинаться синтез белка благодаря присоединению к ней рибосом.

ДНК эукариот расположена в ядре, и действие РНК-полимеразы требует решения проблем транспорта внутри компартиментализованной клетки довольно больших размеров. У эукариот гены состоят из кодирующих участков, *экзонов*, и разделены некодирующими — *интронами*. Образованная в ядре мРНК претерпевает *процессинг* (созревание), при котором, в частности, из нее удаляются некодирующие участки, и лишь затем она поступает для синтеза белка в рибосомы. Все это обуславливает значительное усложнение элементарного процесса.

## 5.2. РИБОСОМЫ И ТРАНСЛЯЦИЯ (СИНТЕЗ БЕЛКА)

Преобразование информации в активный белок фермента происходит в рибосоме и представляет центральный момент экспрессии гена. Рибосомы состоят из двух субъединиц, образующих довольно крупные структуры, по форме напоминающие цифру «8». Рибосомы митохондрий и хлоропластов оказались сходными с рибосомами соответственно бактерий и цианобактерий, что послужило основным аргументом в пользу гипотезы образования эукариотной клетки, как химеры в результате эндосимбиоза. Рибосомы, расположенные в цитоплазме эукариотической клетки, и рибосомы прокариот различаются. Различия между ними представлены ниже (S — так называемый коэффициент седиментации, характеризующий скорость осаждения в центрифуге):

Свойства рибосом	Прокариоты	Эукариоты (в цитоплазме)
Общие размеры	70S	80S
Малая субъединица	30S	40S
размер РНК	5S	5S
(число нуклеотидов)	(120)	(120)
	16S	18S
	(1500)	(2000)
Большая субъединица	50S	60S
размер РНК	23S	28S
(число нуклеотидов)	(3000)	(5000)

Выделенная жирным шрифтом 16S рРНК и соответствующий ей ген 16S рДНК послужили базой для современной филогенетической классификации бактерий на основе установления последовательностей нуклеотидов. Очень полная картина степени сходства

рибосом послужила для построения универсального филогенетического дерева жизни. Вполне ли отражает она эволюцию организмов, геном которых может быть образован комбинаторно, — отдельный вопрос, который обычно стараются не обсуждать.

Передача информации, закодированной в мРНК, к рибосоме и аминокислотам осуществляется с помощью тРНК, изображения которой напоминают клеверный лист или карточный знак «треф». На «ножке» находится акцептор аминокислоты, а на противоположном конце петля антикодона, распознающая кодон на мРНК. Одна боковая петля (*T*) предназначена для связывания с рибосомой, а другая петля (*D*) — для связывания с ферментом (аминоацил-тРНК синтетазой).

Реакция начинается активацией аминокислоты под действием аминокислот-тРНК синтетазы с последующим присоединением активированной аминокислоты к тРНК:

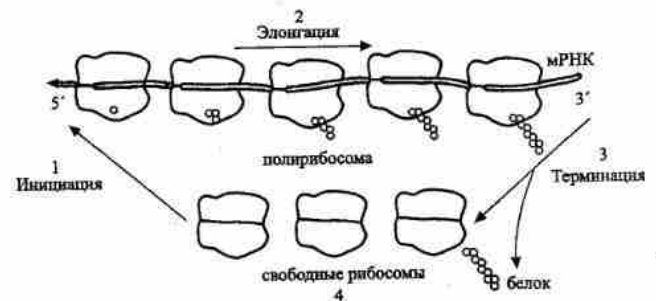
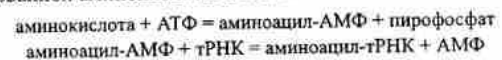


Рис. 17. Трансляция (по А. С. Спирину, 1999)

1. Свободная рибосома соединяется с мРНК у начала кодирующей последовательности на иницирующем кодоне (*инициация*). 2. Считывание кодирующей последовательности по триплетам нуклеотидов в направлении от 3' к 5' концу мРНК с последовательным присоединением по одной аминокислоте (*элонгация*). 3. Дойдя до стоп-кодона, рибосома прекращает трансляцию и освобождает полипептид (*терминация*). 4. Свободные рибосомы готовы вступить в новый цикл. После инициации рибосома продвигается по мРНК к 5' концу и освобождает иницирующий кодон, к которому может присоединиться следующая рибосома и т. д. В результате образуется полирибосома — комплекс рибосом, синтезирующих один и тот же белок с одной молекулы мРНК.

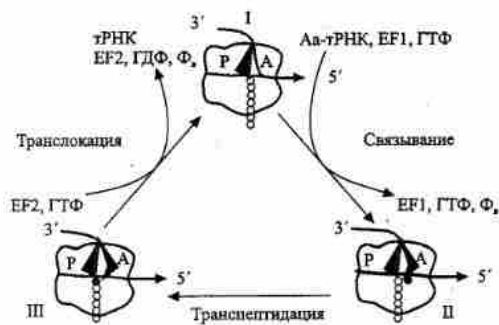


Рис. 18. Элементарный элонгационный цикл — считывание одного триплетного кодона мРНК и образование одной пептидной связи (по А. С. Спирину, 1999)

Рибосома «сидит» на мРНК, удерживая молекулу пептидил-тРНК (I). Когда пептидил-тРНК занимает Р-участок малой субъединицы, рибосома может связывать молекулу аминоацил-тРНК (Аа-тРНК), соответствующую кодону, находящемуся в А-участке. В результате бок о бок оказываются последняя аминокислота синтезируемого пептида и новая аминокислота с тРНК (II). Трансферазный центр на большой субъединице катализирует реакцию образования пептидной связи. В Р-участке остаются деацилированная тРНК, а в А-участке — тРНК с удлиненной пептидной цепочкой (III). После этого деацилированная тРНК выталкивается из рибосомы, а пептидил-тРНК перемещается в Р-участок. В результате в А-участке устанавливается следующий кодон мРНК. Связывание аминоацил-тРНК катализируется фактором элонгации EF-1 с участием ГТФ, а транслокация — фактором элонгации EF-2 с ГТФ. Каждый шаг элонгации требует затраты ГТФ. Основная роль ГТФ — каталитическая, а не термодинамическая.

Синтез белка на рибосоме включает этапы: инициацию, элонгацию и терминацию (рис. 17). Свободные 30S и 50S субъединицы рибосом объединяются с мРНК и тРНК в иницирующий комплекс при участии белков-факторов инициации.

Синтез белка начинается со стартового кодона с формилметионин-тРНК. Далее происходит присоединение аминоацил-тРНК и движение рибосомы по нити мРНК с образованием пептидной связи между последовательно присоединяющимися аминокислотами — элонгация (рис. 18, 19).

Малая субъединица имеет два участка связывания: А-участок — аминоацил-тРНК-связывающий (для поступающих аминокислот); Р-участок — аминоацилпептидил-тРНК-связывающий (для синтезируемой полипептидной цепочки). Свободный А-участок имеет

кодон мРНК, соответствующий следующей по порядку аминокислоте, и связывается с аминоацил-тРНК, имеющей соответствующий антикодон. Далее происходит реакция пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК, расположенных рядом на рибосоме. Следующий шаг приводит к разведению тРНК и выбрасыванию ее из рибосомы, а удлиненная на одну аминокислоту пептидил-тРНК перемещается на одну позицию относительно мРНК под действием большой субъединицы.

По мере выхода из рибосомы полипептидная цепочка сворачивается, приобретая структуру, необходимую для проявления ферментативной активности. Наконец завершается синтез по достижении стоп-кодона стадией *терминации* — отделения цепочки от рибосомы. Весь процесс можно осуществить *in vitro* (бесклеточный синтез белка), но система очень сложная.

Благодаря различиям в строении рибосом эубактерии, архебактерии и эукариоты обнаруживают разную чувствительность к антибиотикам — ингибиторам синтеза белка. Это позволяет, в частности, применять антибиотики, действующие на эубактерии, для селективного накопления архебактерий.

Рассмотренные механизмы синтеза белка универсальны для всех живых существ. Ознакомившись с ними, полезно ответить себе на вопрос, действительно ли «жизнь — это ДНК»?

Для целей природоведческой микробиологии, которая начинает построение своей логики с целого организма, а не его частей, наибольший интерес представляют не универсальные процессы, а те этапы, которые ответственны за формирование функциональных различий как между организмами, так и разными состояниями одного организма. Последнее тесно связано с адаптацией. Она обусловлена экспрессией или репрессией генов, т. е. синтезом или же прекращением синтеза ферментативных белков.

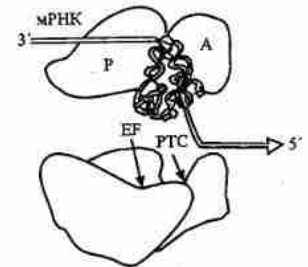


Рис. 19. Расположение функциональных центров на субчастицах рибосомы (по А. С. Спирину, 1999). Цель мРНК связана с малой субъединицей между участками Р и А. Две молекулы тРНК на Р- и А-участках связаны своими антикодонами со смежными кодонами мРНК. Пептидилтрансферазный центр РТС и факторы элонгации EF располагаются на большой субъединице.

## 6. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

### 6.1. ГЕНОМ

Генетическая информация записана в виде пар нуклеотидов на двойной спирали ДНК. Блок информации, соответствующий какому-либо свойству или признаку, обозначают как *ген*. Полный набор генов называется *геномом*. Геном бактерий включает несколько тысяч генов, расположенных линейно на макромолекуле ДНК, называемой *хромосомой*. У прокариот имеется одна кольцевая хромосома на клетку (за исключением организмов, у которых не произошло деление и образовались, например, нитчатые формы), не отделенная от цитоплазмы мембраной и видимая на ультратонких срезах в виде клубка нитей в светлом пространстве (нуклеоида). У эукариот нити ДНК представляют сложные образования, так же называемые хромосомами, которых может быть много на клетку. Хромосомы эукариот отделены от цитоплазмы ядерной мембраной, образуя ядро. Цитологическое различие в строении генетического аппарата является основным в разграничении прокариот и эукариот, остальные признаки служат либо дополнительными, либо коррелирующими. Помимо хромосомы, у прокариот могут присутствовать небольшие кольцевые молекулы ДНК, называемые *плазмидами*, которые не являются обязательными для генома данного вида. Плазмиды варьируют по величине и по численности в клетке от одной до многих десятков. Крупные плазмиды могут содержать сотни генов. Плазмиды относятся к экстрахромосомным носителям генетической информации.

Нуклеиновые кислоты представляют простые молекулы в виде нити из пентоз (дезоксирибоз для ДНК и рибоз для РНК), соединенных фосфодиэфирной связью. К остаткам пентоз присоединены азотистые основания — пурины, аденин (*A*) и гуанин (*G*), и пиримидины, цитозин (*C*) и тимин (*T*). Нить может оканчиваться либо фосфатом (*5'* конец), либо пентозой (*3'* конец).

Согласно правилу Чаргаффа, отношение между основаниями в ДНК строго стехиометрическое, но число пар Г + Ц или А + Т может варьировать. По числу преобладания тех или иных пар различают организмы с высоким или низким молярным содержанием ГЦ (ГЦ, моль %), величина которого обычно приводится

для вида. Молекула ДНК представляет двойную нить, в которой пары оснований располагаются строго друг против друга (А:Т, Г:Ц) и связаны водородными связями, приводящими к строению молекулы в виде «двойной спирали Уотсона-Крика». Генетическая информация определяется *линейным порядком* расположения оснований, их *последовательностью*. Техническая операция установления последовательности называется *секвенированием* и представляет сейчас важнейший технический метод молекулярной биологии. Геном содержит исчерпывающую характеристику организма и для бактерий имеет величину  $n \cdot 10^6$  пар оснований (п. о.), в типичном случае около 5 млн п. о. Общая длина хромосомы составляет примерно 1 мм и, чтобы упаковать ее в нуклеоид размерами 0,1–0,5 мкм, двойная нить сворачивается определенным образом.

*Репликация ДНК* представляет полуконсервативный процесс, в котором дочерние клетки получают по одной нити материнской и одной нити вновь синтезированной ДНК. Репликация хромосомы начинается в участке, называемом *oriC* (от англ. origin), присоединением белковых факторов инициации. Это сопровождается расплетением двойной спирали ДНК с образованием двух репликативных вилок, на каждой из которых начинается встречный синтез второй нити. Для синтеза существует сложный ферментный аппарат, обеспечивающий расплетение нитей (ДНК-гираза или топоизомераза), хеликаза, праймаза с праймером РНК, ДНК-полимераза I и ДНК-полимераза III. Их комплекс получил название реплисомы (рис. 20, 21). Для ее функционирования необходимо поступление предшественников в виде праймеров РНК, в свою очередь образуемых из пентоз, оснований, АТФ — из цитоплазмы и ферментов — из рибосомального аппарата.

Следующий этап представляет коррекцию считывания, заключающаяся в удалении ошибочно вставленных оснований и замене их на правильные, а также модификация ряда оснований. Материнская нить ДНК имеет метилированные основания, а вновь синтезированная — нет. Коррекцию осуществляют ДНК-полимеразы I и III. Точность репликации ДНК очень высока и ошибки составляют менее  $10^{-9}$ . Для устранения повреждений в результате внешних воздействий, например радиационных, существуют системы репарации.

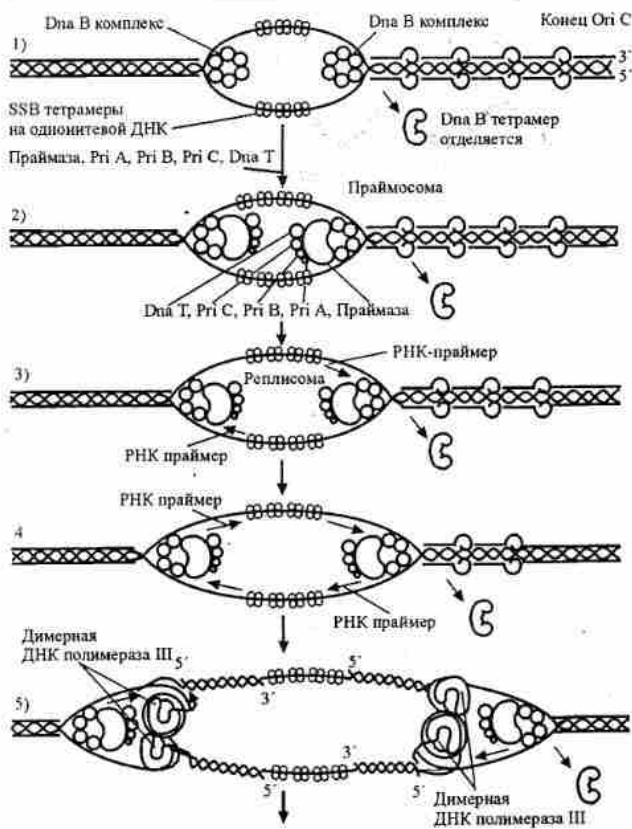


Рис. 20. Реплисома (по J. Perry, J. Staley, 1997)

Образование на двойной нити кольцевой хромосомы прокариот двойной вилки включает следующие этапы: 1) — удаление тетрамеров белка Dna B с дуплекса ДНК у конца места начала репликации Ori C; 2) в месте вилки симметрично присоединяется праймаза с несколькими белками (Pri A, Pri B, Pri C, Dna T); 3, 4) праймер РНК синтезируется праймазой для каждой нити ДНК; 5) — присоединяется димерная ДНК-полимераза III.

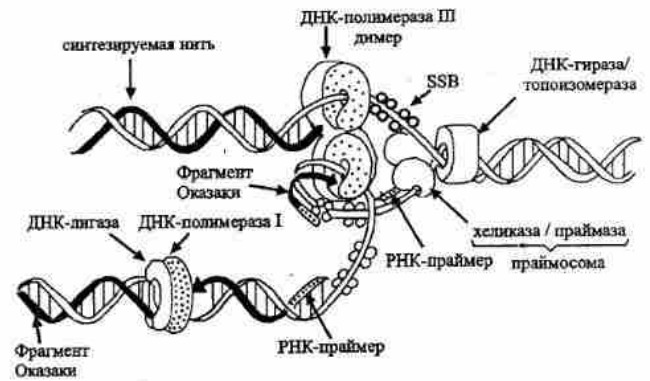


Рис. 21. Действие реплисомы (по J. Perry, J. Staley, 1997)

Дуплексы ДНК расплетаются ДНК-гиразой и хеликазой. Однонитевые участки покрываются дестабилизирующими SSB-белками. В промежутки добавляются праймеры РНК. Димерная ДНК-полимераза III связана с нитью скользящим затвором и добавляет нуклеотиды к 3' концу ведущей нити. К ведомой нити добавляется фрагмент Оказаки. ДНК-полимераза I и ДНК-лигаза удаляют праймеры, заменяя их соответствующими нуклеотидами.

Наиболее общим механизмом исправления ошибок служит вырезание поврежденного участка и репарация пробела комплементарно сохранившейся нити. Эндонуклеаза гидролизует фосфатные связи на несущей мутацию нити, а затем ДНК-полимераза I восстанавливает пробел. Распознавание поврежденных участков осуществляет SOS-система, вступающая в действие, когда вилка репликации попадает на поврежденное место.

Для ряда бактерий, преимущественно патогенных, составлены полные кольцевые карты ДНК с указанием расположения на них генов. Наиболее подробно изучена *Escherichia coli*, с которой сравнивают обычно все остальные бактерии. Важно отметить, что последовательности нуклеотидов дают точную характеристику вида организма для его идентификации, сравнимую с номером паспорта, но содержащую также и всю функциональную информацию, которую, однако, нужно уметь прочитать.

Одной из важнейших функций клетки служит защита от инородной информации. Для этого клетка обладает мощной и очень активной ДНКазой, гидролизующей инородную ДНК, не находящуюся в клетке в виде кольцевых молекул. Обмен генетической информацией предполагает обходные пути для преодоления этого барьера.

## 6.2. ОБМЕН ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ И ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

Прокариоты не имеют полового процесса в отличие от эукариот, у которых происходит объединение геномов двух разных организмов с обменом генетическим материалом. Для прокариот возможен лишь частичный обмен участками генома, и то в строго ограниченных пределах. В этом принципиальное различие прокариот и эукариот.

Основу изменчивости принято искать в мутационном процессе, который, однако, нередко ведет к потере гена и соответствующего признака. Тем не менее считается, что мутационный процесс является движущей силой эволюции. Другой путь изменения генома основан на перераспределении генетической информации комбинаторным путем между носителями разных функций. Это осуществляется путем *генетической рекомбинации*.

При гомологичной рекомбинации два генома обмениваются отрезками ДНК. Причиной для обмена служит разрыв одной нити ДНК, происходящий либо случайно, либо под действием специального комплекса ферментов, обозначаемых Rec, которые расплетают двойную спираль и разрезают ее в месте, содержащем последовательность ГЦТГГТЦГ. Образуется одностранный участок ДНК, который связывается со специальными белками и может внедриться в участок двустранивой ДНК реципиента. Затем происходит обмен участками ДНК донора и реципиента. Как видно, необходим физический контакт между двумя дуплексами ДНК. Такая ситуация может возникнуть между двумя плазмидами или плазмидой и хромосомой, или петлей на хромосоме.

При другом типе рекомбинации распознается определенная последовательность на ДНК и к ней пристраивается ДНК донора.

Таков механизм включения генома вирусов в хромосому бактерий. Предполагается, что ДНК донора и реципиента в местах разрезания гомологична, но в промежутке между этими участками она может отличаться.

Организм должен обладать мощными механизмами защиты от проникновения чужеродной информации, если таких механизмов нет, то организм должен переродиться и погибнуть как самостоятельный вид. Уничтожение чужеродной ДНК представляет собой норму самосохранения. В клетке постоянно находятся активные нуклеазы, которые расщепляют как собственные нуклеиновые кислоты, когда они становятся не нужны, так и попавшие в клетку извне. Быстрому расщеплению подвергаются линейные молекулы. Поэтому приобретение генетической информации извне представляет редкое событие.

Защита клетки от чужеродной ДНК осуществляется с помощью *рестрикции*, благодаря действию ферментов эндонуклеаз, расщепляющих нить ДНК. Они обеспечивают стабильность генома. Эндонуклеазы распознают определенные короткие, длиной в 4–6 пар оснований, последовательности и разрезают в этом месте двойную нить чужеродной ДНК. Такие последовательности могут оказаться и в собственной ДНК, и она защищается от самоубийственной рестрикции модификацией ДНК, например, метилированием или введением дополнительного основания. Обмануть систему рестрикции, например при инфекции фагом, удается в том случае, если фаговая ДНК будет сохраняться достаточно долго в хозяине, чтобы подвергнуться модификации. Такой модифицированный фаг окажется высоковирулентным. По своей сути, система рестрикции-модификации видоспецифична и относится к широкому классу явлений гетерофобии, обеспечивающих устойчивость объекта.

Внимание привлекают, однако, именно редкие случаи переноса генетической информации с возникновением новой комбинации. В природных условиях генетическая рекомбинация может приводить к *латеральному переносу генов*, что представляет один из наиболее интересных путей возникновения функционального разнообразия микроорганизмов за счет комбинаторного перераспределения блоков генетической информации.



Генетический обмен между бактериями осуществляется тремя путями: *трансформацией*, когда ДНК из окружающей среды проходит через мембрану в клетку; *конъюгацией*, где переносчиком (вектором) служит плазмида; *трансдукцией*, где переносчиком служат бактериофаги. Если перенесенная ДНК встраивается в хромосому, то затем она наследуется дочерними клетками.

Другой тип подвижных генетических элементов представляют *транспозоны*. Это участки генома, которые могут менять свое положение на хромосоме или же переходить с хромосомы на экстрахромосомные элементы. Транспозоны имеют по концам последовательности для включения (IS — insertion sequence), а в середине может быть заключен любой ген. Перенос обслуживается специальным ферментом. Транспозоны могут быть перенесены на другое место на хромосоме, плазмиде, фаге.

Понимание генетических механизмов в бактериях позволило создать технику *генетической инженерии* — искусственного выделения, умножения, передачи генов. Эта обширная область лежит, однако, вне рассматриваемых здесь проблем природоведческой микробиологии, хотя методы приложения к естественным объектам создают быстро развивающуюся область *молекулярной экологии*, объектом которой служит изучение геномов в природной обстановке, а не организмов. Одним из важнейших приемов служит идентификация генов, точнее, некоторых последовательностей оснований, в исследуемых ДНК.

Короткие участки ДНК можно синтезировать *in vitro*, пользуясь *полимеразной цепной реакцией* (ПЦР, англ. PCR), в которой осуществляется амплификация небольших последовательностей, соответствующих одному или немногим генам. Желаемую последовательность однонитевой ДНК получают из мРНК под действием обратной транскриптазы. Она используется в качестве праймера. Затем двунитевую ДНК объекта нагревают для разрыва дуплекса, добавляют праймер и подвергают действию ДНК полимеразы. Несколько циклов позволяют копии умножиться экспоненциально. Таким способом можно получить желаемый ген или последовательность. Эта методика позволяет обнаружить искомые последовательности в суммарной ДНК, экстрагированной из микробного сообщества в естественном месте обитания. Если

эти последовательности значимы для какой-либо группы организмов, например археобактерий, то можно идентифицировать их присутствие в сообществе.

## 7. АДАПТАЦИЯ

### 7.1. АДАПТАЦИЯ КЛЕТКИ

Приспособление организмов к меняющимся условиям называется адаптацией. В более общем плане под адаптацией понимается реализация потенциальных возможностей, не проявлявшихся в предыдущем состоянии. Представление, что ранее не наблюдавшиеся способности возникают *de novo*, составляли суть «ламаркизма». Возникновение новых способностей связывается только с мутациями или образованием новой комбинации при обмене генетическим материалом. В результате все сводится к комбинаторным перестройкам.

Следует строго различать адаптацию сообщества («адаптивную динамику») или же адаптацию генетически однородной культуры. В природных условиях приспособление микроорганизмов к изменению условий может быть обусловлено сменой видов со сходной функцией.

Для одного вида адаптация может быть связана с гетерогенностью популяции и выделением из нее, или доминированием в ней, группы организмов на субвидовом уровне, для которого разработана своя очень дробная номенклатура. Такой путь адаптации изначально неоднородной группировки организмов всегда связан с *селекцией* и *естественным* или *искусственным отбором*. Не следует рассчитывать на «приучение» чистой культуры микроорганизмов к более жестким условиям или новым субстратам: такие изменения ограничиваются пределами генетически определенной толерантности или полифункциональности организма.

Для отдельной клетки или генетически однородной линии ее потомков термин «адаптация» стараются избегать и заменяют его словом *индукция*, отражающим механизм приспособления. По сути, индукция предполагает экспрессию ранее не использовавшейся

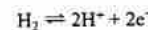
генетической возможности, например синтез нового белка-фермента. Наибольшее значение имеет приспособление микроорганизмов к использованию иного субстрата катаболизма. Суть приспособления состоит в таком превращении субстрата, чтобы продукт стал совместим с центральным метаболическим путем, ведущим к синтезу биомассы и получению энергии, например, с образованием из исходных веществ ацетата. Эти этапы, как уже говорилось, получили название подготовительного метаболизма. Некоторые группы бактерий обладают очень широкими возможностями в использовании новых субстратов. Такие организмы называются *политрофами*. Примером их могут служить псевдомонады, способные расти на любом из сотен органических веществ как единственном источнике углерода и энергии. Противоположный полюс занимают *монотрофы* — высокоспециализированные организмы, использующие единственный субстрат или немногие его производные. В качестве примера такой группы можно назвать метанотрофов. Вместо слова «монотроф» для высокоспециализированного вида организмов часто употребляют определение «облигатный».

Переход от одного субстрата к другому требует синтеза ферментов, которые ранее не экспрессировались. Ключевыми в приспособлении служат два процесса: 1) регуляция активности уже существующих в клетке ферментов и 2) синтез новых ферментов. В обоих случаях клетка действует как целостная система, обладающая свойствами, отсутствующими у отдельных ее компонентов. Часть приспособительных процессов прямо вытекает из организации клетки как сложной системы, но часть обусловлена специальными механизмами.

Регуляция обмена в клетке обеспечивает быстрый ответ на изменившиеся состояния. Простейшим механизмом регуляции служит отрицательная обратная связь, обусловленная накоплением продукта обмена, которое ведет к сдвигу в равновесии реакции по закону действующих масс. Ряд ферментов катализирует установление равновесия обратимых реакций. Примером может служить фермент карбоангидраза, ускоряющая установление равновесия реакции



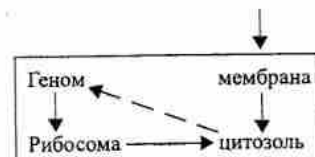
необходимой для транспорта через мембраны углекислоты внутрь клетки при автотрофном обмене или из клетки при органотрофном. Другой пример дает фермент гидрогеназа, катализирующая обратимую реакцию:



Накопление  $\text{H}_2$  ведет к блокированию процессов окисления в клетке и накоплению восстановленных интермедиатов. Обмен разблокируется, если  $\text{H}_2$  удаляется из внешней среды, например, гидрогенотрофным организмом.

Отрицательная обратная связь наблюдается и в многоступенчатых путях синтеза, но осуществляется более сложным способом ретроингибирования, причем конечный продукт цепи ингибирует фермент первого этапа. Достигается это аллостерическим ингибированием. Фермент имеет два связывающих центра: один для начального субстрата цепи реакций и другой — для конечного продукта. Накопление конечного продукта приводит к его связыванию ферментом и такому изменению конформации белка, что становится невозможным связывание нормального субстрата.

Адаптация, ведущая к экспрессии новых генов и синтеза белков-ферментов, предполагает существование *сигнальных путей* метаболизма и регуляторной петли между цитозолем, геномом, рибосомой, как изображено на следующей схеме пунктиром:



Очевидно, что сигнальные пути специфичны по включению определенных генов и их экспрессии в виде энзиматически активных белков. Такие белки составляют динамичный *протеом* клетки — сумму белков, находящихся в настоящий момент в действии. Внешние сигналы поступают в клетку через мембрану, где располагаются акцепторы сигналов, индуцирующих изменения протеома.

## 7.2. ИНДУКЦИЯ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Индукция проявляется по появлению новой активности, ранее не обнаруживавшейся. Критическими для понимания индукции послужили работы Ж. Моно (J. Monod), доказавшего, что индукция связана с синтезом нового белка, а не с активацией предсуществующих в клетке ферментов. Обратный процесс связан с репрессией синтеза. Общая схема индукции представляется следующим образом. На геноме выделяется оперон — участок, ответственный за синтез группы взаимосвязанных функционально генов. В начале участка располагается промотор, с которым соединяется РНК-полимераза, за ним следует оператор, далее последовательно функциональные гены оперона. С оператором может связываться белок-репрессор, соединенный с маленькой молекулой — корепрессором. Репрессор блокирует возможность перемещения РНК-полимеразы по цепи ДНК и синтеза мРНК, которая поступает к рибосомам. Удаление корепрессора приводит к отделению репрессора от оператора и освобождает путь для синтеза. Индукция предполагает связывание индуктора с репрессором и освобождение пути для синтеза.

Важнейшим примером регуляции синтеза ферментов на уровне транскрипции является катаболитная репрессия, позволяющая клетке в первую очередь использовать наиболее выгодный энергетический субстрат. Связывание РНК-полимеразы с участком ДНК происходит под действием так называемого белка CAP (Catabolite Activator Protein; белок, активируемый катаболитом), который сначала связывается с циклическим АМФ (цАМФ), синтезируемым из АТФ. Уровень цАМФ в клетке определяет репрессию. Связывание цАМФ с CAP обуславливает присоединение РНК-полимеразы к ДНК с последующим синтезом фермента.

Отдельно от синтеза ферментов путей метаболизма следует рассматривать синтез компонентов транспортных систем, обуславливающих не только транспорт вещества в клетку, но и средство клетки к субстрату, определяющее конкурентоспособность организма в данных условиях в отношении субстрата. Другой случай представляет синтез белков, обеспечивающих адаптацию к стрессовым воздействиям, например белков теплового шока.

Изложенное показывает, что клетка как целостная система обладает такими свойствами, которые отсутствуют у ее компонен-

тов. Поэтому совершенно необосновано пытаться сделать заключение о возможной роли какого-либо фермента в природных условиях на основании изучения биохимии, перескочив через клеточную систему, а тем более от генома к функции без обсуждения условий экспрессии. Для понимания действия организма в среде его достаточно рассматривать как «черный ящик» с некоторыми функциями, существенными для системы «организм — среда обитания». Эти функции описываются физиологией организма и именно на них необходимо опираться в понимании роли его в природе. Вместе с тем проявление этих функций обусловлено биохимическими механизмами, о которых нужно иметь общее представление. В область знаний общих микробиологов входит именно физиология, включая определение активностей ключевых для клеточной системы ферментов и факторов.

## 7.3. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

Помимо проявления энзиматической активности, например, в связи с использованием нового субстрата или же синтезом белков теплового шока в ответ на изменение температуры, или же осморегуляторов в ответ на изменение минерализации во внешней среде, клетки прокариот обладают способностью к дифференциации, которая часто упускается из виду при рассмотрении морфогенеза прокариот как результата деления клетки на две сестринские. Примерами дифференциации могут служить: переход к формированию покоящихся стадий, например цист, спор, конидий или подвижных стадий у прикрепленных организмов как гифомикробы и каулобактеры; образование плодовых тел у миксобактерий; сложная последовательность форм у цианобактерий.

### 7.3.1. Образование эндоспор

Наиболее пристально было изучено спорообразование, представляющее деление клетки, при котором одна клетка образует отмирающий спорангий, а вторая превращается в переживающую устойчивую эндоспору. Образование эндоспор свойственно преимущественно грамположительным бактериям, из которых аэробные получали название *Bacillus*, а анаэробные — *Clostridium*.

Сейчас их номенклатура усложнилась в связи с установленными филогенетическими различиями внутри этих родов, так что таксоны превратились в групповое обозначение кластридий и бацилл. Кроме того, найдены некоторые грамотрицательные спорообразующие бактерии, как *Sporomusa*, члены сем. *Haloanaerobiaceae*. Подробно изучен геном *Bacillus subtilis*, для которого имеется полная последовательность ДНК.

Цикл спорообразующих организмов включает две стадии: вегетативных клеток, которые размножаются и вполне подобны неспорообразующим бактериям, и не размножающихся переживающих стадий — спор. Споры отличаются от вегетативных клеток наличием оболочек, содержащих дипиколиновую кислоту. Поэтому в фазовом контрасте они опознаются как блестящие тела на фоне темных вегетативных клеток. В споре различают мембранный экзоспориум, иногда с прикрепленными газовыми везикулами, стенку с модифицированным пептидогликаном, кортекс, и в центре располагается обезвоженный ядерный материал с дипиколиновой кислотой и ионами  $Ca^{2+}$ . Зрелые споры хорошо выдерживают нагревание до 80 °С, и это служит методом отделения спорообразующих от неспорообразующих организмов. Устойчивость спор варьирует у разных видов, и есть чрезвычайно резистентные формы. В жизненном цикле спорообразующих организмов следует рассматривать, во-первых, переход к спорообразованию, обычно индуцируемый истощением питательного субстрата, и, во-вторых, прорастание спор. Спорообразование включает деление генома, окружение одной дочерней хромосомы мембраной внутри материнской клетки-спорангия, сохраняющей обмен и подвижность, свойственные вегетативным клеткам. С окружения части клетки с хромосомой мембраной начинается стадия проспоры с формированием оболочек споры. Затем клетка-спорангий лизируется. Зрелая спора может сохраняться десятки лет, не теряя жизнеспособности.

Наиболее примечательным свойством споры служит ее способность к прорастанию в благоприятных условиях. Несмотря на заторможенный обмен, спора сохраняет способность чувствовать внешние сигналы, в том числе химические. Одним из способов вызвать прорастание служит нагревание спор до 60 °С. При прорастании спора теряет блеск, ее оболочка лизируется и из споры

выходит вегетативная клетка, приступающая к активному росту. В результате спорообразующие организмы оказываются колонизаторами, способными к быстрому освоению свежего субстрата.

### 7.3.2. Некультивируемое состояние

Методы молекулярно-генетической идентификации организмов в естественных условиях выявили значительное превышение числа организмов в природе над тем, которое обнаруживается высевом на питательные среды по числу к. о. с. (колониеобразующих единиц).

Организмы, которые не прорастают на обычно пригодных для них средах, получили название «некультивируемых форм бактерий (НФБ), или VBNC (viable but non culturable). Эта категория относится к физиологическому состоянию известных организмов, а не организмам, для которых не подобраны методы культивирования.

Некультивируемые бактерии составляют значительную часть микробного населения. Так, в водоеме из числа клеток, обнаруживаемых прямым счетом на мембранных фильтрах, не более 8% обнаруживало способность восстанавливать ионы тетразолия и, следовательно, обладали дыхательной активностью. Вне зависимости от использованного субстрата число клеток, определявшихся по росту в разведениях, составляло лишь менее 7%. В то же время до 58% клеток на фильтрах делилось и относилось не только к живым, но и растущим. Вывод состоит в том, что расти в искусственных средах может только небольшая часть популяции. Культивирование вносит систематическую ошибку не только в понимание биоразнообразия, но и в понимание физиологического состояния организмов.

Некультивируемое состояние аналогично переходу в анабиоз. Оно вызывается перенесением организмов в природные условия, например, в морскую воду или почву, с недостатком питательных веществ. Происходит перестройка клетки, в которой участвуют гены «голодного стресса», резко снижается метаболизм, энергетический заряд (доля АТФ), мембранный потенциал. Выход из некультивируемого состояния возможен, но механизм его не расшифрован.

### 7.3.3. Прикрепленное состояние (биопленки)

В естественных условиях микроорганизмы образуют естественные ансамбли либо в виде микроколоний из однородных организмов, погруженных в общую слизь, либо в виде обрастаний твердых поверхностей. Первые работы были проведены на так называемых стеклах обрастания Н. Г. Холодным и потом подробно документированы К. Маршаллом (K. Marshall) и Д. Г. Звягинцевым. Процесс прикрепления начинается с сорбции клеток, причем важную роль играют гидрофобные взаимодействия. Ряд организмов имеют специальные приспособления для прикрепления: прикрепительные диски на конце стебелька у каулобактеров, полярные ансамбли нитевидных придатков — пилей у многих палочковидных бактерий, часто образующих звездчатые агрегаты. После первоначального прикрепления пионеров заселения поверхности начинается выделение полисахаридов слизи, к которой могут прикрепляться организмы других видов, создавая мозаичную структуру из разнородных микроколоний, осуществляющих взаимодействие между собой.

Прикрепленные организмы находятся в ином физиологическом состоянии, чем одиночные, часто подвижные, благодаря наличию жгутиков, клетки стадии расселения, и претерпевают физиологическую дифференцировку. Прикрепление осуществляется адгезинами и контролируется генетически. Белки клеточной стенки прикрепленных бактерий отличаются от таковых у клеток, находящихся во взвешенном состоянии, иногда на 40%. Здесь действуют механизмы социального поведения бактерий, связанные с плотностью популяции организмов и до некоторой степени моделированные при изучении колоний. В таких колониях наблюдается гомоморфная дифференциация, обусловленная прежде всего разным притоком питательных веществ к клеткам на краю колонии и в глубине. При этом может происходить образование «шварма» — клеток, координированно движущихся в виде роя по поверхности субстрата. Особенно это характерно для обширной группы скользящих бактерий, хотя «роение» наблюдается и у бактерий, образующих жгутики, например *Proteus*.

Плотность популяции обуславливает действие социальных факторов, получивших название «чувства кворума» (quorum sen-

sing). Бактерии секретируют в среду сигнальные молекулы, концентрация которых прямо зависит от плотности популяции. В качестве таких сигнальных молекул у грамотрицательных организмов выступают N-ацил-L-гомосеринлактоны, образование которых контролируется соответствующим опероном. По достижении пороговой концентрации молекулы-сигнала популяция реагирует координированным образом. На поверхности клетки находятся сенсорные участки, а в мембране находятся исполнительные компоненты, в роли которых чаще всего выступает гистидинкиназа. Внешние участки разнообразны и могут связываться с различными сигнальными молекулами. После связывания происходит автофосфорилирование по гистидину, с которого фосфат переходит на аспарагиновый остаток другого белка, выступающего как активатор или репрессор транскрипции. У грамположительных организмов роль сигнальных молекул играют пептиды. Под их действием может происходить дифференциация, например, образование воздушного мицелия, споруляция у стрептомицетов.

Более сложную картину по сравнению с чистыми культурами можно ожидать в гетерогенных микробных сообществах, где помимо очевидных трофических связей действуют разнообразные сигналы как видоспецифичные, так и группового действия. Их значимость возрастает для плотных популяций, таких как биопленки с концентрацией клеток порядка  $10^9 \text{ см}^{-3}$ . Здесь можно ожидать мозаичной картины и с одним характером взаимодействий внутри микроколонии, и с другим — между микроколонирами разных видов.

## 8. РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Под понятием роста подразумевается увеличение биомассы, независимо от того, происходит ли при этом увеличение численности организмов или нет. Типичным примером роста служит рост мицелия гриба, происходящего из одной единственной споры и сохраняющего, хотя бы теоретически, способность к интегральной реакции, например, при переходе к спорообразованию или образованию плодовых тел. Для одноклеточных организмов

рост и размножение приблизительно совпадают и означают увеличение численности. Поэтому в бактериологии обычно пользуются словом «рост», хотя это и не совсем точно. Размножение бактерий происходит путем удвоения. Это представление ограничено приложимо к почкующимся бактериям, например, гифомикробам или планктомицетам, а также многоклеточным организмам, трихомным цианобактериям или мицелиальным актиномицетам.

### 8.1. КЛЕТочный ЦИКЛ

Клеточный цикл размножения бактерий осуществляется путем бинарного деления. При этом все компоненты клетки распределяются между сестринскими клетками поровну. Исключение составляет хромосома, которая находится одна в каждой клетке. Репликация хромосомы начинается с образования двух вилок, на которых идет синтез навстречу друг другу комплементарных нитей. Скорость процесса составляет приблизительно тысячу пар оснований в секунду и для хромосомы длиной в 1 мм он занимает примерно 40 мин. При более быстром размножении на хромосоме возникает несколько вилок, как только освобождается место инициации. Образование перегородки между клетками и их разъединение начинается после завершения расхождения хромосом и требует еще около 20 мин. Вариации в процессе разъединения приводят к образованию разного вида агрегатов клеток в виде цепочек, нитей, трихомов, мицелия, объединений кокковидных клеток.

### 8.2. РАЗМНОЖЕНИЕ ПОПЯЦИИ

Размножение делением надвое описывается простой формулой

$$N_t = N_0 \cdot 2^n,$$

где  $N_t$  — конечная;

$N_0$  — начальная численность биомассы;

$n$  — число удвоений за время  $t$ .

$$\text{Отсюда } n = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{\lg 2}$$

или приближенно  $n = (\lg N_t - \lg N_0) \cdot 3,32$

Время удвоения или генерации составляет  $t/n$ .

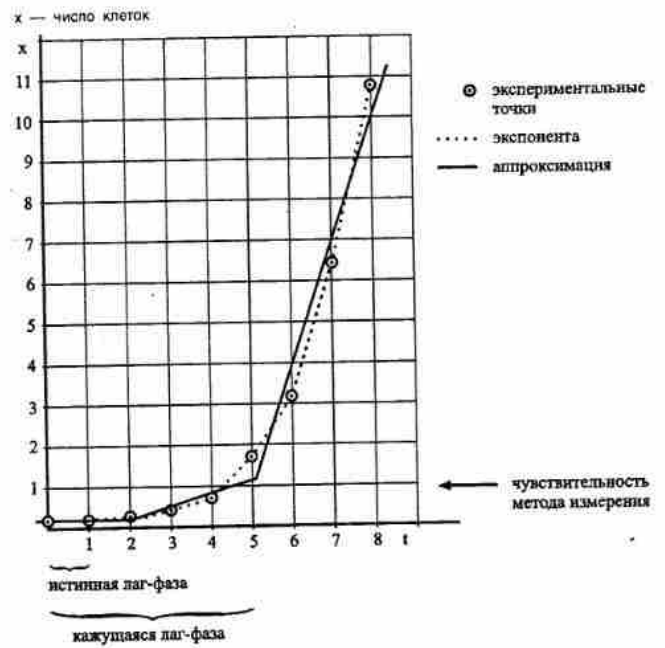


Рис. 22. Аппроксимация экспоненциального роста прямыми

Если изобразить этот процесс на графике, то получается кривая экспоненциального роста, которая в полулогарфмических координатах  $\lg N/t$  превращается в прямую. На практике экспоненциальный рост может быть аппроксимирован двумя прямыми по трем точкам (рис. 22) и воспринимается как пороговое событие с внезапным переходом в состояние насыщения по достижении максимальной плотности. Начальная фаза экспоненты обычно воспринимается как лаг-фаза, отчасти в связи с порогом распознавания начала роста по мутности при  $\lg N_t = 5$  или 6. От этой кажущейся лаг-фазы следует отличать истинную лаг-фазу, когда размножения нет и происходит приготовление клетки к началу

размножения инициационными процессами внутри клетки. Лаг-фаза определяется отрезком времени, отсекаемым на полулогарифмическом графике прямой численности живых клеток. По мере приближения к предельной численности рост замедляется. Предельная численность бактерий микронных размеров достигает  $10^{12}$  клеток в  $\text{см}^3$ ; вес сырой массы одной бактерии составляет  $\approx 10^{-13}$  г. К таким плотностям приближается масса бактерий в колониях и биопленках, но не в жидких культурах. Обычно максимальная численность определяется использованием питательного субстрата, но могут быть и иные причины, например отравление продуктами обмена. Есть и более тонкие механизмы регуляции плотности популяции с использованием сигнальных молекул, повышение концентрации которых в среде воспринимается генетическим аппаратом бактерий. По достижении максимально возможной в данных условиях плотности, бактерии переходят в стационарную фазу, характеризуемую иным физиологическим состоянием, обычно обозначаемым как анабиотическое. При этом в клетке резко снижается содержание рибосом и соответственно РНК. Под микроскопом в фазовом контрасте такие клетки выглядят бледнее и они иначе окрашиваются флуорохромами. В стационарной фазе только часть клеток сохраняет способность к размножению. При пересеве в свежую среду неразмножающиеся клетки создают начальный фон, маскирующий начало экспоненциальной фазы, а перестройка клеток вызывает лаг-фазу. Вслед за стационарной фазой наступает фаза отмирания, сопровождающаяся или не сопровождающаяся лизисом. Отмирание бактерий — процесс, связанный с метаболической активностью. Если эта активность заторможена, например, низкой температурой, то клетки могут сохранять жизнеспособность очень долго, например, в вечной мерзлоте или при криоконсервации. Сохранение жизнеспособности оценивается сроком заведомо больше десятков тысяч лет во льдах Антарктиды и более миллиона лет для вечной мерзлоты. Таким образом, отмирание — активный процесс, и обычно его описывают как постоянную гибель определенной части клеток за единицу времени, что дает на полулогарифмическом графике нисходящую прямую. Отмирание бактерий в естественных условиях приводит к так называемому самоочищению при-

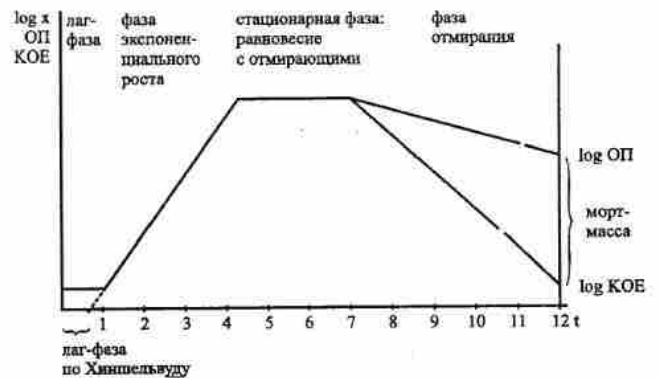


Рис. 23. Кривая роста бактерий

ОП — оптическая плотность культуры, КОЕ — число колониеобразующих единиц, x — число клеток

родных сред. Процесс отмирания не менее важен для поведения организма в природе, чем рост, но изучен гораздо менее подробно. Внимание привлекли уже упоминавшиеся «некультивируемые формы», которыми называют организмы в состоянии неготовности к прорастанию на средах, обычно пригодных для их роста.

Теоретически кривая роста бактерий на полулогарифмическом графике (рис. 23) описывается трапецией, сдвинутой от начала координат на величину лаг-фазы. Время достижения максимальной численности зависит от размеров инокулята, причем здесь дело не только в арифметических расчетах, но и в биологических особенностях, когда при достаточной начальной плотности быстрее проходит лаг-фаза.

Между синтезированной биомассой и количеством потребленного вещества (или образованных продуктов) существует пропорциональность, обозначаемая как «константа урожая»  $Y$ . Для аэробных органотрофов эта величина составляет около 50 весовых процентов. Обычно  $Y$  оценивается в граммах сухой биомассы на 1 моль использованного субстрата. Очевидно, что эта величина зависит от термодинамического выхода основной реакции

катаболизма. Более точная величина получается для  $Y_{\text{ДТР}}$  — количества синтезированной биомассы (в граммах) на 1 моль АТФ, образованного в процессе метаболизма, — равного приблизительно 10 г. Это универсальная оценочная величина для экспоненциального роста, хотя у некоторых организмов она может заметно отличаться. Пропорциональность между ростом и потреблением субстрата и стехиометрическим образованием продукта позволяет оценивать рост химическими методами там, где подсчет клеток затруднителен, например, для нитрификаторов первой фазы по образованию, а второй — по потреблению нитрита. В стационарной фазе роста идет потребление субстрата без размножения, и затраты на этот процесс обозначаются как «энергия поддержания». По мере увеличения плотности бактерий она составляет все большую часть баланса. Очевидно, что при активном росте концентрация субстрата в среде снижается до минимума, и поэтому нельзя ожидать высокой концентрации его там, где выросли бактерии.

### 8.3. РОСТ И КОНЦЕНТРАЦИЯ СУБСТРАТА

Между удельной скоростью роста  $dx/x dt$ , обозначаемой  $\mu$ , и концентрацией субстрата существует гиперболическая зависимость (рис. 24), установленная Ж. Моно и описываемая уравнением, получившим его имя:

$$\mu = \frac{\mu_{\text{max}} \cdot s}{(K_s + s)},$$

где  $\mu$  — удельная скорость роста;

$\mu_{\text{max}}$  — максимальная возможная скорость роста, не ограниченная концентрацией субстрата;

$K_s$  — константа, соответствующая концентрации субстрата, при которой достигается 1/2 максимальной скорости роста;

$s$  — концентрация субстрата в среде.

Величина  $\mu_{\text{max}}$  зависит от природы организма, и соответственно организмы разделяются на быстро и медленно растущих. Величина  $K_s$  характеризует сродство организма к субстрату и определяет его способность расти при низких концентрациях субстрата,

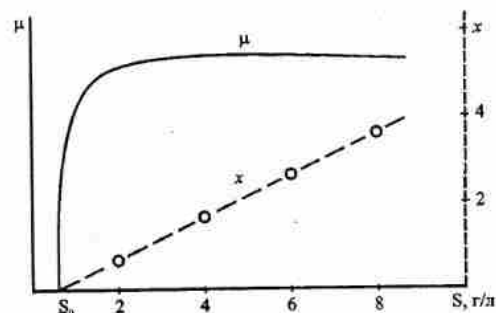


Рис. 24. Зависимость скорости роста  $\mu$  и урожая  $x$  от начальной концентрации субстрата (по Г. Шлегелю, 1987)

$S_0$  — минимальный порог концентрации субстрата

разделяя виды организмов по эффективности их транспортных систем. Для глюкозы обычно величина  $K_s$  не превышает 10 мг/л.

От констант  $\mu_{\text{max}}$  и  $K_s$  зависит конкурентоспособность организмов, использующих один и тот же субстрат, по «правилу скрещивающихся кривых»: при низкой концентрации субстрата выигрывает организм с высоким сродством к субстрату и малой  $K_s$ , при высокой концентрации — организм с высокой  $\mu_{\text{max}}$ . Соответственно они обозначаются как олиготрофы и копиотрофы. На самом деле в одном и том же сосуде или местообитании растут оба организма, только одного нарастает больше. Важное значение имеет минимальная концентрация субстрата, при которой транспортные системы организма уже не эффективны. Эта величина часто определяет остаточную концентрацию субстрата в природе по достижении микроорганизмами максимальной плотности. Например, пороговые концентрации  $H_2$  в среде существенно различаются для разных групп анаэробных гидрогенотрофных организмов. Наименьшее сродство к водороду у гомоацетатных организмов — около 1000 ppm (partes pro million,  $10^{-6}$  по объему) в газовой фазе, за ними следуют метаногены с порогом 5–100 ppm; у сульфатредукторов эта величина менее 1 ppm, а у бактерий, восстанавливающих железо, еще ниже. Поскольку концентрация продукта реакции



влияет на ее термодинамический выход, то рост образующих водород анаэробов зависит от того, какой конечный уровень  $H_2$  устанавливается в среде.

В конкуренции не менее важное значение, чем скорость роста, имеет выживание, в том числе и при минимальной концентрации субстрата: выигрывает не только тот организм, численность которого больше в данный момент, но и тот, у которого скорость отмирания меньше. Отмирание в необычной среде ведет к процессу самоочистки природных сред, и типичным примером служит отмирание индикаторных фекальных организмов *E. coli*, например, в море. Отмирание или его противоположность — выживание, очень сильно варьирует у разных видов, обуславливая их приспособительные реакции. Обычно считается, что удельная скорость отмирания постоянна. Однако гораздо более часто приходится сталкиваться с гетерогенностью популяции по этому свойству, когда клетки, находящиеся в разном физиологическом состоянии, отмирают с существенно разной скоростью.

Кроме описанного здесь роста с использованием резервуара вещества при его колонизации — ситуации стандартной в лабораторных условиях, — следует рассмотреть еще два варианта.

Первый случай представляет хемостат — проточный бассейн, в котором происходит полное смешение. В таком бассейне прирост прямо пропорционален скорости притока субстрата и выноса продуктов. Для всех организмов здесь существует одинаковая вероятность выноса из реактора и правило скрещивающихся кривых реализуется в полной мере. В бассейне устанавливаются стационарные концентрации субстрата, продукта и активной биомассы (рис. 25). Примером хемостата в природе может служить рубец жвачных, но не всякий пищеварительный тракт, аналогичный трубчатому реактору, по которому пищевой комок перемещается, как пробка. Вообще в природе условия хемостата, удобного для изучения экспоненциального роста в лаборатории, реализуются далеко не так часто. Однако применение хемостата для изучения роста популяций бактерий и простые закономерности, связывающие потребление субстрата, скорость роста, плотность популяции, позволили на этой основе разработать обширную теорию роста микробных популяций, где особенно удобно изучать

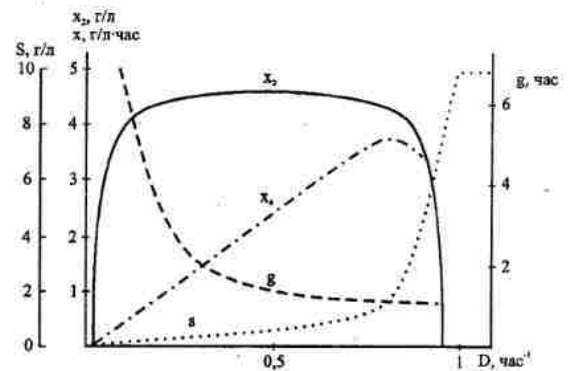


Рис. 25. Хемостатная кривая (по M. Madigan et al, 1997)

Соотношение между плотностью бактериальной суспензии ( $x_2$ ), концентрацией субстрата (s), временем удвоения бактерий (g) и урожаем биомассы (x) в хемостате. D — скорость разбавления

действие лимитирующих факторов на чистых культурах и конкурентные отношения на смешанных.

Второй случай — это так называемое приточное культивирование, когда рост ограничен притекающим извне субстратом, а вынос отсутствует. Превышение потенциальной скорости роста над скоростью поступления субстрата приводит к тому, что достигается полное использование субстрата и максимальная плотность, как при малых скоростях притока в хемостате. Рост пропорционален притоку субстрата и оказывается линейным. Например, для аэробов рост ограничивается поступлением кислорода из воздуха в воду, в которой растворимость  $O_2$  составляет, в зависимости от температуры, около 0,25 ммоль/л. Транспорт  $O_2$  ограничен поверхностью контакта жидкости с воздухом и, следовательно, рост становится линейным. Для аэробов лимитирующей часто оказывается концентрация кислорода менее 0,1 мг/л. По этой концентрации организмы разделяются на аэробов и микроаэрофилов. Отсутствие выноса биомассы приводит к возрастающему потреблению на поддержание, и рост затухает. В условиях хемостата приточному культивированию соответствуют условия, когда

приток субстрата и вынос клеток меньше скорости роста: при этом достигается высокая плотность биомассы, а концентрация субстрата низкая. Ситуация приточного культивирования очень распространена в природе для всех закрепленных на твердом субстрате — иммобилизованных — клеток в биопленках. Многие организмы имеют специальные приспособления для закрепления на твердой фазе. Наилучшим примером сопротивления выносу могут служить обитатели быстро текущих вод — кренофилы. Они образуют развешивающиеся в турбулентном потоке космы цепочек клеток, объединенных в нити трубчатым влагалищем, как, например, *Sphaerotilus* или *Crenothrix*. В более широком плане следует считать нерегулярный приточный режим наиболее характерным для природных условий. Нерегулярность условий приводит к тому, что даже организмы с коротким жизненным циклом, как бактерии, большую часть жизни находятся в переходном состоянии.

Для большинства условий можно упростить характер экспоненциального роста микробной популяции, описывая его двумя пересекающимися прямыми: 1) до начала резкого возрастания численности; 2) до достижения максимальной плотности. Отсутствие выноса приводит к развитию в виде микроколоний. Дальнейшее накопление массы клеток обуславливает блокирование их от поступления субстрата, и часть клеток переходит в покоящееся состояние, а часть отмирает. Разумно предположить, что в стабильных условиях численность клеток находится в состоянии линейного роста при плотности близкой к максимальной. Однако в природе условия нестабильны, и поэтому микробы находятся в переходном состоянии от одного режима к другому, которые отличаются пороговыми переходами. Особо следует отметить важность численности готовых к размножению клеток — величина, учитываемая микробиологами при высеве на среды.

При экстраполяции этой лабораторной модели культивирования микроорганизмов в искусственных питательных средах на природные условия нужно сделать поправки на физиологическое состояние клеток, транспорт веществ в окружающей клетки среде, взаимодействие с другими организмами в сообществе. В каждом участке среды происходит рост организмов, их отмирание, привнос в исследуемый объем и вынос из него.

## 9. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

### 9.1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СРЕД

Основу микробиологической техники, или *know how*, составляет приготовление сред, в которых способны развиваться культуры разных бактерий. Основная задача, которая преследуется при проектировании состава сред и условий культивирования, заключается в моделировании в лаборатории существенных параметров той экологической ниши, в которой организм развивается в естественных условиях обитания. Это работа, требующая и воображения, и понимания природной обстановки. При этом иногда небольшие различия в условиях культивирования позволяют выделять в чистую культуру и поддерживать бактерии. Для очень многих организмов, массовое развитие которых наблюдается в природе, условия культивирования еще не подобраны. Связано это, по-видимому, с динамической обстановкой, в которой организмы развиваются в природе, например, в условиях различных градиентов. Изменения, происходящие в химическом составе сред при культивировании, служат для описания химической функции организма.

Состав сред обусловлен следующими компонентами.

**Минеральный фон.** Наиболее простой подход к нему заключается в имитации 6-компонентного состава вод, в которых организм наблюдается. Катионный состав определяется, прежде всего, Na, Ca, Mg; анионный — хлоридом, сульфатом, бикарбонатом. Нужно обратить внимание на общую минерализацию среды, которая должна соответствовать тем водам, из которых организм предполагается извлечь в культуру. Для морских организмов лучше применять стерильную морскую воду, хотя бы на первом этапе. Для галофилов необходимо применять рассолы. Как правило, лабораторные среды чрезвычайно перегружены солями. На них нет надежды успешно культивировать обитателей пресных и тем более ультрапресных вод. Для пресных вод определенную возможность представляет карбонат кальция  $\text{CaCO}_3$ , с которым природные пресные воды находятся в равновесии, обеспечивая нейтральную реакцию. Правда, осадок мела часто неудобен в работе.

Минеральный фон определяет буферность среды. В лабораторной практике широко применяют 1/15-молярный фосфатный буфер. Для очень многих организмов фосфат оказывается селективным и даже угнетающим фактором. Прогресс в культивировании был достигнут с применением бикарбонатного буфера, предложенного Н. Пфеннигом (N. Pfenning). Однако бикарбонатный буфер находится в равновесии и с  $\text{CO}_2$  воздуха, и с углекислотой, выделяемой или поглощаемой организмами во время роста, что зависит от температуры. Поэтому технически его не так просто использовать, и кислотность среды pH постоянно приходится контролировать. Тем не менее бикарбонатный буфер представляет естественную буферную систему природных вод и поэтому предпочтителен.

В некоторых условиях употребляют инертные органические буферы, которые хорошо держат pH и, по-видимому, безвредны для организмов.

**Биогенные микроэлементы.** Они включают биогены N, P, K, S, и их количество, вообще говоря, должно зависеть от предполагаемой плотности роста в стационарных культурах и может быть снижено до лимитирующих значений в проточных. Такие элементы как Na, Mg, Ca присутствуют в минеральном фоне, но за концентрацией магния приходится следить и вносить обычно в виде сульфата или хлорида. Концентрация калия мало изменяется во время роста. Обычно достаточно K, вносимого с фосфатами. Как уже упоминалось, концентрации фосфатов в лабораторных средах определяются не столько нуждами организма, сколько поддержанием pH. Для роста вполне достаточно 100 мг/л фосфата калия, чтобы культура находилась на плато даже при высоких плотностях. Специальную проблему составляют источники азота, по которым организмы резко различаются. Основных форм источников связанного азота три: соли аммония, нитраты, органический азот, который может быть либо в составе дрожжевого экстракта, либо в виде глутамата, глутамина, аспаргата, аспарагина, мочевины. Для анаэробов лучше применять соли аммония, для аэробов — нитраты. Концентрация составляет первые сотни мг/л, хотя для массового культивирования употребляют 1–2 г/л сульфата или хлорида аммония. Источником серы обычно служат сульфаты, но для некоторых анаэробов критическим оказывается

применение сульфида в концентрации нескольких миллимоль/литр (мМ). При повышении концентрации  $\text{H}_2\text{S}$  до 2 мМ может проявляться токсическое действие сероводорода.

**Микроэлементы** должны включать Fe, Co, Mo, Cu, Mn, Ni, иногда W, Se, V. Проблема с микроэлементами состоит в том, чтобы удержать их в растворе при данном pH. Обычно это достигается применением комплексообразователей — нитрилтриуксусной кислоты или ЭДТА (комплексона). Для железа, которого надо относительно много, применяют цитрат железа. Поддержание баланса доступного железа в среде обитания микроорганизмов представляет специальную проблему. Некоторые микроорганизмы, как уже говорилось, способны синтезировать специальные соединения сидерофоры, служащие для переноса железа в клетку. К ним относятся гидроксаматы, переносящие в клетку комплексы  $\text{Fe}^{3+}$ . При восстановлении освобождается  $\text{Fe}^{2+}$  и переносчик. Эффективность этого процесса у бактерий столь высока, что они могут обусловить дефицит железа у других организмов, например, у своих хозяев. Перечисленные выше микроэлементы связаны с определенными функциями в клетке. Кобальт участвует в реакциях витамина  $\text{B}_{12}$ , молибден — в обмене азота, медь — в ряде окислительных ферментов, никель — в гидрогеназе и т. д. Отсутствие или недостаток этих микроэлементов в среде приводит к селективному росту других организмов.

Далее организмы могут нуждаться в органических веществах, которые в этом случае получают название **факторов роста**. К ним относятся чаще всего аминокислоты. Чтобы не разбираться на первом этапе в потребностях организма, применяют дрожжевой экстракт в такой концентрации, чтобы он не мог служить субстратом роста, т. е. 50–100 мг/л. При переходе к синтетической среде приходится проводить длительную работу, чаще всего по формуле «минус один», т. е. берут полную смесь, например 20 аминокислот, и смеси с отсутствием одной аминокислоты по очереди. Отсутствие роста указывает на необходимую аминокислоту. Трудность состоит в том, чтобы не внести минимальное необходимое количество ее с посевным материалом.

При тепловой стерилизации разрушаются многие витамины. Поэтому приходится вносить их отдельно из концентрированного

раствора, стерилизованного фильтрованием. Список витаминов и их функций следующий:

Кобаламин В <sub>12</sub> .....	перенос одноуглеродных остатков, синтез дезоксирибозы
Фолиевая кислота .....	перенос одноуглеродных метильных групп
Никотиновая кислота .....	предшественник НАД
Рибофлавин .....	предшественник флавопротеидов
Пантотеновая кислота .....	предшественник коэнзима А
Тиамин В <sub>1</sub> .....	реакции декарбоксилирования
Пиридоксаль В <sub>6</sub> .....	метаболизм аминокислот
Витамины группы К .....	хиноны (спиртовой раствор)
Гидроксаматы .....	перенос железа

**Субстраты катаболизма.** Их выбор целиком определяется задачей исследования. Обычно они даются в концентрации граммов на литр, что многократно превышает концентрации, с которыми организмы встречаются в природе.

Типичный состав фоновой среды, применяемой для выделения свободноживущих пресноводных или почвенных бактерий, приведен ниже:

Основные компоненты,	мг/л	микроэлементы,	мкг/л
NH <sub>4</sub> Cl .....	500	ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O .....	70
NaNO <sub>3</sub> .....	500	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	210	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O .....	10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	90	MoO <sub>3</sub> .....	10
MgSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O .....	200	CoSO <sub>4</sub> .....	10
KCl .....	40	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O .....	5
CaCl <sub>2</sub> .....	15		
FeSO <sub>4</sub> .....	1		

#### Бикарбонатная среда

##### Пфеннига (для анаэробных фототрофов):

Основные компоненты,	мг/л
NH <sub>4</sub> Cl .....	330
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	330
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O .....	330
CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O .....	330
KCl .....	330
NaHCO <sub>3</sub> .....	500-1500 (в зависимости от pH)
Na <sub>2</sub> S · 9H <sub>2</sub> O .....	500

Поскольку состав среды оказывается в высокой степени специфичным для преимущественного роста тех или иных организмов, то существуют подробные «кухонные книги» состава сред. Такие сводки выпускают коллекции типовых культур. Обычно следует обращаться к первоначальной публикации, поскольку именно примененная автором среда оказалась селективной для данного вида. Селективность сред бывает очень высокой.

Следующую серию составляют условия культивирования, определяемые аэробными или анаэробными условиями, составом газовой фазы, температурой, освещенностью. В целом условия культивирования по химическим и физическим показателям составляют лабораторную имитацию, или моделирование, экологических ниш.

## 9.2. КЛАССИФИКАЦИЯ СРЕД

Способность организмов преимущественно расти на каком-либо одном субстрате составило основу применения дедуктивного метода в микробиологии. При этом следует различать принципиально разные задачи, которые условно можно приписать разным школам.

Р. Кох (R. Koch) и медицинские микробиологи были заинтересованы в *универсальных* средах, примером которых явился мясопептонный агар или бульон. Такие среды широко распространены в санитарной практике. Для исследования микроорганизмов в природе их особенно часто применяют почвенные микробиологи для определения численности разных групп организмов по форме колоний. Списки таких крахмало-аммиачных, картофельных и т. п. сред можно найти в руководствах по микробиологии. Отчасти эти среды селективны для широких групп организмов.

*Элективные* среды были введены С. Н. Виноградским и явились основой целой идеологии. Они составлены в расчете на предельно жесткие условия, при которых может развиваться только избранный организм и никакой другой. Среда оказалась идеальной для выделения хемосинтетиков. Примером элективных сред могут служить безазотистые среды для выделения азотфиксаторов.

*Накопительные среды* предложил М. Бейеринк (M. Beijerinck). В них интересующее вещество дается в избытке, и в результате какой-то использующий их организм или группа организмов доминирует. С этим подходом совпадает подход так называемых *спонтанных культур* С. Н. Виноградского, примененный им, например, для целлюлозоразлагающих сообществ. Он утверждал, и был прав, что на основе изучения таких спонтанных культур можно получить гораздо больше функционально значимой информации, чем при последующей работе с чистыми культурами. Фактически, спонтанные культуры отражают состав микробного сообщества с некоторыми доминирующими формами.

*Оптимальные среды* предложил А. А. Имшенецкий для тех же целлюлозоразлагающих микроорганизмов. Подход заключается в создании наиболее благоприятных условий для роста интересующей группы за счет внесения различных стимулирующих рост добавок и выделения, например разведением, организмов, которые быстрее всего растут в данных условиях, т. е. специфических копитрофов.

Селективный принцип может быть усилен применением проточных культур, когда все, не соответствующее данному сообществу по скорости роста, выносятся из реактора.

## ВОПРОСЫ К ЧАСТИ 1

1. В чем отличие энергетика фототрофных и хемотрофных организмов?
2. Может ли хемотрофный организм развиваться в поле термодинамической устойчивости субстрата реакции?
3. Какие фототрофные организмы развиваются в поле термодинамической устойчивости субстрата реакции?
4. Возможно ли использование клеткой энергии, не связанной с переносом электрона (протона)?
5. Какова зависимость энергетика клетки от концентрации веществ в среде?
6. Какие факторы ограничивают возможность использования организмом реакции в качестве энергодающей?
7. Как поддерживаются в клетке условия, обеспечивающие ее жизнедеятельность?

8. Почему для бактерий способ транспорта веществ в клетку оказывается критическим?
9. Как связано сродство клетки к субстрату с транспортом?
10. Возможно ли нарушение целостности мембраны у прокариотного организма?
11. Какие реакции связывают цитозоль цитоплазмы с мембранным аппаратом? с рибосомами?
12. Что нужно для того, чтобы часть реакций анаболизма и катаболизма была общей?
13. Возможно ли возникновение аэробного обмена до появления фотосистемы II?
14. Возможно ли появление дыхательной цепи переноса электрона до появления фотосинтеза?
15. Почему метаболические пути определяют специфику обмена физиологических групп микроорганизмов?
16. Могут ли отдельные ферменты характеризовать пути обмена организма?
17. Может ли генная проба на фермент характеризовать процесс в природной обстановке?
18. Как зависит синтез фермента от внешних условий?
19. Возможно ли приспособление клетки к использованию нового субстрата, если у клетки нет внутренних резервов?
20. Каково значение запасных веществ для фототрофов? для хемотрофов?
21. Возможно ли представить возникновение генома новых бактерий в виде последовательных мутаций?
22. Какое значение имеют комбинаторные процессы в генетике микроорганизмов?
23. Каково значение отторжения чужеродной генетической информации для существования видов?
24. Что такое гетерофобия в приложении к микробным системам?
25. Как разрешить противоречие между сохранением свойств вида и их изменением на уровне бактерий?
26. Каковы пределы дифференциации у прокариот?
27. Что такое переживающие стадии и почему они переживают?
28. В каких случаях, описывая бактериальную культуру, можно ограничиться анализом клетки, а в каких — популяции?
29. Что должно присутствовать в среде, чтобы культура росла?
30. Что является первостепенным для понимания деятельности микроорганизмов в их среде обитания, а что второстепенным?

## Часть 2

# БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

## 1. КЛАССИФИКАЦИЯ

Понимание биоразнообразия основывается на *классификации*, т. е. *разбиении множества* объектов на классы эквивалентности. Под классом эквивалентности понимается подмножество однородных объектов, которыми, в пределах поставленной задачи, можно оперировать как взаимозаменяемыми. «Взаимозаменяемы те, и только те, объекты, которые обладают одним и тем же набором формальных признаков, существенных в данной ситуации» (Шрейдер Ю., 1971. С. 51). Задача классификации состоит в том, чтобы разбить множество  $M$  на подмножества  $M_x$  таким образом, чтобы ни один элемент множества не принадлежал одновременно двум разным подмножествам  $M_x$  и чтобы объединение подмножеств  $M_x$  равнялось множеству  $M$ . Все объекты (или элементы), входящие в  $M_x$ , в данной ситуации рассматриваются как взаимозаменяемые или эквивалентные в данной системе признаков. Отсюда каждый элемент подмножества  $M_x$  несет всю информацию о наборе признаков, позволивших отнести его в класс  $M_x$  и может служить *эталоном* этого класса. Однако информация (т. е. набор признаков), не использованная при выделении элемента в класс  $M_x$ , может быть различна. Это позволяет в классе  $M_x$  продолжить операцию разбиения и установления новых классов эквивалентности по иному набору признаков. Продолжение этой процедуры позволяет перейти к подмножествам объектов, дальнейшее разбиение которых оказывается либо невозможным с нашими средствами распознавания, либо нецелесообразным для поставленной нами задачи.

Важно заметить, что в примененной процедуре результат зависит, во-первых, от набора признаков и, во-вторых, от очередно-

сти их применения. Последнее обстоятельство приводит к тому, что один и тот же набор, или комбинация, признаков может дать несколько классификаций, в зависимости от устанавливаемых приоритетов. Выбор между получаемыми классификациями субъективен и опирается на целесообразность для данной ситуации. С другой стороны, независимость операций разбиения каждого подмножества  $M_x$  позволяет использовать одинаковые признаки повторно. Например, классифицировав бактерии по обмену, можно внутри каждой такой группы произвести разбиение по морфологическим признакам. Можно произвести и обратную процедуру: сначала классифицировать объекты по морфологии, как это делали и делают микробиологи, (например, выделить группу грамположительных бактерий по случайному признаку образования стойкой окраски генцианвиолетом и йодом), затем выделить среди них аэробов и анаэробов, а последних разбить на классы по продуктам обмена, как это делали и делают физиологи.

Наиболее крупные таксоны в классификации живых существ основаны как раз на цитологических различиях прокариот и эукариот. Затем производится анализ корреляции между признаками, и нередко дополнительные признаки, например молекулярно-биологические различия между прокариотами и эукариотами, затем принимаются за основные. Следует заметить, что вне зависимости от примененной классификации объект продолжает содержать весь набор присущих ему признаков и плюс некоторое количество еще неизвестных признаков. Поэтому любая классификация приводит к возможности существования параллельных рядов или матрицы. По своей сути, биоразнообразие, представляющее множество распознаваемых живых объектов, оценивается в терминах дискретной математики и комбинаторики.

### 1.1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМАТИКА

При всей формальности как классификации, так и ее оперирования застывшими множествами объектов, на самом деле в ее основе лежат глубокие принципы способа познания мира человеком, прямо связанные с *логикой* мышления. Очень давно философы-схоласты задумались об отношении между объектом и словом,

его обозначающим, признавая неисчерпанность объекта понятием. При этом в свойствах объекта они выделили две категории: существенные — *essentia*, и случайные, зависимые — *accidentia*. Существенные были отнесены к родовым, а случайные зависимые — к видовым категориям, обозначаемым прилагательными. Так произошла бинарная номенклатура Линнея. Классификация биологических объектов по таким правилам получила название *систематики*.

Используя набор признаков для описания объектов, мы, по сути дела, классифицируем не сами объекты, а их образы, в нашем сознании представляющие понятия. Понятия реализуются в общении как слова, служащие кратким обозначением классов эквивалентности. Отсюда биоразнообразие запечатлевается в сознании как часть лингвистики, причем классы эквивалентности в понятиях носят название *таксонов*, а вся наука о разбиении множества образов живых существ называется *таксономией*. Способ описания биоразнообразия сводится к науке о словах, обозначающих классы живых объектов, — *наменклатуре*. В ней употребляются две категории слов.

Одна служит для обозначения ранга общности классов эквивалентности на множествах: *вид, род, семейство, порядок, класс*. Правила обозначения получили название Кодексов номенклатуры отдельных для животных, растений, бактерий. В настоящее время разрабатывается единый кодекс номенклатуры, получивший название Биокодекса. Ранги классов эквивалентности получили в нем узаконенные обозначения для всех живых существ. В иерархической системе биологической номенклатуры различаются следующие ранги в порядке нисходящей последовательности: царство (*Regnum*), отдел (*Phylum*), класс (*Classis*), порядок (*Ordo*), семейство (*Familia*), род (*Genus*), вид (*Species*). (Проект Биокодекса. Статья 3.1.)

Вторая категория слов служит для обозначения самого объекта биоразнообразия. В обозначении объектов живой природы сосуществуют две номенклатуры. Одна из них тривиальная и подчиняется правилам местного языка (рябчик, черемуха), а другая научная. Они различаются по написанию: тривиальная пишется по правилам национального правописания и грамматики, а научная — по-латыни. При этом возможна путаница. Например, в тривиаль-

ном понимании «бактерии» — это эквивалент прокариот вообще, а в научной терминологии «Eubacteria» обозначает одну группу прокариот, противопоставляемую «Archaeobacteria», представителями которых иногда обозначают словом «археон» или «архея». Путаницы от этого много, а смысла мало, поскольку резкое противопоставление между этими двумя группами прокариот, в отличие от противопоставления между прокариотами и эукариотами, имеет значение прежде всего в классификации по молекулярным признакам, но не по строению клетки или функционированию в природе. Связана эта настойчивость с приданием приоритета определенной категории признаков, важных для установления *филогении*, или генеалогии, которая считается основой научной классификации по порядку или последовательности происхождения. Для прокариот порядок происхождения выводится на основе молекулярных признаков и служит для филогенетической классификации.

Для читателя не-биолога полезно помнить, что всякая классификация понятий — искусственна и предназначена для решения определенных задач. В общей микробиологии было введено в конце XIX века понятие рода бактерий как морфо-физиологического единства, отразившееся в названиях *Nitrosomonas, Azotobacter, Desulfovibrio, Methanosarcina*. Этот подход был очень продуктивным, потому что название отражало функциональные характеристики организма, и такой традиции стараются придерживаться в общей микробиологии. Напротив, в медицинской микробиологии господствовала традиция названия по имени ученого с видовым обозначением по инфекционности, например *Pasteurella pestis, Escherichia coli*.

Правила номенклатуры строго регламентированы «Кодексами номенклатуры»: зоологическим, ботаническим, бактериологическим. Сходные кодексы имеются и для других объектов природы, например, минералов, пород, и для каждой категории существуют свои нормы классификации, которые в принципе основываются на *иерархическом* подходе — последовательном разбиении на подмножества. Такое построение допускает два способа построения: сверху вниз от общего к частному или снизу вверх от частного, точнее индивидуального, к общему. Эти два способа существенно различны.

При движении сверху вниз мы следуем дихотомическому разбиению множества понятий по признакам или свойствам, начиная с самых общих: живое или неживое. Уже на этом этапе можно встретиться с большими трудностями, пытаясь отличить минеральную частицу от бактерии. Далее идет отличие прокариот от эукариот, имеющее четкую границу (*хитинус*) и разделяющее живые организмы на непересекающиеся множества. Помимо прямых различий, входящих в определение компартиментализации клетки эукариот, есть набор коррелирующих признаков. Всегда существует тенденция заменить основные признаки коррелирующими, например строение клетки — различиями 16S и 18S рРНК.

Второй способ классификации, типологический, начинается от индивидуального объекта, признаваемого *эталон*ом, и основывается на сравнении его с теми, которые обладают *сходством* с ним, и на решении, можно ли эти объекты объединить в один класс эквивалентности. Построение классификационной системы снизу вверх в принципе не дает разбиения множества, оставляя часть объектов вне рассмотрения. Вместе с тем при таком подходе признается существование множества неизвестных объектов, определить положение которых можно только путем сопоставления с уже известными. Этот способ классификации принят сейчас в биологии. Первый опознанный организм нового сорта признается *типовым*.

Принципы классификации биологических объектов следующие (Проект Биокодекса: будущие международные правила для научных названий организмов. СПб., 1997):

**Принцип I.** Биокодекс регулирует образование и выбор научных названий известных таксонов, но не само определение таксонов. Настоящий Кодекс не содержит ничего, что можно истолковать как ограничение свободы таксономической мысли или действия.

**Принцип II.** Научная номенклатура организмов строится на линнеевской системе бинарных названий видов.

**Принцип III.** Применение названий таксонов определяется посредством номенклатурных типов, хотя действие этого принципа не универсально для таксонов в ранге выше семейства.

**Принцип IV.** Номенклатура таксонов основана на приоритете обнаружения, хотя применение этого принципа не обязательно во всех рангах.

**Принцип V.** Каждый таксон в группе семейства, в родовой группе или в видовой группе с определенными границами, положением и рангом имеет только одно принятое название, за исключением случаев, особо оговоренных в более ранних *Кодексах*.

**Принцип VI.** Научные названия таксонов традиционно рассматриваются как являющиеся латинскими, независимо от их происхождения.

**Принцип VII.** Единственно вескими основаниями для перемены названия являются или изменение границ, положения или ранга таксона в результате соответствующего таксономического исследования, или необходимость обеспечения номенклатурной стабильности.

**Принцип VIII.** При отсутствии подходящего правила или сомнительности выводов, необходимо следовать установившейся традиции.

**Принцип IX.** Правила номенклатуры имеют обратную силу, если только специально не ограничены.

Применение Принципов регулируется Правилами. Важнейшие из них приводятся ниже:

Определение приоритета названия, согласно Принципу IV, регулируется ст. 5: «Обнародование, согласно настоящему Кодексу, определяется как распространение текста или изображений (но не акустической записи) в нескольких идентичных долговечных и неизменяемых копиях посредством продажи, обмена или дара, чтобы сделать их широко доступными научному сообществу в качестве постоянного общественного документа, подлежащего ограничениям и определениям настоящей статьи».

Согласно ст. 8.1: «Для того чтобы быть установленным, название таксона, начиная с 1 января 2000 г., должно: (а) быть обнародовано, как предусмотрено ст. 7, 5–6; (в) иметь форму, соответствующую ст. 25–33; (с) должно быть принято автором (авторами), который(-ые) является авторами названия; (d) не быть предложенным заранее, на случай принятия в будущем данной группы в целом или в определенных границах, положении или ранге; (е) соответствовать специальным положениям ст. 9–12 (см. также ст. 38.3). Кроме того, название должно быть зарегистрировано согласно ст. 13».

В бактериологии датой законного опубликования являлась дата опубликования названия (а не получения рукописи редакцией!) в *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*. Согласно новому правилу 13.2, датой регистрации явится дата получения соответствующих материалов регистрационным бюро.



В соответствии с Принципом III Правило 10 устанавливает, что «название нового таксона в ранге рода или ниже рода не может быть установленным без обозначения номенклатурного типа (см. ст. 14–17)» и «при названии нового вида или внутривидового таксона, голотипом которого является сохраняемый экземпляр, следует указать учреждение или коллекцию, в которой этот тип хранится». По ст. 14.2: «Номенклатурный тип — это тот элемент, с которым постоянно связывается название таксона, независимо от того, принято ли это название или нет». По ст. 15: «Для названий надвидов, видов или внутривидовых таксонов номенклатурный тип — это экземпляр (но если сохранить образец невозможно, то типом, по ст. 15.3, может служить иллюстрация; кодекс пока не предусматривает вместо иллюстрации последовательность нуклеотидов, как это предложено бактериологами для категории *Candidatus*). Экземпляр, как он определен здесь, обычно состоит из одной особи или ее частей, но может иногда состоять из более чем одной особи или частей разных особей (при условии, что все они являются одним и тем же таксоном), собранным или изолированным в одно и то же время в одном и том же месте; этот экземпляр постоянно сохраняется как отдельная единица хранения (например, в виде гербарного листа или препарата)». Ст. 15.2: «Типовыми экземплярами не могут быть метаболически активные организмы, но могут быть организмы, постоянно сохраняемые в живом, но метаболически неактивном состоянии, например, посредством лиофилизации или криосохранения».

Правила номенклатуры требуют строгого их соблюдения, в противном случае приоритет названия теряется. Следует исходить из предположения, что когда-то кем-то будут приложены все усилия, чтобы оспорить приоритет, в том числе и посредством обыкновенного сутяжничества. Поэтому соблюдение юридических правил номенклатуры, изложенных в *Международном кодексе по номенклатуре бактерий*, представляет технику юридической безопасности для исследователей микробного разнообразия. Изменение названия путем введения синонимов ведет к потере возможности найти первоначальные сведения, которые содержат базовую информацию, позволившую выделить данный объект.

Для пользователей данными систематики бактерий важно сразу же составить список синонимов своих объектов.

Принципиальным требованием классификации на основе типизации служит доступность эталона для сравнения. Сохранение эталона дает возможность вернуться к его исследованию с целью установления признаков, ставших доступными с развитием новых методов; ярким примером может служить переисследование разнообразия бактерий с целью установления последовательности нуклеотидов. Принципиальным ограничением классификации на основе типизации служит исследование единичного экземпляра и, следовательно, игнорирование природной variability. Поскольку сравнение бактерий проводилось по их химической активности, то была необходима чистая живая культура. По новым правилам «культура, поддерживаемая пересевами в лаборатории автора названия, более не может служить номенклатурным типом». Поэтому были созданы коллекции типовых культур бактерий, сначала в США — ATCC (American Type Culture Collection), потом в Германии DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), в СССР — ВКМ (Всесоюзная, ныне Всероссийская, Коллекция Микроорганизмов), где культуры сохраняются в лиофилизированном виде или в жидком азоте. Обладание такой коллекцией дает стране необычайные преимущества — она располагает всеми генетическими ресурсами микробного разнообразия в мире, и результат колоссального труда по выделению, характеристике микроорганизмов бесплатно передается стране-обладателю коллекции, причем приходится добиваться права быть включенным в каталог коллекции и получить номер типового штамма. Страна-обладатель коллекции несет большие затраты по поддержанию культур в живом, но не размножающемся, виде. Это требует большого искусства и умения манипулировать с самыми разными организмами. Поэтому от умелых рук и интуиции здесь зависит очень многое. Успех связан с особым характером, вниманием и терпеливостью, как у садовника. Такими качествами должен обладать каждый микробиолог, работающий с биоразнообразием, и поэтому в большой практике германских университетов включают задачи по выделению или культивированию недавно описанных организмов, где приходится отклоняться от рутинной работы с биомассой или мутантами на чашках (в стиле «pick up

the colony»). Здесь проходит резкая граница между «химиками» и «ботаниками» по характеру. Следует запомнить, что основателями общей микробиологии как науки о невидимых катализаторах природных процессов были не химики, а ботаники С. Н. Виноградский и М. Бейеринк.

Возвращаясь к принципу классификации по эталону, следует сказать, что он дает возможность сравнивать объекты, не перечисляя их признаки, по общему сходству, как «finger print» или «pattern», т. е. не переводя их в понятия, не внося смысла в операцию сравнения. Эта бессмысленная («объективная») классификация сначала устанавливает сходство или отсутствие его и лишь затем следует смысловой анализ, часто заменяемый статистикой. На этом основана классификация по хемотаксономическим показателям, иммунодиагностика, но более всего определение ДНК-ДНК-гомологии — аналитическое определение сходства ДНК двух организмов. Принимается, что организмы, различающиеся по ДНК-ДНК-гомологии менее чем на 30%, принадлежат к одному виду. О свойствах организмов эти данные ничего не говорят, но надежно устанавливают эквивалентность, а особенно идентичность сравниваемых объектов. Методы иммунодиагностики служат примером *идентификации*, основанной на попарном (бинарном) сравнении объектов без анализа их свойств. Попарное сравнение дает качественный ответ «сходен» — «нет». Количественная оценка сходства требует сравнения по числу совпадений в дискретных признаках.

Молекулярная биология дала возможность сравнивать организмы по последовательности нуклеотидов. Для этого был выбран ген 16S рДНК как наиболее удаленный от функциональных зависимостей, связанных с условиями обитания, и целиком находящийся во внутренней сфере организма. Технически он удобен, поскольку содержит 1500 пар оснований, что находится в пределах возможностей анализа как химического, так и статистического. Фактически организм здесь отсутствует, а последовательность нуклеотидов дает «номер паспорта». Такого рода запись удобна для математической операции сравнения сходства и представления его в виде графа дерева, имеющего внешнее подобие с генеалогическим деревом. Операции сравнения таких больших после-

довательностей стали возможны с применением компьютерных программ, позволяющих построить результаты сравнения в виде графов сходства. Эти графы имеют внешнее подобие и с дихотомическими деревьями, получаемыми в определительных ключах при разбиении множества понятий по признакам. Сейчас проанализированы последовательности 16S рРНК почти 5 тысяч видов бактерий. Принято, что при различии более 5% в последовательности организмы принадлежат разным родам. При оценке деревьев следует помнить, что они относятся к одному гену со специальной функцией в синтезе белка. Полное сравнение генома требует анализа примерно 4 млн пар оснований в ДНК и пока проведено для более двух десятков видов с опасностью избыточной информации при сравнении общего сходства. Вместе с тем именно на ДНК можно идентифицировать участки, соответствующие функционально значимым генам.

В результате массовой работы по сравнению 16S рРНК были построены деревья сходства, устанавливающие на множестве последовательностей нуклеотидов РНК малой субъединицы рибосомы *порядок*, которому приписывается соответствие последовательности происхождения организмов, исходя из предположения, что замены нуклеотидов происходили случайно во времени и этим заменам можно приписать временную характеристику. Полученные филогенетические деревья рассматриваются как наиболее строгое доказательство генеалогии, и вскоре стали считать, что филогения прокариот наиболее обоснована с дарвинистских позиций. Результаты массовых работ по определению последовательностей нуклеотидов как у чистых культур, так и природных популяций привели к следующим выводам.

Между положением на дереве сходства последовательностей рибосомального гена и фенотипической системой существует общая корреляция с выделением крупных ветвей грамположительных бактерий, грамотрицательных протеобактерий, цианобактерий и ряда более мелких ветвей, особенно термофильных. Наиболее крупным делением прокариот явились ветви собственно бактерий Eubacteria и археобактерий Archaeobacteria. Для эукариот, составляющих отдельную ветвь, было установлено, что митохондрии принадлежат ветви протеобактерий, а хлоропласты —

цианобактерий, доказывая симбиогенетическое происхождение всех эукариот.

Дальнейшая детализация корреляции приводит ко все большему расхождению между функциональными характеристиками и положением на дереве. Многие группы функциональной классификационной системы оказываются принадлежащими разным ветвям. Здесь возможны две интерпретации. Одна из них восходит к представлениям А. Л. Тахтаджяна о гетероботмии — неравномерной и частично независимой эволюции органов организма, — приложимой и к рибосоме, самостоятельную эволюцию которой отражает последовательность 16S рРНК. Вторая концепция связана с представлением о горизонтальном (латеральном) переносе генов, причем особое значение придается функционально значимым генам, составляющим относительно небольшую часть генома.

Наиболее ошеломляющие результаты дало широкое применение метода идентификации объектов по 16S рРНК к природным сообществам. Исследование биоразнообразия в природе (*in situ*), в отличие от чистой культуры (*ex situ*), проводится на основе экстракции суммарной ДНК из образца, очистки, амплификации, получения генов рРНК, их секвенирования и сопоставления с имеющимся компьютерным банком данных. Таких исследований сейчас очень много и они позволяют вести мониторинг сложных микробных сообществ с идентификацией клонов рДНК-гена. Другой прием заключается в применении генных проб, позволяющих сразу же установить принадлежность организмов к той или иной ветви.

В качестве примера были выбраны сообщества экстремальных местообитаний: термальных источников, гиперсоленых лагун. В таких местообитаниях культуральные методы и прямое наблюдение за морфологически идентифицируемыми *in situ* организмами, например цианобактериями, обнаруживает ограниченное биоразнообразие. Применение идентификации по 16S рРНК к природным популяциям показало, что даже в этих случаях минимального разнообразия генетически определяются не те организмы, которые есть в культурах. Известные по коллекциям культур гены 16S рДНК либо отсутствуют, либо присутствуют в

минимальном количестве среди новых, отсутствующих в культурах организмов. Например, среди археобактерий в термальных источниках Японии обнаруживают клоны ДНК, отличные не только от последовательностей, известных для культивируемых археобактерий, но и от клонов, последовательности в которых были установлены в других термальных источниках, например, Америки. В результате возникает чрезмерное разнообразие, которое пока не удастся привести в единую систему. Создается впечатление, что разнообразие бактерий по одному гену малой рибосомальной субъединицы гораздо больше разнообразия, установленного по функциональным характеристикам. Мало надежды и на полное секвенирование ДНК с установлением функционально значимых генов: вполне может возникнуть ситуация комбинаторики по тысяче признаков.

Общий вывод этих исследований таков: в природе есть множество объектов, которые не могут быть сопоставлены с известными; организмы, выделенные в чистую культуру, в природе многочисленны. Следовательно, культуральные методы вносят систематическую ошибку в познание биоразнообразия микробного мира, и вся концепция валидации на основе тезиса «чистая культура в признанной коллекции» потерпела крах: можно сказать и трудно опровергнуть, что существующая таксономия бактерий, как она представлена в Определителях Берджи на основании узаконенных в соответствии с Кодексом номенклатуры бактерий, есть «классификация артефактов».

Для микробиологов, пользовавшихся прямыми методами, например микроскопией природного материала, подобно протистологам, этот вывод не стал неожиданностью. Начиная с Ф. Кона (F. Cohn), описывавшего крупные водные микроорганизмы, и до Д. И. Никитина, использовавшего электронную микроскопию для описания необычных форм, известно, что организмы, доминирующие в «микробных пейзажах», не являются теми, которые попадают в пробирки. Однако торжество микроскопистов над культуралистами очень относительно. Исследуя цианобактерии *Synechococcus* в термальном источнике, Д. Вард (D. Ward) нашел, что генетически идентифицируемые клоны отличаются и от культивируемых штаммов, и от распознаваемых микроскопически

форм. Аналогичные результаты были получены с галофильными археобактериями в гиперсоленых лагунах.

Итак, важнейшим фактом экологии бактерий в настоящий момент является разрыв между генетически идентифицируемым множеством объектов в природных местообитаниях и множеством узаконенных лабораторных культур с известными морфофизиологическими характеристиками. Выход из кризиса состоит в необходимости перехода от геномных характеристик к функциональным. В принципе такой переход возможен и начинает развиваться на основе идентификации генов в ДНК, но он еще требует длительного накопления материала.

В заключение следует подчеркнуть, что всякая классификация строится для достижения определенной цели, которой служит в науке познание закономерностей. Одно и то же множество объектов может быть классифицировано разными способами в соответствии с многомерностью свойств объектов. В этом отношении для познания роли бактерий в природе их классификация на основе морфофизиологических родов оказалась чрезвычайно удобной, потому что она соответствовала их функциональной роли в природных процессах. Современное понимание биосферной системы основано на биогеохимических циклах, которые сформировались в истории Земли при каталитической роли бактерий задолго до появления каких-либо иных организмов и поэтому остаются базовыми.

Для использования знаний о биоразнообразии микроорганизмов необходимо знание разных классификаций, которые в немногих терминах позволяют описать существенные свойства объектов исследования. Применительно к задачам исследования приходится опираться на ту или иную классификацию.

## 2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ГРУППЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Каждому виду организмов свойственны определенные условия, в которых он развивается, пределы факторов внешней среды, местообитание. Они представляют сумму характеристик данного вида, обуславливающих его способность занять определенное

положение в многомерном пространстве экологических ниш и составляющих *аутэкологию* вида. При изучении аутэкологии внимание исследователя сосредоточено на идентификации вида, выявлении его численности в местообитании, способности к приспособлению. Каждый вид характеризуется набором функциональных характеристик, и для их описания выработаны классификации с соответствующей терминологией. Ниже дается краткое перечисление аутэкологических типов и употребляемая для этого терминология.

Функциональная классификация бактерий основывается прежде всего на типах питания, т. е. используемых химических реакциях. Все прокариоты способны использовать только растворенные вещества, проходящие через их мембрану, и поэтому относятся к *осмотрофам*, в противоположность животным, способным к *зоотрофии*, благодаря наличию пищеварительного тракта, и *фаготрофии* протист. Зоотрофы фактически являются осмотрофами, поскольку у них идет всасывание растворенных веществ из пищеварительного тракта. Способность к введению в клетку твердых частиц составляет принципиальную границу между прокариотами и эукариотами, обусловленную строением клетки. У последних границу между грибами и протистами составляет осмотрофный тип питания у всех грибов, в то время как среди протист осмотрофный тип питания свойственен лишь относительно немногим простым представителям, не имеющим плотки. Фототрофные организмы осмотрофны и нуждаются в растворенных веществах.

### 2.1. ТИПЫ ПИТАНИЯ

Для живых организмов Андре Львовым (А. Lwoff) была разработана номенклатура типов питания, в полном объеме имеющая значение только для бактерий и поэтому употребляемая почти исключительно микробиологами. Львов построил комбинаторную матрицу для типов анаболизма и катаболизма — *трофии*. По анаболизму организмы разделяются на строящих вещества своего тела из углекислоты *автотрофов* и использующих готовые органические вещества *гетеротрофов*. По катаболизму различаются

организмы, использующие энергию света — *фототрофы* (иначе «фотосинтетики») или использующие энергию химических реакций *хемотрофы*. Для химических энергетических реакций различают неорганические вещества у *литотрофов* (хемосинтетиков) и органические вещества у *органотрофов*. Отсюда получается восемь комбинаций типов питания и соответствующих им групп организмов:

— **фотолитоавтотрофы**, например, цианобактерии, водоросли и зеленые растения или анаэробные пурпурные бактерии, представляющие первичных продуцентов;

— фотолитогетеротрофы, как некоторые аноксигенные бактерии, нуждающиеся в органическом веществе для роста;

— фотоорганогетеротрофы, как несерные пурпурные бактерии;

— фотоорганоавтотрофы (это очень редкий тип питания, который можно ожидать при окислении неусвояемых органических веществ);

— хемолитоавтотрофы, как нитрификаторы или тионовые бактерии;

— хемолитогетеротрофы, как, например, многие сульфатвосстанавливающие бактерии;

— хемоорганоавтотрофы, использующие несовместимые с центральным метаболизмом вещества;

— **хемоорганогетеротрофы**, представленные основной массой микроорганизмов-деструкторов и всеми животными.

А. Львов не включил в свою классификацию акцептор электрона —  $O_2$  для *аэробов* или иной для *анаэробов*. Это удваивает число типов питания до 16. Для всех из них находятся примеры в мире бактерий.

Обратите внимание на неточное словоупотребление для организмов-деструкторов, которых обычно называют гетеротрофами вместо правильного названия органотрофы. Двойной смысл имеет слово «фотосинтез», под которым в одних случаях понимают собственно фотохимическую реакцию усвоения света, а в других — вместе с ней и автотрофную ассимиляцию углекислоты. Из 16 типов питания высшим организмам и эукариотам вообще свойственны только **фотолитоавтотрофия** и **хемоорганогетеротро-**

**фия** в аэробном варианте. Лишь немногие эукариоты, как дрожжи и некоторые протисты, приобрели способность к анаэробно-обмену. Вместе с тем тип питания не обязательно жестко связан с конкретным видом: многие организмы способны переходить от одного типа питания к другому. В особенности это относится к фототрофным организмам, свет к которым приходит только днем, а ночью они должны использовать иной тип питания. Поэтому для фототрофов особенно важны эндогенные запасные вещества, на метаболизм которых они переходят в режиме обмена поддержания в отсутствие внешних источников энергии.

Термин *трофия* используется в очень разнообразном словоупотреблении, которое можно понять только из текста. Он употребляется и для характерных типов обмена по используемым субстратам, например, метаноокисляющие бактерии называют метанотрофами, использующие  $C_1$ -соединения — метилотрофами, использующие  $H_2$  — гидрогенотрофами. Реже применяется термин *фагия* — пожирание, обычно связанный с хищничеством или же его аналогами, приводящими к гибели жертвы.

Другая классификация разделяет организмы по продуктам обмена. Она оказалась удобной для анаэробов, среди которых издавна выделяют маслянокислых, пропионовых, молочнокислых бродильщиков. Иногда употребляют окончания -гены, например, метаногены, ацетогены, сульфидогены, чтобы обозначить какое вещество они генерируют.

## 2.2. ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ГРУППЫ

Физиология организма определяется границами его приспособления к физическим и химическим условиям среды обитания и описывается областью толерантности, когда речь идет о неблагоприятных факторах. Для непрерывных факторов можно установить зависимость скорости роста от них в виде треугольника, вершины которого соответствуют *кардинальным точкам*, обычно указываемым в описании вида. Для каждого фактора устанавливаются максимальное и минимальное значения, при которых нет роста, и оптимум, при котором рост (или иная функция)

максимальны. Вне области оптимума организм активен, но находится в области *толерантности*; его конкурентоспособность понижена и его может вытеснить другой вид.

В соответствии с экологически значимыми факторами выделяются физиологические группы организмов. Среди них следует рассмотреть классификацию групп по физическим и физико-химическим факторам. Они определяют местообитания, в которых данная группа развивается. Традиционно рассмотрение начинается с температуры.

### 2.2.1. Температура

Треугольник зависимости скорости роста от температуры неравносторонний (рис. 26): скорость снижается медленно при понижении температуры, а при повышении вскоре после достижения наивысшей скорости роста резко срывается, и наступает гибель клеток при температуре, обозначаемой как максимальная. Диапазон между максимальной и минимальной температурами обычно составляет 20–30 °С. Оптимум зависимости от температуры располагается ближе к максимуму.

Однако различают *стенотермные* и *эвритермные* организмы; первые имеют узкий температурный диапазон, а вторые — широкий, причем способны приспосабливаться к изменению температуры. Возрастание скорости роста от температуры обозначается как  $Q_{10}$  — возрастание скорости реакции при увеличении температуры на 10 °С. Обычно эта величина близка значению 2. Определяющими для скорости роста могут служить разные реакции, среди которых можно выделить лимитирующие. Для ферментов и ферментных систем максимальные скорости наблюдаются обычно несколько выше оптимума роста. Ограничивающими служат сложные процессы: при максимальной температуре происходит денатурация белков,

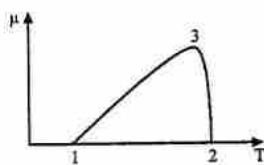


Рис. 26. Зависимость роста микроорганизмов от температуры. Кардинальные точки: 1 — минимум; 2 — максимум; 3 — оптимум;  $\mu$  — скорость роста

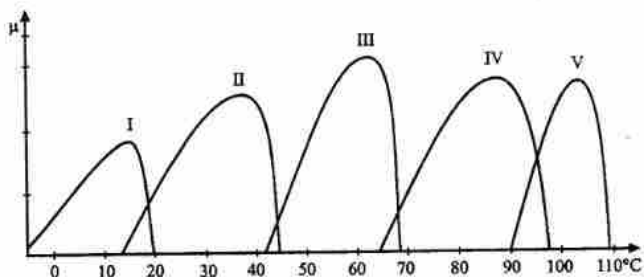


Рис. 27. Отношение к температуре разных групп микроорганизмов: I — психрофилы; II — мезофилы; III — термофилы; IV — экстремальные термофилы; V — гипертермофилы;  $\mu$  — скорость роста

минимум приписывается сгущению мембранных липидов и зависит от содержания в них ненасыщенных кислот. Очевидно, что действию температуры подвергаются все системы клетки и решающей оказывается наиболее чувствительная.

Классификация организмов в зависимости от температуры (рис. 27) включает следующие категории.

**Психрофилы** — рост в диапазоне от 0 до 20 °С с оптимумом ниже 20 °С, причем здесь имеются разные категории, вплоть до организмов, развивающихся при температуре около 0 °С, в том числе при отрицательной во льдах, например, на нижней стороне плавучих льдов. Растут при низкой температуре могут также организмы, получившие название **психроактивных** (часто употребляется неудачный термин «психротрофные»). По сути дела, это эвритермные организмы, обладающие достаточной активностью при низкой температуре. Экофизиологическое различие между психрофилами и психроактивными организмами достаточно велико. Психрофилы существуют в постоянно холодных условиях, как, например, в глубинах океана или глубоких водоемах, где колебания температуры очень незначительны. Психроактивные организмы приспособлены к сезонным изменениям климата, в теплый период они накапливают биомассу, но продолжают расти и в то время, когда активность других подавлена. Несмотря на важность психрофильных организмов в условиях нашей страны,

они изучены крайне недостаточно, так как замедленный рост делает их неудобными лабораторными объектами. Приспособление к понижению температуры связывают с изменением состава мембран и со способностью к образованию криопротекторов. Важно отметить, что при пониженных температурах снижается не только скорость роста, но и скорость отмирания, и, соответственно, увеличивается выживание. Другой механизм связан с повышенным синтезом ключевых ферментов, имеющих более высокий температурный оптимум, но только благодаря накоплению сохраняющих достаточную для функционирования клетки активность. Среди психрофилов много протистов и многоклеточных.

**Мезофилы** имеют оптимум, близкий к температуре тела теплокровных животных, однако многие лучше растут при 20–25 °С. Максимальная температура для свободноживущих мезофилов, около 45 °С, близка к максимальному нагреву почвы солнцем. Это наиболее изученная группа организмов, самая удобная для исследования в лабораторных условиях. Как уже упоминалось, среди этой группы выделяются стенотермные и эвритермные организмы. К мезофилам относятся наиболее массовые группы протеобактерий, цианобактерий, грамположительных организмов.

**Термофилы** представлены организмами, растущими при температуре выше 50 °С, но сейчас их разделили на несколько групп со специальными названиями. Собственно *термофилы* имеют максимум при температуре ниже 70 °С и минимум — выше 40 °С. Это обитатели термальных источников разогревающихся куч органического вещества в компостах или куч угля. Целый ряд важных функциональных групп, например цианобактерии, имеет своим пределом температуру 70 °С. Причины, по которым для многих функциональных групп эта температура, близкая к температуре, убивающей вегетативные клетки мезофилов, оказывается максимальной, легко представить. Особо следует заметить отсутствие термофильных эукариот, для которых температура 60 °С оказывается предельной. Многоклеточные обычно отсутствуют при температуре выше 50 °С.

**Экстремальные термофилы** имеют максимум при температуре около 90 °С и не растут при 60–70 °С. Наконец, *гипертермофилы* имеют максимум при температуре выше 100 °С и представ-

лены преимущественно гидрогенотрофными организмами. Это обитатели гидротерм и нагретой подземной гидросферы. Они вызвали усиленный интерес в последние годы. Ферменты экстремальных термофилов и гипертермофилов имеют высокий температурный оптимум и соответственно должны иметь иной состав. То же относится и к рибосомальному аппарату, поэтому не удивительно, что на филогенетическом дереве, построенном по 16S рРНК, они представляют далеко отстоящие от других организмов ветви. Мембраны их богаты насыщенными липидами.

Разделение на указанные физиологические группы по отношению к температуре до известной степени условно, потому что температура представляет непрерывный фактор и между областями психрофилов, мезофилов, термофилов нет «ничей земли». Вместе с тем эти физиологические группы достаточно четкие, возможно потому, что промежуточные температуры исследованы не так подробно.

## 2.2.2. Кислотность и щелочность

В отличие от температуры, действию химических факторов микроорганизмы могут хотя бы частично противостоять за счет мембранного барьера проницаемости. Внутренний рН клетки поддерживается близнеутральным, рН 6–8, и это связано прежде всего с протонной энергетикой, которая заставляет клетку поддерживать внутриклеточное значение рН < 9 с помощью ионного обмена. Однако некоторые группы организмов способны развиваться при экстремальных значениях среды рН. По отношению к рН выделяются следующие физиологические группы:

**Нейтрофилы**, развивающиеся при нейтральном рН в диапазоне рН > 5 и рН < 9, но главным образом в области рН 6–8; к ним относится большинство организмов. Подкисление среды, например, за счет образования органических кислот ведет к остановке роста нейтрофилов, что и используется при сквашивании и сохранении растительных продуктов.

**Ацидофилы** живут при рН < 6 до предельной кислотности рН < 2. Примерами крайних ацидофилов могут служить образующие серную кислоту некоторые виды тиаобацилл, как *Thiobacillus*

*thiooxidans*: *Leptospirillum ferrooxidans*, термофильная архебактерия *Sulfolobus*, микоплазма *Thermoplasma*, окисляющие глюкозу бактерии *Acidiphilus*, уксуснокислые *Acetobacter*, термофильная одноклеточная водоросль *Cyanidium*. Умеренными ацидофилами является большинство грибов.

**Алкалофилы** развиваются при  $\text{pH} > 8,5$  с предельным значением  $\text{pH} \approx 11$ . Примерами крайних алкалофилов могут служить архебактерии *Natronobacterium*; уробактерии *Sporosarcina urea*; разлагающие мочевину с образованием аммиака, обитатели содовых солончаков *Bacillus*. В последнее время были открыты экстремально алкалофильные сульфатредукторы *Desulfonatronovibrio* и *Desulfonatronum*, гомоацетогенный галоанаэроб *Natroniella*, и ряд других организмов, принадлежащих к разным ветвям филогенетического дерева. Особо следует отметить многочисленность алкалофильных цианобактерий.

### 2.2.3. Окислительно-восстановительные условия и отношение к кислороду

Распределение физиологических групп организмов в зависимости от  $\text{pH}$  среды согласуется с гидрохимическими характеристиками природных вод, описываемых в координатах  $\text{Eh} - \text{pH}$ . Границами поля служит устойчивость воды, определяемая выделением из нее кислорода при высоком  $\text{Eh}$  и водорода при низком  $\text{Eh}$ . Окислительно-восстановительные условия характеризуются значением  $\text{Eh}$ , связанным с доминирующей в данных условиях окислительно-восстановительной парой. Поскольку микроорганизмы получают энергию от окислительно-восстановительных реакций, возможность их развития зависит от  $\text{Eh}$  среды. В координатах  $\text{Eh} - \text{pH}$  для веществ вычислены термодинамические поля устойчивости. Хемотрофный организм может развиваться в области термодинамической устойчивости продукта реакции катаболизма и метастабильности субстрата. Отсюда следует приуроченность организмов к соответствующим полям в координатах  $\text{Eh} - \text{pH}$ .

Главными восстановителями в природных условиях являются  $\text{H}_2$  и  $\text{H}_2\text{S}$ , образуемые самими организмами; главным окислителем служит образуемый окисленными фототрофами  $\text{O}_2$ . Организ-

мы, развивающиеся в областях высокого содержания  $\text{H}_2\text{S}$ , иногда обозначают как *тиофильные*.

Наиболее важным является разделение микроорганизмов на физиологические группы по отношению к кислороду. **Аэробы** нуждаются в кислороде для дыхания. Среди них *облигатные аэробы* используют только  $\text{O}_2$  как акцептор электрона. *Микроаэрофилы* требуют при этом пониженной концентрации  $\text{O}_2$ . *Факультативные анаэробы* могут переходить от дыхания кислородом к анаэробнозу. **Анаэробы** подразделяют на облигатные и аэротолерантные. Обладая метаболизмом только анаэробного типа *аэротолерантные анаэробы* могут расти в присутствии воздуха. *Облигатные анаэробы* чувствительны к токсическому действию  $\text{O}_2$  и не только развиваются в условиях аноксии, но и требуют восстановительной обстановки.

Следует заметить, что все аэробы относятся к организмам, трофически зависящим от окисленных фотосинтетиков, но этот факт маскируется большим резервуаром  $\text{O}_2$  в воздухе, накопившимся за последний 1 млрд лет до концентрации 21% в атмосфере. Варьируя в зависимости от температуры, в равновесии с воздухом при температуре  $25^\circ\text{C}$  находится 8 мг/л или 0,25 мМ растворенного  $\text{O}_2$ . Бактерии используют именно растворенный  $\text{O}_2$ , и поэтому зависят от обмена водной среды своего обитания с воздухом. Определяющим для аэробов служит транспорт газов между атмосферой и водой. С другой стороны, поскольку  $\text{O}_2$  образуется при фотосинтезе, аэробные организмы, если они находятся в непосредственной близости от водорослей или цианобактерий, периодически в дневное время могут оказываться в условиях 100%-ного содержания  $\text{O}_2$ .

Токсичность кислорода определяется его реакционно-способными формами. Наиболее активной формой является синглетный кислород,  $^*\text{O}_2$ . Его высокая реакционная способность приводит к неконтролируемым реакциям окисления, которые могут разрушить компоненты клетки, но могут приводить и к окислению устойчивых веществ, таких как лигнин. Для гашения действия синглетного кислорода организмы образуют антиоксиданты, например, каротиноиды с цепью чередующихся двойных связей. Поэтому организмы, развивающиеся на ярком свете, например,

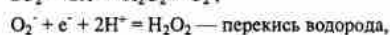
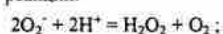


в высокогорных лишайниках, часто ярко окрашены. Токсическое действие света нередко обусловлено фотохимическим образованием токсичных форм кислорода, особенно радикала гидроксила.

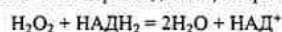
При дыхании происходит последовательное восстановление молекулы  $O_2$ :



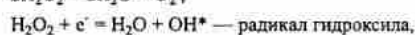
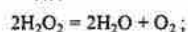
образуется при окислении флавинами, флавопротеинами, хинонами, тирозинами, железосерными белками; разлагается супероксиддисмутазой (СОД) по реакции:



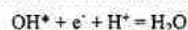
разлагается пероксидазами, например, по реакции



или под действием каталазы разлагается с выделением  $O_2$  по реакции:



незначительный окислитель, восстанавливается до воды:



Восстановление  $O_2$  осуществляется под действием ферментов *оксидаз* с наиболее важной из них цитохромоксидазой, представленной цитохромами *a*, *o*. Вовлечение кислорода в реакцию окисления веществ обусловлено действием ферментов *оксигеназ*, реагирующих либо с обоими атомами в молекуле  $O_2$ , как диоксигеназы, либо лишь с одним, как монооксигеназы, и использующих для преодоления барьера активации внутренний восстановитель, например, НАДН. Под действием монооксигеназ один атом  $O_2$  дает воду, а второй — гидроксильную группу (-ОН), например, при окислении углеводов.

Неполностью восстановленные соединения кислорода токсичны вследствие высокой реакционной способности, и такие интермедиаты в клетке подлежат детоксикации с использованием серии ферментов, как супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза, каталаза. Токсичность  $O_2$  для организмов, не обладающих такими ферментами, обусловлена формированием реакционноспособных интермедиатов и вызывает гибель облигатных анаэробов на воздухе. Токсические свойства соединений кислорода реализуются в пищеварительной вакуоли фагоцитов, где генерируются

перекись водорода, синглетный кислород  $^*O_2$ , а миелопероксидаза продуцирует гиперхлорид  $HOClO$ .

Озон  $O_3$  высокотоксичен, и озонирование воды употребляется в питьевом водоснабжении, а  $H_2O_2$  представляет известное обеззараживающее средство.

Таким образом, облигатные аэробы не только используют  $O_2$  как наиболее выгодный окислитель, но и вынуждены защищаться от токсичных продуктов его восстановления. Обычным тестом на аэробность служит определение наличия каталазы по разложению  $H_2O_2$  суспензией бактерий с выделением пузырьков кислорода. Микроаэрофилы не обладают такой мощной защитной системой, но зато имеют высокое сродство к  $O_2$ , что позволяет им развиваться в области низкой концентрации, менее 1 мг/л, и полностью удалять кислород из среды. Типичным примером микроаэрофилов могут служить водные спириллы. Аэротолерантные анаэробы способны защищаться от действия  $O_2$ , не образуя его токсических форм. Факультативные анаэробы способны переходить от одного типа обмена к другому, и эта группировка организмов имеет преимущества в условиях резких суточных колебаний  $O_2$ , например, в плотных массах водорослей. Аэротолерантные анаэробы способны защищаться от действия  $O_2$ , не образуя его токсических форм. Факультативные анаэробы способны переходить от одного типа обмена к другому, и эта группировка организмов имеет преимущества в условиях резких суточных колебаний  $O_2$ , например, в плотных массах водорослей. Результатом деятельности всех групп аэробов является удаление  $O_2$  из среды их обитания. Поэтому внутри агрегатов аэробов создаются бескислородные условия — аноксия.

Использование кислорода как универсальный терминальный механизм в получении энергии позволяет свести функциональное разнообразие аэробов к вариациям в подготовительном механизме, который обеспечивает восстановление внутриклеточных акцепторов, как НАД или сукцинат, способные реагировать с электронтранспортной цепью. Отсюда универсальность механизмов дыхания распространяется и на цикл трикарбоновых кислот (ЦТК).

Однако использование  $O_2$  влечет за собой и ряд ограничений. К ним следует отнести следующие:

- зависимость от продукции  $O_2$  окислительными фототрофами;
- зависимость от резервуара  $O_2$  в воздухе и, соответственно, приуроченность к местообитаниям, находящимся в контакте с атмосферой;
- малая растворимость  $O_2$  в воде, особенно при повышении температуры, создает концентрационные ограничения;

— истощение  $O_2$  переводит систему в состояние анаэробно-биоза;

— поступление  $O_2$  зависит от его транспорта из воздушного резервуара с замедлением диффузии в водной среде по сравнению с газовой в тысячу раз. В результате ключевым условием для развития аэробов становятся транспортные ограничения.

Зависимость аэробов от кислородных фототрофов приводит к тому, что те из них, которые развиваются в непосредственной близости от продуцентов, должны обладать способностью выживать при 100%-ном насыщении воды пузырьками  $O_2$ , т. е. в условиях гипероксии. Поэтому естественно, что большинство аэробных бактерий относится к довольно узкой филогенетической группировке части протеобактерий и грамположительных бактерий с точкой ветвления, близкой к цианобактериям. Остальные ветви, за исключением планктомицетов и цитофаг, представлены преимущественно анаэробами.

#### 2.2.4. Соленость

По отношению к солености микроорганизмы разделяются на несколько групп (рис. 28). Соленость действует на клетки как осмотический фактор. Для своего существования клетки должны поддерживать тургор: мембрана должна плотно прилегать к клеточной стенке, как пластиковый мешок с жидкостью к сетке. При нарушении этого состояния происходит плазмолиз. Организмы разделяются на физиологические группы в соответствии с осмотическими условиями среды.

Считается, что обитатели пресных вод чувствительны к 3,5%-ной концентрации  $NaCl$ , как в морской воде, и в описание организмов обычно входит такой тест. Этот тест не совсем справедлив в отношении обитателей почвы, где концентрация почвенного раствора резко меняется в зависимости от дождей или засухи. Почвенные организмы должны приспосабливаться к резким изменениям осмотических свойств среды обитания. Многие из них являются галотолерантными. Наиболее характерны здесь грамположительные организмы. Обитатели ультрапресных вод развиваются в среде с содержанием солей ниже 100 мг/л, в том

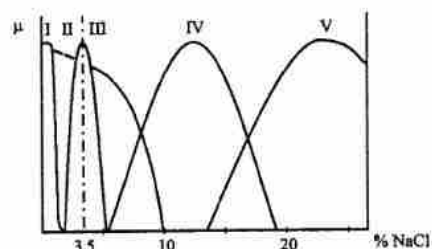


Рис. 28. Отношение к солености роста разных групп микроорганизмов I — ультрапресные; II — галотолерантные; III — морские; IV — умеренные галофилы; V — экстремальные галофилы;  $\mu$  — скорость роста

числе в дистиллированной, дождевой воде или в воде сфагновых болот. Примером могут служить *Caulobacter*, *Spirillum*.

**Морские организмы** развиваются при солености, равной 2–4%, причем под соленостью здесь понимается именно содержание  $NaCl$ . Обозначение морских организмов как галофилов не совсем удачно, так как они не приспособлены к значительному повышению солености. Среди морских организмов обильны протеобактерии, например псевдомонада *Alteromonas*.

**Галофилы** развиваются при солености, существенно превышающей соленость морской воды. К умеренным галофилам относятся организмы, имеющие верхний предел солености до 15%.

**Экстремальные галофилы** развиваются вплоть до насыщения воды  $NaCl$  при 30%-ной солености. К ним относятся архебактерии сем. Halobacteriaceae и некоторые галоанаэробы. Наиболее обильное развитие галофилов происходит при солености 10–20% в испаряющихся лагунах. Здесь их разнообразие очень велико, включая цианобактерии, прежде всего *Microcoleus*, ряд протеобактерий, как *Halomonas*, специальную группу Haloanaerobiales. Соленость выше 10–15% исключает развитие эукариот, кроме немногих вторичных вселенцев, как зеленая водоросль *Dunaliella*.

От морских галофилов следует отличать обитателей высокоминерализованных континентальных вод, как правило, с повышенным, иногда вплоть до насыщения (примерно 25%) содержанием

соды. Поскольку такие воды обычно имеют и высокое значение pH и содержат NaCl, обитателей их относят к **галоалкалофилам**, учитывая, что они приспособлены и к высокой минерализации и к pH. По сути, обе группы следовало бы отнести к «натрофилам», поскольку они нуждаются в высокой концентрации  $\text{Na}^+$ .

Организмы, развивающиеся при высокой концентрации органических веществ, обычно называют **осмофилами**, в большинстве это обитатели сиропов. Среди них много эукариотных организмов, таких как мицелиальные грибы и дрожжи.

Все прокариоты, за исключением воздушного мицелия актиномицетов, развиваются в водной среде. Испарение воды определяется водным потенциалом  $a_w$ , представляющим отношение давления водяного пара над раствором по отношению к давлению над дистиллированной водой. Соответственно обитатели ультрапресных вод развиваются при потенциале 1, для морской воды этот потенциал равен 0,98, для гиперсоленых озер — 0,7. Понижение водного потенциала за счет засолки, засахаривания, сушки служит способом сохранения пищевых продуктов от развития обычных организмов.

Для почвенных организмов значение имеет ксерофилия, т. е. приспособление к сухости. Более приспособленными оказываются грамположительные организмы, в особенности актиномицеты. Наиболее приспособлены к сухости грибы, мицелий которых выходит в воздушную среду, например у лишайников. Бактерии переносят сухость, создавая гидрофильные капсулы вокруг колоний; типичный пример такой стратегии представляют почвенные цианобактерии, например *Nostoc*. Другим способом перенесения сухости служит образование спор, обладающих дополнительным свойством термостабильности, конидий у актиномицетов, разного рода цист, служащих не только для переживания, но и для расселения. Организмы в переживающих стадиях способны широко распространяться по воздуху с пылью, обеспечивая повсеместность присутствия бактерий на земном шаре.

Приспособление к осмотическому состоянию среды осуществляется с помощью синтеза низкомолекулярных органических веществ, относительно устойчивых метаболически в цитозоле, пассивно удерживающихся мембраной. Такие вещества получили

название **осмопротекторов** или **осмолитов**. К ним относится широкая категория веществ, различных у разных групп организмов. Из аминокислот такую роль играют пролин и глутамат, из сахаров — трегалоза, свойственные слабым галофилам. Наиболее распространенным осмопротектором служит бетаин, свойственный и почвенным, и умеренно галофильным морским организмам. Для морских водорослей важным осмопротектором служит метилсульфопропионат. Галофильные цианобактерии синтезируют гликозил-глицериды. Важным и характерным осмопротектором служит аминокислота эктоин. Во всех случаях для поддержания осмотического равновесия организмы вынуждены синтезировать возрастающие количества осмопротекторов, составляющие существенную часть биомассы. Эти осмолиты называют совместимыми, потому что они не нарушают энзиматической активности в клетке и даже служат протекторами от других неблагоприятных влияний. Иная стратегия наблюдается у археобактерий *Halobacteriaceae* и эубактерий *Haloanaerobiales*, где в клетке накапливается ион  $\text{K}^+$ , и их специфические ферменты работают в солевом растворе. У эукариот роль осмопротекторов выполняют полиспирты, такие как сорбит, маннит, свойственные лишайникам, или как глицерин у *Dunaliella*. Очевидно, что синтез осмопротекторов представляет характерную адаптивную реакцию.

### 2.2.5. Приспособление к неблагоприятным воздействиям

В общем плане реакция организмов на неблагоприятные внешние воздействия подчиняется правилу *доза-эффект*: чем выше доза, тем сильнее эффект. Для дозы применяется понятие  $L_{1/2}$ , или половина летальной дозы, которая соответствует дозе, обуславливающей половину эффекта. Отмирание организмов происходит по экспоненциальному закону, предполагающему гибель постоянной части определенной популяции:

$$\frac{-dx}{dt} = kX,$$

где  $k$  — константа, зависящая от качества агента и его интенсивности и, естественно, от свойств популяции, например, вегетативных клеток или спор.

Возникновение устойчивости к тяжелым металлам, антибиотикам, дезинфектантам, которые широко применяются на практике, включает генетические изменения, часто обусловленные плазмидами и составляющие специальный раздел молекулярной генетики.

В природных условиях приходится рассматривать способы подавления микробной деятельности путем стерилизации, дезинфекции, избирательного ингибирования групп организмов или их функций антибиотиками. Под стерилизацией подразумевается полная гибель организмов и отсутствие жизнеспособных клеток. Под дезинфекцией — сильное снижение численности, как правило, под воздействием химических агентов. Различают *бактериостатическое, бактериоцидное, бактериолитическое действие*, которое соответственно останавливает рост бактерий, убивает клетки, разрушает их.

Механическая стерилизация фильтрованием пригодна лишь для чистых жидкостей и газов. В большинстве случаев достаточно пользоваться фильтрами с порами размером 0,45 мкм, но для мелких форм приходится применять фильтр с размером пор 0,2 мкм, который требует значительно больших усилий при фильтровании. Особые предосторожности следует принимать, работая с «ультрамикробами», для которых эти размеры критичны. Фильтрование удобно для отделения эукариот, которые обычно имеют размеры около 10 мкм, и этим способом можно разделить микроорганизмы на размерные группы. В природе фильтрование происходит при движении воды через пористые среды, например, через песок, как это применяется при подготовке питьевой воды. Движение воды через пористые среды служит важным фактором в гидрогеологии. Механическое разрушение части клеток вызывается резким перепадом гидростатического давления, которое достигается разными способами, в том числе кавитацией при обработке ультразвуком.

Термическая стерилизация служит наиболее распространенным способом стерилизации. Обычно применяется нагревание выше 120 °С, приводящее к денатурации белков или разрушению других компонентов среды, например, к карамелизации сахаров. При работе с гипертермофилами и некоторыми споровыми организмами полная стерилизация при этих условиях может быть не

достигнута. Тем не менее это универсальный метод стерилизации, от которого приходится отказываться только в некоторых специальных ситуациях.

К физическим методам стерилизации относится и облучение ультрафиолетом в области поглощения нуклеиновых кислот 250–280 нм, достигаемой кварцевыми «бактерицидными» лампами. От этого воздействия бактерии защищает даже небольшая тень, в которой их достигают лишь фотохимически образуемые окислители. Для защиты от радиации у бактерий выработаны антиокислительные механизмы, например, каротиноиды, а также система генетической репарации поврежденных участков ДНК. Такими механизмами особенно славится *Deinococcus radiodurans*, а также ряд термофильных эу- и археобактерий.

Химическая дезинфекция связана с применением сильных окисляющих агентов, таких как: хлор, озон, 3%-ная перекись водорода. С SH-группами реагируют соединения, содержащие ртуть. Йод служит окислителем, а также образует соединение с тирозином и в виде слабого раствора в KI (раствор Люголя) подавляет развитие бактерий. 70%-ный спирт денатурирует белки и растворяет некоторые липиды. Фенолы денатурируют белки. Газообразная окись этилена служит алкилирующим агентом и применяется для стерилизации пластмасс. Применение химических агентов требует внимательного анализа условий, необходимо учитывать взаимодействие химического агента с компонентами среды, например бессмысленно применять окислительные агенты для богатых органическими веществами или восстановителями жидкостей, или же сулему в сероводородной среде.

Ингибирование антибиотиками и химиотерапевтическими агентами обусловлено тем, что они имеют в клетках определенную мишень, например пенициллины — синтез клеточной стенки; хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклин, эритромицин действуют на синтез белка на бактериальных рибосомах, а циклогексимид — на эукариотных; синтез ДНК ингибирует налидиксовая кислота. В настоящее время получены очень детальные сведения о действии таких агентов, что позволяет использовать их как для ингибиторного анализа функций клеток, так и избирательного подавления групп организмов.

В природе антибиотики служат естественным средством межвидовой борьбы у бактерий; обычным методом их распознавания служит появление зоны ингибирования роста тест-организма вокруг колонии на чашке. Такое же подавление может быть вызвано конкуренцией за субстрат, образованием токсичного продукта обмена, как, например, кислоты, действием хищников, фагов. Чтобы различить эти явления, пользуются фильтратом культуральной жидкости. Очевидно, что антибиотики представляют очень специфические по воздействию агенты, которые не должны действовать на организм-продуцент.

### 2.3. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ГРУППЫ ОРГАНИЗМОВ ПО МЕСТООБИТАНИЮ

Для распределения организмов в среде обитания применяется традиционная гидробиологическая классификация: взвешенные в воде организмы относят к *планктону* с уточнением бактериопланктон, донные организмы следовало бы отнести к бентосу, но в бактериологии этот термин не употребляется и его заменил более широкий термин *био пленка*, относящийся ко всем обрастаниям твердых поверхностей, или для сложных сообществ — *мат* (от англ. mat — ковер). Физические условия обитания во многом определяют поведение организма, зависящее прежде всего от его морфологии. Для бактерий микроусловия создаются с помощью *гликокаликса* — лежащих снаружи от клеточной стенки компонентов, представленных капсульным материалом или слизью. Этот материал служит для агрегирования клеток в микроколонию, создавая вокруг них специфические микроусловия.

### 2.4. ГРУППИРОВАНИЕ ОРГАНИЗМОВ ПО ИСПОЛЬЗУЕМЫМ СУБСТРАТАМ

#### 2.4.1. Концентрация субстрата

Как уже упоминалось, зависимость роста от концентрации питательных веществ представляется важнейшим инструментом межвидовой конкуренции у микроорганизмов. По отношению к концентрации питательного субстрата различают две группы

организмов: **копиотрофов** и **олиготрофов**. Первые имеют преимущество при обилии субстрата, откуда и их название *копиос* — обильный. Соответственно они имеют высокие значения удельной скорости роста  $\mu_{max}$  и константы  $K_s$ . Вторые приспособлены к малой концентрации субстрата и должны обладать высоким сродством к нему, что обеспечивается соответствующими транспортными системами. К копиотрофам принадлежит подавляющее число бактерий, исследуемых в лаборатории, поскольку их культивируют на средах очень богатых питательными веществами, часто в концентрации до нескольких г/л, в то время как в природе концентрация их составляет миллиграммы — десятки микрограмм на литр.

Среди олиготрофов следует различать две группы. Одни живут при низкой концентрации смеси разных веществ, образуемых при разложении труднодоступных соединений, например гумусовых. Они должны обладать способностью использовать широкий спектр органических соединений, образуемых при таком разложении, и соответственно относятся к политрофам по набору субстратов. К ним относятся, например, *Nocardia* и некоторые коринеформные бактерии. Другую группу составляют организмы, использующие рассеиваемые в среде низкомолекулярные продукты гидролиза полимеров (например, целлюлозы) и получившие название *диссипотрофов*. Примером аэробных диссипотрофов могут служить простекобактерии, а анаэробных — спирохеты. Обычно эти организмы имеют увеличенное соотношение поверхности клетки к объему, обуславливающее выгодное распределение транспортных систем и соответственно высокое сродство к ограниченному набору субстратов, например моносахаридам. Еще одну группу диссипотрофов составляют организмы, потребляющие вещества, рассеиваемые из анаэробной зоны как продукты обмена анаэробов. Характерным представителем их может служить псевдомонада *Acidovorax*, использующая органические кислоты.

#### 2.4.2. Газы

К группе диссипотрофов примыкают *газотрофы*, для которых субстратом служат газы с низкой растворимостью, прежде всего  $H_2$  или  $CH_4$ . Гидрогенотрофы составляют довольно пеструю

группу политрофных водородных бактерий, вторые — специфическую группу метанотрофов, использующих только метан. Газотрофы способны окислять вещества в очень низкой концентрации, например, для метанотрофов минимальная пороговая концентрация  $\text{CH}_4$  близка к атмосферной концентрации  $1,7 \cdot 10^{-6}$  в газовой фазе.

Отношение к  $\text{O}_2$  было рассмотрено выше (см. 2.3).

#### 2.4.3. Твердая фаза

Обладая прокариотным строением клетки, все бактерии, как уже отмечалось, могут питаться только растворенными в воде веществами (растворенное органическое вещество — РОВ; англ. DOC — Dissolved Organic Carbon). Однако подавляющая масса вещества поступает в виде мортмассы, содержащей нерастворимые остатки клеточных оболочек (извешенное органическое вещество — ВОВ; англ. POC — Particulated Organic Carbon). Растворение твердого полимерного органического вещества осуществляется под действием экзоферментов — гидролаз. Организмы, обладающие такой способностью, получили название *гидролитиков*. Растворимые полимеры разлагаются под действием гидролаз, чтобы превратиться в транспортируемые в клетки низкомолекулярные соединения, например, под действием амилазы для крахмала или протеаз для растворимых белков. Но это не составляет трудностей, и такие РОВ, как крахмал или пектин, обычно относят к легкоусвояемым веществам. Их разлагают, соответственно, амилотолитические и пектолитические организмы. Труднее разлагаются капсульные слизи, которые по своему назначению должны быть устойчивыми. Нерастворимые полимеры, ВОВ, должны быть переведены в растворенное состояние. В биотехнологии процесс получил название твердофазной (гетерофазной) ферментации, скорость которой, очевидно, прямо зависит от заселенной поверхности, а не концентрации ВОВ. Гидролитики разделяются на три основные группы: *сахаролитическую*, *пептолитическую*, *липолитическую*, что соответствует трем классам субстратов — полисахаридам, белкам, липидам. При гидролизе ВОВ должен быть обеспечен плотный контакт между поверхностью твердой

частицы и гидролазами. Это достигается при минимальном расстоянии между бактериальной клеткой и поверхностью, а также за счет создания слизистого чехла, не позволяющего гидролазам рассеиваться в окружающей среде.

Примерами сахаролитических организмов может служить большая группа аэробных и анаэробных целлюлозных бактерий, гидролизующих целлюлозу. К аэробным принадлежат цитофаги, *Sporocytophaga*, некоторые миксобактерии (*Sorangium*, *Polyangium cellulosum*), коринеформные бактерии *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, актиномицеты и очень большое число грибов. Типичными анаэробными целлюлозолитическими бактериями являются *Clostridium cellulosolvens*, *C. cellobioparum*, *C. thermocellum*, *Eubacterium cellulosolvens*, галоанаэроб *Halocella*, термофил *Anaerocellum (Thermocellulosoruptor)*, обитатель рубца *Ruminococcus*. Особую группу составляют организмы, гидролизующие хитин — полимер аминоклюкозы, свойственный клеточным стенкам грибов; к ним принадлежат, прежде всего, актиномицеты. Полисахариды морских водорослей гидролизуют агаролитические организмы, опознаваемые по разжижению агара.

**Пептолитические** организмы разлагают азотсодержащие вещества, преимущественно с пептидной связью, посредством протеаз. Они разжижают желатину, но больший интерес представляют организмы, гидролизующие структурные устойчивые белки, например кератин. Пептолитические организмы, аэробные и анаэробные, ответственны за разложение трупов животных, у которых белки составляют значительную часть тела.

**Липолитические** организмы сталкиваются с гидролизом гидрофобных соединений и развиваются на границе двух фаз. Большое внимание уделяется разложению углеводов нефти, осуществляемому, например *Rhodococcus*, которое идет в аэробных условиях и с большим трудом в анаэробных. Окисление парафинов начинается с окисления концевой группы в карбоксильную и затем гидролитического отщепления ацетата ( $\beta$ -окисление). В анаэробных условиях особенно устойчивы липиды мембран.

В числе организмов, использующих ВОВ, следует отметить *бактериолитические* организмы, лизирующие клетки бактерий. В трофической сети бактериолитическая петля представляет

важный компонент вторичной продукции. В качестве бактериолитических организмов, способных питаться мертвыми клетками, прежде всего нужно назвать скользящих бактерий, в особенности миксобактерий. Для переваривания твердых частиц они, не будучи в состоянии ввести твердые вещества внутрь клетки, образуют слизистую координированно движущуюся колонию (шварм), которая наползает на субстрат. Типичными бактериолитическими миксобактериями считаются *Cystobacter*, *Myxococcus*, не образующий плодовых тел, а также относящийся к другой группе *Lysobacter*. Однако в основном бактериолитическую петлю осуществляют эукариотные организмы, способные к зоотрофному и фаготрофному питанию. Это не только простейшие (инфузории, амёбы), но и многие организмы-фильтраторы (например, кораллы). Следует отметить бактериолитическую петлю, обусловленную вирусами — бактериофагами, которые вызывают лизис инфицированных ими живых клеток.

К бактериолитическим организмам относится также представитель очень редкой среди бактерий группы хищников *Bdellovibrio*, который развивается в периплазматическом пространстве живой клетки жертвы.

## 2.5. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Приведенные классификации микроорганизмов по их функциональным характеристикам создают комбинаторное пространство логических возможностей. Это пространство включает как области запрета для несовместимых комбинаций признаков, так и области максимального развития разнообразия. Важно, что бактерии наиболее полно используют пространство логических возможностей, далеко превосходя в этом отношении более дифференцированные организмы. С некоторым приближением можно сказать, что ячейки пространства логических возможностей для функциональных групп организмов соответствуют экологическим нишам. Классификации таких возможностей по разным параметрам и соответствующая терминология носят неформальный характер, но позволяют быстро ориентироваться в очень разнообразном материале.

Описание групп бактерий по их функционально значимым характеристикам было очень удобно для практических работников. Названия родов бактерий соответствовали их функции — например, *Cytophaga* — пожиратель клеточных стенок (целлюлозы). В основу, как уже говорилось, было положено представление о роде бактерий как морфо-физиологическом единстве. Далее они объединялись в более крупные группировки, например, азотфиксаторов, способных ассимилировать азот атмосферы. Природоведческая микробиология основывается прежде всего на таких функциональных характеристиках микроорганизмов.

Поэтому были созданы руководства практического характера, основанные на этом принципе и предназначенные для работы с не имеющими таксономического значения условными группировками. Издание книг, посвященных отдельным физиологическим группам микроорганизмов, например, анаэробам, хемоавтотрофам, пропионовым бактериям, фотосинтезирующим бактериям, термофилам, представляет давнюю и очень удобную традицию в микробиологии. До появления филогенетической системы бактерий была сделана попытка систематизировать этот практический подход. На русский язык были переведены 8-е и 9-е издания Определителей Берджи, где бактерии были разбиты на группы, или секции, с задачей их определения по фенотипическим признакам. Перечисленные группы были созданы не по единой схеме, и, например, одну группу составили изогнутые бактерии, а другую — хемолитотрофы. Имеется 4-томник «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» с подробными описаниями видов и выходящее уже сейчас 10-е издание: Их дополняют 2- и 4-томные издания «The Prokaryotes», где вместе с характеристиками групп приводятся и методы выделения и культивирования. Кроме того, публикуются сводки, посвященные отдельным группам бактерий, составляющие важную часть литературы по общей микробиологии. Сейчас эта фенотипическая классификация заменяется филогенетической классификацией, основанной на гене 16S рДНК. Она привела к дроблению родов и все хуже коррелирует с функциональной.

Для естествоиспытателя необходимо знать функциональную групповую классификацию, так как именно она позволяет анализировать концептуальные связи в сложных природных системах.

### 3. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СИСТЕМАТИКА

Филогенетическая систематика, разработанная К. Вёзе (C. Woese) на основании сравнения последовательностей нуклеотидов в рРНК малой субъединицы рибосомы, позволила выделить три группы организмов — «Bacteria», «Archaea», «Eucarya» — как три равноправных линии в графе отношений сходства в последовательностях рРНК и стала общепринятой догмой классификации, под которую подгоняются остальные характеристики. Для утверждения филогенетической систематики потребовалась, прежде всего, корреляция с другими признаками, например, со строением клеточной стенки, составом мембраны, далее признание митохондрий и хлоропластов эукариот потомками прокариотных эндосимбионтов в соответствии с гипотезой симбиогенеза Л. Маргулис (L. Margulis). Свободноживущего организма, соответствующего «Eucarya», но не имеющего симбиогенетических органелл, пока не обнаружено, хотя поиск его среди анаэробных протистов ведется интенсивно. Поэтому предшественник(и) цитоплазмы и ядра эукариот представляет(ют) гипотетическую реконструкцию, восходящую к «прогеноту» — предку всех живых организмов, давшему три ветви живого мира, или, как их называли, три «домена».

Эту номенклатуру предполагается заменить на узаконенную и признать существование таксона высшей категории *Imperium* (мн. число *Imperia*), а не на «надцарства». Множество живых существ распределяется между тремя империями: Eukaryota (не Eucarya); Archaeobacteria (не Archaea); Eubacteria (не Bacteria). Соответствующие русские термины: эукариоты, археобактерии, зубактерии. Применение этой номенклатуры, помимо соответствия правилам Кодекса, имеет то преимущество, что прокариоты имеют общий определяющий термин «bacteria», в отличие от эукариот, и таким образом закрепляется тривиальное понятие бактерий как организмов, противопоставленных композитным эукариотам. Из списка сходств и различий Eubacteria, Archaeobacteria, Eukaryota, представленных в табл. 3, видно, что они носят специфический характер, относящийся к деталям («коррелирующим признакам»), а не к свойствам целого организма.

Таблица 3

#### Основные признаки архебактерий, зубактерий и эукариот

Признак	Archaeobacteria	Eubacteria	Eucarya
Типичные организмы	Метаногены, экстремальные термофилы, галофилы	См. основные группы (по руководству Берджи)	Протисты, грибы, растения, животные
Типичные размеры, мкм	0,5–4	0,5–4	>5 и >>5
Геном	Кольцевая хромосома	Кольцевая хромосома	Ядро со многими сложными хромосомами
Гистоны	Есть	Нет	Есть
Обратная гираза	Есть	Нет	Нет
Клеточная стенка	Протеин, псевдомуреин	Муреин, липополисахарид	Различная
Мембрана	Этерифицированные изопреноиды	Эфиры жирных кислот и глицерина	Эфиры жирных кислот, стеролы
Внутрицитоплазматические мембраны	Нет	Обычно нет, или белковые	Обычны для компартментализации клетки
Рибосомы	70S	70S	80S (в цитоплазме) + 70S рибосомы органелл, как у бактерий
РНК-полимераза	Сложная	Простая	Сложная
Синтез белка ингибируется:			
Хлорамфениколом	Нет	Да	Нет
Циклогексимидом	Нет	Нет	Да



Если различие между прокариотами и эукариотами очевидно, как различие между простыми (элементарными) и сложными (комбинированными) организмами, то различие между архебактериями и зубактериями далеко не столь ясно. Зубактерии и архебактерии имеют явное сходство в строении клетки, клеточном цикле, 60% сходства в последовательности рРНК; различий в метаболизме между ними не больше, чем между разными группами зубактерий (при большом сходстве в анаболизме). Сопоставление свойств ряда общих ферментов архебактерий и зубактерий, часто выполненные на отдельных представителях, без уверенности в приложимости вывода ко всему исследуемому множеству, показывает разные комбинации сходств и различий. Существенны различия в аппарате синтеза белка. Постулирование различного происхождения зубактерий и архебактерий вызывает серию вопросов о причинах сходства, на которые трудно ответить без большой доли допущений, лежащих вне филогенетического подхода. Ответ требует анализа полных последовательностей ДНК архебактерий и зубактерий и сопоставления не только генов синтеза белка, но и других. Материал для такого сопоставления быстро накапливается, и трудности заключаются в его анализе и выборе приоритетов.

Сопоставление всех организмов по одному гену малой рибосомальной РНК, 16S для прокариот и 18S для эукариот, дало возможность построить единую классификацию всего живого мира, а не переходить к разным наборам признаков, как это неизбежно при сравнении, например, насекомых и грибов. Анализ по 16S рДНК предоставил возможность создать единую классификационную систему, которую можно отразить в виде графа сходства последовательностей оснований в гене. Последовательность оснований устанавливается аналитически с большой точностью, и расхождения между лабораториями мало. Сопоставление последовательностей отчасти зависит от взятого для анализа набора организмов, и здесь могут получаться разные деревья.

Следующим вопросом было сопоставление этого классификационного дерева с эволюцией. Постулировалось, что мутации, ведущие к замене нуклеотидов, происходят случайно и число замен находится в прямой зависимости от времени; наибольшее

число замен должно накопиться у самых древних организмов. Приняв это допущение, можно реконструировать на основе классификационного дерева рРНК-гена *филогенетическое* дерево организмов. Результат такой реконструкции в общем совпал с картиной эволюции, установленной на основе палеонтологического и сравнительного подхода: многоклеточные растения, животные, грибы заняли вершину дерева. Упорядочение множества прокариот было субъективным, и те совпадения в группировании, которые обнаружались, например, у грамотрицательных и грамположительных бактерий, послужили основанием для принятия новой систематики как естественной. Следующим вопросом является соотношение филогении и эволюции. Оба понятия подразумевают последовательность во времени, но филогения относится к генеалогии организма или группы организмов, а эволюция может подразумевать и более широкие понятия, например эволюцию осадочного процесса, который сохраняет свою историю в виде последовательных слоев. Твердо установленные палеонтологические данные имеют силу факта, а филогения — реконструкция. Все эти соображения становятся особенно важны, когда рассматриваются наиболее простые организмы — прокариоты. Молчаливо допускается, что древние организмы сохраняются без существенных изменений.

Различия во внутренней сфере организма могут иметь слабое выражение в его направленных к среде обитания функциональных или фенотипических характеристиках. Для экосистемы неважно, какие внутренние изменения происходят в клетках и аппарате синтеза белка, коль скоро он функционирует, но очень важны химические функции организма. При анализе противопоставляются два подхода: филогенетических последовательных рядов и комбинаторный для сопоставления фенотипических функций.

Установление последовательностей оснований в рРНК привело к возможности немыслимой ранее идентификации прокариотных организмов и положения их на филогенетическом дереве без определения фенотипических свойств. Иерархическая система устанавливается благодаря соглашению относительно условных критериев рангов таксонов по числу замен оснований.

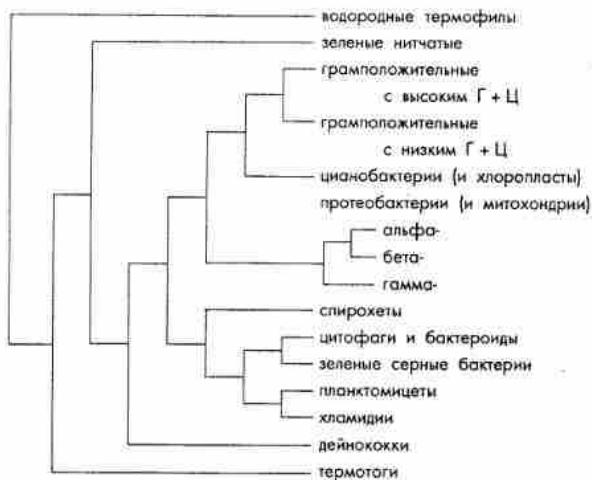


Рис. 29. Основные ветви филогенетического дерева эубактерий

Эубактерии распределились по следующим главным ветвям 16S рДНК филогенетического дерева, представленном на рис. 29 как дихотомический ключ.

Труднее всего сопоставить филогенетическую и фенотипическую систематику. В одни и те же филогенетические ветви попадают крайне разнообразные по физиологии организмы, например, анаэробные фотоавтотрофы пурпурные бактерии и энтеробактерии, цитофаги и бактериоиды. При переходе от крупных ветвей грамположительных и грамотрицательных бактерий к низшим иерархическим уровням таких несовпадений становится все больше. Из приведенных на схеме групп бактерий подавляющее большинство таксонов входит в группировки цианобактерий, протеобактерий, грамположительных организмов. Эти три ветви хорошо различимы. Самостоятельное положение ветвей спирохет, зеленых фототрофов также согласуется с традиционным представлением о единстве и своеобразии этих групп. Зеленые

бактерии обычно функционируют в сходной эконше с пурпурными серными, но сильно различаются по строению фотосинтетического аппарата. Однако объединение цитофаг, традиционно считавшихся близкими к аэробным миксобактериям, и облигатно анаэробных бактериоидов не имеет функционального обоснования.

Наибольшую трудность в корреляции филогенетической и функциональной систематики представляет наиболее многочисленный и разнообразный комплекс цианобактерий, протеобактерий, грамположительных организмов. Было сделано предположение Г. А. Заварзиным, Э. Штакебрандом (E. Stakebrandt) и Р. Мюрреем (R. Murray), что этот комплекс отражает свое происхождение из циано-бактериального сообщества как стволной эволюционной группировки микроорганизмов. Для грамотрицательных организмов вместо обозначения «пурпурные бактерии и их родственники» был предложен класс Proteobacteria. Протеобактерии, ветви которых оцениваются в ранге подклассов, пока обозначаемых греческими буквами, попытались разделить на экологические группировки. Альфа-подкласс включает группу пурпурных несерных бактерий, почкующиеся и простекобактерии, ризобии и агробактерии; среди органотрофов этого подкласса относительно много олиготрофов и организмов, связанных с высшими растениями. В бета-подкласс входят «газотрофы», например, метанотрофы и нитрификаторы, составляющие естественную группу по особенностям строения клетки с мощным мембранным аппаратом и обменом, основанным на окислении газов анаэробного происхождения. Гамма-подкласс включает группы органотрофных копидотрофов: факультативных анаэробов-броидильщиков (энтеробактерий и вибрионов), типичных аэробных окислителей (псевдомонад), а также бесцветные серобактерии, серные пурпурные бактерии. Дельта-подкласс объединяет функционально крайне различные группы сульфатредуцирующих бактерий, блелловидрионов, миксобактерий, занимающих противоположные позиции в трофической системе. Корреляция филогенетических групп протеобактерий с экологическим положением в системе носит характер лишь общей тенденции с многочисленными отклонениями.

Дальнейшее применение систематизации по рибосомальному гену привело к появлению ряда коротких ветвей в ранге подклассов протеобактерий и использованию следующих букв греческого алфавита. Последующее дробление свойственно всем способам классификации и ведет к превращению идентификационных деревьев в «кусты». Примером может служить иммунодиагностика энтеробактерий, которая привела в свое время к избыточному числу субродовых таксонов сальмонелл. Это общая судьба классификационных схем, которую они претерпевают при дальнейшей детализации.

Классификация прокариот по гену малой рибосомальной РНК основана на идентификации родов прокариот с помощью сложных технически молекулярно-биологических методов и последующей компьютерной обработки результатов определения последовательностей нуклеотидов. Быстрая идентификация проводится с помощью генных проб. Неудобством классификации по 16S рРНК оказывается появление случаев, когда фенотипически сходные организмы оказываются принадлежащими разным ветвям, и возникает дробление родов по единственному критерию с возрастающей неустойчивостью систематики на родовом уровне. Из положения организма на филогенетическом дереве можно сделать лишь ограниченные заключения о его функции. В качестве общего представления можно полагать, что прокариоты имеют некие сердцевинные компоненты, такие как репликация генома и синтез белка, и периферические, определяющие их функции, т. е. значимые для занятия функциональной (экологической) ниши и выживания в течение эволюции.

С точки зрения природоведческой микробиологии важно рассмотреть прежде всего 1) группу главных первичных продуцентов (цианобактерии); 2) протеобактерии, разделив их на группы органотрофов, фототрофов, хемосинтетиков; и 3) грамположительные организмы, разделив их на группы одноклеточных бактерий и мицелиальных актиномицетов.

Распределение важнейших родов *Proteobacteria* по подклассам и типам питания представлено в табл. 4.

Грамположительные организмы, таксономия которых находится в стадии формирования, разделились на ветви с «низким

Таблица 4

Распределение *Proteobacteria* по типам питания

Органотрофы	Литотрофы	Фототрофы
Альфа-подкласс		
<i>Acetobacter, Acidiphilium, Agrobacterium, Ancaalomicrobium, Ancylobacter, Aquaspirillum*, Azospirillum, Beijerinckia, Blastobacter, Bradyrhizobium, Brucella, Caulobacter, Hyphomicrobium, Hyphomonas, Paracoccus, Pedomicrobium, Prosthecomicrobium, Stella, Xanthobacter, Zymomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Rhodobacter, Rhodomicrobium, Rhodospila, Rhodospseudomonas, Rhodospirillum</i>
Бета-подкласс		
<i>Achromobacter, Alcaligenes, Chromobacterium, Comamonas, Leptothrix, Methylobacter, Methylococcus, Methylomonas, Methylosinus, Neisseria, Simonsiella, Vitreoscilla</i>	<i>Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrospira, Thiobacillus*</i>	<i>Rhodocyclus</i>
Гамма-подкласс		
<i>Acinetobacter, Alteromonas, Azotobacter, Azomonas, Citrobacter, Deleya, Escherichia, Halomonas, Klebsiella, Legionella, Leucothrix, Lysobacter, Moraxella, Oceanospirillum, Photobacterium, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Vibrio, Xanthomonas</i>	<i>Beggiatoa, Thiomicrospira, Thiostrix</i>	<i>Amoebobacter, Chromatium, Ectothiorhodospira, Lamprocystis, Thiocapsa, Thiodictyon, Thiospirillum</i>
Дельта-подкласс		
<i>Bdellovibrio, Chondromyces, Cystobacter, Myxococcus, Pelobacter, Sorangium, Stigmatella</i>	<i>Desulfobacter, Desulfobulbus, Desulfococcus, Desulfonema, Desulfovibrio, Desulfuromonas</i>	

\* Различные виды этого рода попадают на разные подклассы.

Г + Ц» и «высоким Г + Ц». В результате виды старого рода *Clostridium*, под которым понимали строго анаэробные спорообразующие палочки, распределились по множеству новых родов, обозначаемых как «кlostридиальная ветвь с высоким Г + Ц» или «кlostридиальная ветвь с низким Г + Ц». К последней ветви приывают грамтрицательные (!) анаэробы порядка Halobacteriales, часть из которых — спорообразующие (олигоспоровые). Такая же таксономическая судьба постигла множество других родов грамположительных облигатных анаэробов (большая часть которых получила новые названия, и их переклассификация создает ложное впечатление увеличения знаний), и поэтому существующая их систематика носит временный характер. Более устойчива система аэробных грамположительных организмов, близких к актиномицетам.

Коротко следует перечислить малые ветви филогенетической системы. Ближе всего к корню дерева собственно бактерий располагаются экстремально термофильные водородные бактерии родов *Hydrogenobacter* (*Calderobacterium*). *Aquifex* — хемолитоавтотрофы с необычным путем ассимиляции углекислоты, растущие при температуре выше 70 °С за счет окисления H<sub>2</sub> и очень богатые цитохромом.

Следующую группу составляют экстремально термофильные органотрофные *Thermotoga*, грамтрицательные организмы, имеющие на концах клеток характерные вздутия наружной мембраны, создающие пузыри перипласта. Термотоги относительно легко выделяются из разных мест обитания, как морских, так и пресноводных, а также из подземной гидросферы.

Нитчатые фотогетеротрофные зеленые хлорофлексусы обычно обнаруживаются в термальных источниках при более высокой температуре, чем термофильные цианобактерии.

Дейнококки в общем напоминают аэробные органотрофные микрококки, но отличаются необычайной радиостойчивостью.

Цитофаги и бактериоиды составляют многочисленные и важные группы и обсуждаются по-отдельности, не имея общих фенотипических свойств. Цитофаги служат важнейшими аэробными деструкторами целлюлозы и, благодаря их способности к скольжению, долго рассматривались как не имеющие плодовых тел

миксобактерии. Бактероиды — пептолитические анаэробы, составляющие основную часть бактериального населения кишечника.

О. Кандлер, К. Вёзе, и К. Штеттер (O. Kandler, C. Woese, K. Stetter) нашли, что наиболее уклоняющиеся по последовательностям рРНК («древние») группы принадлежат экстремальным термофилам и на этом основании предположили происхождение прокариот из гидротермальных мест обитания.

С позиций природоведческой микробиологии эубактерии и архебактерии рассматриваются вместе как функциональные группы прокариот. Среди архебактерий пока выделены крупные таксоны «Euryarchaeota» (по признаку повсеместного присутствия, *Eury-*) и «Crenarchaeota» (термофильные, развивающиеся в потоке, *Cren-*, в газогидротермах, организмы), но эти названия не узаконены. Специализация архебактерий позволяет рассматривать отдельно их функциональные группы — метаногенов, галофилов, экстремальных термофилов. Роды экстремальных термофилов, вследствие своего уникального положения на 16S рДНК дереве, получают высокие таксономические ранги.

Заканчивая обзор филогенетических ветвей прокариот, следует заметить, что он дает очень мало опорных пунктов для логической систематизации сведений, а тем более руководящих принципов в построении большой системы. Филогенетическая система, основанная на одном рибосомальном гене, не более чем одна из технически удобных и разработанных систем упорядочения множества организмов с целью их идентификации.

#### 4. ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ЭУБАКТЕРИЙ (по руководству Берджу, 9-е издание)

Ознакомление с биоразнообразием бактерий означает тяжелое упражнение для памяти: множество усваивается на память, а система — по логике. Впрочем, И. Канту приписывают утверждение: «Мы знаем то, что помним». Попытка создать морфо-физиологическую классификацию, наиболее удобную для практических работников, нуждающихся в быстрой идентификации организмов, была предпринята американским Комитетом Берджу по систематике бактерий. Она привела к объединению организмов в

искусственные группы, или «секции» (19–35 в разных изданиях), не имеющие таксономического статуса и в тривиальном словоупотреблении часто обозначаемые по наиболее характерному роду или названию. Чтобы ориентироваться в микробиологической литературе, эти группы и их основных представителей необходимо знать.

**Спирохеты (секция /группа 1).** К ним относятся грамотрицательные бактерии со своеобразным строением клетки: протоплазматический цилиндр накручен на центральную ось из аксиальных (осевых) жгутиков, и в результате клетка имеет вид длинной гибкой подвижной спирали, способной сворачиваться и развертываться. Среди них имеются свободноживущие анаэробные броодильщики-диссипотрофы *Spirochaeta*, аэробные водные *Leptospira* с характерным крючком на конце, паразитические *Treponema*, *Borrelia*, *Cristispira*. Именно трепонемы прежде всего приходят на ум при слове «спирохеты», как возбудители сифилиса. Свободноживущие *Spirochaeta* осуществляют функции сахаролитических диссипотрофов в анаэробном целлюлозоразлагающем сообществе, сбраживая рассеянные в низких концентрациях моно- и дисахариды по пути Эмдена-Мейергофа. Этот род представляет интересный пример адаптации к разным физическим условиям: *S. thermophila* приспособилась к морским гидротермам, а *S. caldaria* — к континентальным; в метантенках распространена факультативная *S. aurantia*; в море — *S. zoelzerii*; в высокоминерализованных крайне щелочных водоемах — *S. alkalica*, *S. africana*, а в низкоминерализованных — *S. asiatica*. Вместе с тем спирохеты представляют не только легко распознаваемую морфологическую группу, но и филогенетически определенную отдельную ветвь. Под микроскопом со спирохетами можно спутать некоторые организмы, образующие тугие спирали (их называют ...-spira), но не имеющие аксиальных жгутиков.

**Изогнутые палочки и спираллы (группа 2).** В эту группу попали спираллы с полярным жгутиком, морские *Oceanospirillum* и пресноводные *Aquaspirillum*. Это типично водные органотрофные организмы, приуроченные к условиям пониженного содержания кислорода и развивающиеся в зоне оксиклина в водоемах. Поэтому для их культивирования приходится прибегать к специальным приемам по обеспечению микроаэрофильных усло-

вий. Морфологически относящиеся к спираллам литотрофные организмы рассматриваются в других группах.

Изогнутые хищные бделловибрионы составляют довольно разнообразную группу микроорганизмов, наблюдаемых в разных водных местообитаниях. *Bdellovibrio* представляет очень мелкий подвижный вибрион, который атакует грамотрицательные бактерии, располагается у них в периплазматическом пространстве, не проникая под цитоплазматическую мембрану, и размножается здесь, лизируя клетку хозяина. Открытый Б. В. Громовым *Vampirovibrio* относится к хищникам, жертвой которых служат водоросли.

**Неподвижные изогнутые палочки — «микроциклы» (группа 3).** Это грамотрицательные аэробные органотрофы, изогнутые в виде кренделя и легко опознаваемые микроскопически в планктоне водоемов по своей морфологии, но отнюдь не обычные обитатели лабораторных культур. К ним относится собственно микроциклус, сейчас получивший название *Ancyclobacter*, *Brachiarcus*, «*Renobacter*», *Tetrarcus* — преимущественно олиготрофные планктонные организмы.

**Грамотрицательные аэробные палочки и кокки (группа 4)** составляют группу наиболее массовых представителей лабораторных культур, получивших суммарное название «псевдомонады» по форме клеток с полярным жгутиком.

Они представляют массу копитрофов-колонизаторов, быстро развивающихся на богатых средах. Многие из них способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии разнообразные (до сотни) органические вещества, совмещая их подготовительный метаболизм с обычным центральным метаболизмом в виде цикла трикарбоновых кислот. Эта их особенность приводит к тому, что в накопительных культурах, особенно на плотных средах, они вырастают в первую очередь. Типичным родом служит *Pseudomonas*, который сейчас дополнен множеством отличающихся от него фенотипически и филогенетически родов. Близок к нему *Alcaligenes* — палочка с редкими перитрихально расположенными жгутиками. В море типичной псевдомонадой является *Alteromonas*. Считается, что псевдомонадам не свойственно брожение. Исключение составляет *Zymomonas*.

Далеко не все псевдомонады представляют легкий объект для культивирования. Например, *Zoogloea* — массовый обитатель аэробных очистных сооружений, азотенков, образующий хлопья в виде слизистых пальцеобразно разветвленных микроколоний — в чистую культуру изолируется с большим трудом и не служит объектом лабораторных исследований. Среди псевдомонад выделяются несколько физиологически обособленных групп. Одну из них составляют симбиотические азотфиксаторы **ризобии** с типовым родом *Rhizobium*. Другую — свободноживущие азотфиксаторы **азотобактеры**, к которым относятся *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, но не *Azospirillum*. Азотфиксаторы составляют важнейшую для биогеохимической машины планеты функциональную группировку микроорганизмов.

Другую группу псевдомонад представляют **ацетобактерии**, аэробно продуцирующие ацетат из этанола и способные развиваться в кислой среде. Типичным представителем их является род *Acetobacter*. В высокоминерализованных соленых водах развивается аэробный органотрофный *Halomonas* (с которым не следует путать экстремально галофильные архебактерии Halobacteriaceae). В термальных источниках и компостах характерной псевдомонадой является аэробный органотрофный *Thermus*, некоторые виды которого ярко пигментированы.

Неподвижные овальные «коккобациллы» *Paracoccus* послужили примером широкой метаболической приспособляемости к разным типам питания. Этот организм использует аэробно в качестве единственного источника углерода и энергии разнообразные низкомолекулярные вещества — сахара и органические кислоты. Кроме того, в анаэробных условиях в присутствии нитрата он способен к денитрификации, а в присутствии  $H_2$  может расти как хемолитоавтотроф, окисляя водород и усваивая углекислоту. Цепь переноса электрона у паракокка оказалась сходной с митохондриальной и поэтому допускают, что организм, подобный ему, был когда-то предшественником митохондрий.

Среди псевдомонад много организмов с подобным паракокку набором способностей. Среди них нужно отметить водородные бактерии, объединявшиеся ранее в род «*Hydrogenomonas*», а теперь распределенные по разным родам, в частности, род *Acido-*

*voxa* включает организмы, использующие  $H_2$  или органические кислоты (см. Водородные бактерии). К псевдомонадам следовало бы отнести и тиобациллы, окисляющие соединения серы.

К псевдомонадам отнесены и резко отличающиеся от них морфологически и по типу обмена метанотрофы, представляющие самостоятельную группу организмов и рассматриваемые отдельно (см. Метанотрофы).

**Факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки (группа 5)** объединяют энтеробактерии с центральным представителем *Escherichia coli* как типом всех бактерий вообще. Выбор организма как типа обусловлен не только первоначальным использованием его как индикатора фекального загрязнения в санитарной микробиологии, но и легкостью роста на агаризованных плотных средах, свойство очень сомнительное, с точки зрения природоведения, для типового микроорганизма. Тем не менее количество работ по выяснению универсальных механизмов бактериальной клетки, выполненных на *E. coli*, превратило этот организм почти в символ бактерии.

Энтеробактерии представляют собой органотрофные факультативно-аэробные организмы, способные к окислению в аэробных условиях и брожению в анаэробных. Большинство их относится к сахаролитическим организмам. Среди энтеробактерий следует выделить азотфиксирующую свободноживущую *Klebsiella*. Азотистые вещества разлагают гнилостные бактерии, например, *Proteus*.

Другую группу здесь представляют **вибрионы**, изогнутые подвижные грамотрицательные палочки с типовым родом *Vibrio*, имеющие преимущественно бродильный тип метаболизма. В группу энтеробактерий входят также светящиеся бактерии рода *Photobacterium*. К энтеробактериям относятся многие патогенные организмы, особенно обитатели кишечного тракта, хотя они там и не составляют основную массу бактерий.

Псевдомонады и энтеробактерии относятся к наиболее типичным представителям Proteobacteria.

**Бактероиды (группа 6)** составляют группу грамотрицательных неспоровых облигатно анаэробных органотрофных бактерий, осуществляющих брожения. Типовым родом среди них

является *Bacteroides*, массовый обитатель кишечного тракта. Бактероиды представляют группу типичных первичных анаэробов, сбраживающих углеводы в органические кислоты. Сюда относятся также *Fusobacterium*, *Succinivibrio*, *Selenomonas*, изогнутые клетки которого имеют мощный пучок жгутиков на вогнутой стороне. Бактероиды образуют совершенно самостоятельную филогенетическую ветвь.

**Сульфатредуцирующие и сероредуцирующие бактерии (сульфидогены, группа 7)** представляют довольно компактную группировку с типовым родом *Desulfovibrio*, открытым М. Бейрингом и долгое время оставшимся единственным описанным представителем сульфатредуцирующих бактерий. Это облигатно анаэробный организм, обладающий диссимиляторным путем восстановления сульфата с образованием  $H_2S$ . Он использует крайне ограниченное число субстратов, в первую очередь лактат, этанол, с неполным окислением их в ацетат. Сульфатредукторы способны к окислению  $H_2$  и в этом случае осуществляют литогетеротрофный рост. Комбинация субстратов  $H_2$  (или формиат), лактат, этанол наиболее обычна для большинства сульфатредукторов. Анаболизм их основан на использовании ацетата с последующим карбоксилированием в трехуглеродное соединение. Ацетат как субстрат катаболизма использует *Desulfovibrio* — прямая палочка с заметно более медленным ростом, чем *Desulfovibrio*. Открытие сульфатредуцирующих организмов, способных осуществлять полное окисление органических кислот, было сделано Ф. Видделем (F. Widdel), обнаружившим целый ряд морфологически разнообразных сульфидогенов. Соответственно сульфатредуцирующие бактерии разделяются на бактерии с неполным окислением субстрата (ацетогены) и с полным окислением (табл. 5). Число родов организмов, относящихся к этой группе, которая составляет самостоятельную филогенетическую ветвь, быстро возрастает. Например, были открыты экстремально галофильный *Desulfomicrobium*, экстремально алкалофильные гидрогенотрофные *Desulfonatronovibrio* и *Desulfonatronum*. Все они относятся к протеобактериям.

Грамположительные споровые клостридии *Desulfotomaculum* представляют другую группу сульфатредукторов с менее специализированным типом обмена. Среди них есть и умеренно термо-

Таблица 5

## Представители сульфидогенов и их особенности

Группа	Род	Форма клетки	Донор электронов	Другие особенности
Сульфатредукторы				
I	<i>Desulfovibrio</i>	Вибрион	$H_2$ , лактат, этанол	Алкалофил
	<i>Desulfonatronovibrio</i>	Вибрион	$H_2$ , формиат	
	<i>Desulfonatronum</i>	Вибрион	$H_2$ , лактат, этанол	Алкалофил
	<i>Desulfobalobium</i>	Вибрион	$H_2$ , лактат, этанол	Галофил
	<i>Thermodesulfobacterium</i>	Палочка	$H_2$ , лактат	Термофил
II	<i>Desulfobacter</i>	Палочка	$H_2$ , ацетат	
	<i>Desulfobulbus</i>	Овальный	$H_2$ , лактат, этанол, пропионат	
	<i>Desulfobacterium</i>	Палочка	Жирные кислоты, ЛЖК	
	<i>Desulfosarcina</i>	Сарцина	Лактат, бензоат, ЛЖК	
	<i>Desulfobotulus</i>	Вибрион	Жирные кислоты	
	<i>Desulfomonile</i>	Палочка	Пируват, бензоат	
	<i>Desulfonema</i>	Трихом	$H_2$ , ЛЖК	
<i>Desulfococcus</i>	Кокк	Лактат, этанол, ЛЖК		
III	<i>Desulfotomaculum</i>	Споровая палочка	$H_2$ , лактат, жирные кислоты и др.	
IV Сероредукторы				
	<i>Desulfuromonas</i>	Овальный	Ацетат, пропионат	Термофил
	<i>Desulfurella</i>	Палочка	Ацетат	

фильные виды. Образующий споры *Desulfotomaculum* ближе к клостридиям.

Экстремально термофильная сульфатредуцирующая *Thermodesulfobacterium*, в массовом количестве развивающаяся в гидро-

термах, филогенетически далеко отстоит от перечисленных сульфатредукторов. В еще большей степени это относится к сульфатредуцирующей археобактерии *Archaeoglobus*.

Сульфатредуцирующие бактерии представляют важнейшую группу вторичных анаэробов, осуществляющих удаление из анаэробной системы  $H_2$ . В биогеохимическом отношении они входят в группу *сульфидогенов*, осуществляющих образование  $H_2S$  и, таким образом, инициирующих серный цикл на современной Земле.

В группу сульфидогенов входят также организмы, восстанавливающие молекулярную серу. К ним относятся «гидрогентиобактерии», описанные в 1930-х гг. А. Пельшем в соленых лагунах Сиваша и Кара-Богаз-Гола. Типичным примером сероредукторов считается открытый Н. Пфеннигом (N. Pfennig) *Desulfuromonas*. Термофильная *Desulfurella*, окисляющая ацетат, входит в отдельный подкласс филогенетической системы Proteobacteria. В отличие от катаболической сульфатредукции, сероредукция представляет довольно распространенное свойство среди разных групп анаэробов.

К этой же группе принадлежат и многие из магнетитобразующих анаэробов, с характерным родом *Geobacter*.

**Анаэробные грамотрицательные кокки (группа 8)** осуществляют брожение органических веществ и составили отдельную группу вейлонелл.

**Риккетсии и хламидии (группа 9)** являются внутриклеточными паразитами эукариотных организмов и относятся к объектам медицинской микробиологии, в противоположность эндосимбионтам, входящим в отдельную группу.

**Аноксигенные фототрофные бактерии (группа 10)** четко разделяются на несколько групп по физиологии. Различия между ними сведены в табл. 6.

**Пурпурные серные бактерии** характеризуются зависимостью от  $H_2S$  как донора электронов и окисляют его на свету последовательно в серу и сульфат. Им свойственно внутриклеточное запасание серы, что наряду с окраской клеток служит диагностическим признаком группы. Относительно крупные пурпурные серобактерии, с самого начала описания их систематики

Таблица 6

Особенности разных групп фототрофных бактерий

Признак	Пурпурные серные бактерии	Пурпурные несерные бактерии	Зеленые серные бактерии	Зеленые шпичатые бактерии	Гелиобактерии	Цианобактерии
Источник восстановителя	$H_2S$ и др. соединения серы	Органические вещества, $H_2$ , реже соединения серы	Восстановленные соединения серы	$H_2$ , $H_2S$ , органические вещества	Органические вещества	$H_2O$ , в отдельных случаях $H_2S$ , $H_2$
Локализация фотосинтезирующего аппарата	ЦПМ и ее производные	ЦПМ и хлоросомы	ЦПМ	Тилакоиды, фикобалисомы		
Хлорофильные пигменты и их максимумы поглощения (нм)	Бхл а (830–890) или в (1020–1035)	Бхл с (745–760) + а, d (725–745) + а, е (712–725) + а	Бхл g (770–790)	Хл а (700 – ФС I, 680 – ФС II)*		
Характер анабиоза	Преимущественно автотрофы	Преимущественно гетеротрофы	Облигатные автотрофы	Гетеро- и автотрофы	Облигатные гетеротрофы	Преимущественно автотрофы
Автотрофная ассимиляция $CO_2$	Цикл Кальвина	ВЦТК	3-ГПЦ, ВЦДК или цикл Кальвина	Нет (не обнаружена)	Цикл Кальвина	
Способность к органотрофии	Ограничена	Обычна	Ограничена	Имеется	Необходима	Ограничена

\* У прохлорофит имеется Хл в (650–653) и другие формы Хл. ЦПМ — шиполазматическая мембрана; Бхл — бактериохлорофилл; Хл — хлорофилл; ВЦТК — восстановительный цикл трикарбоновых кислот; ВЦДК — восстановительный цикл дикарбоновых кислот; 3-ГПЦ — 3-гидроксипропионатный цикла



С. Н. Виноградским на основе микроскопических наблюдений, получили четкие морфологически обоснованные названия: *Chromatium*, *Thiocystis*, *Thiospirillum*, *Thiocapsa*, *Thiodictyon*, *Amoebobacter*, *Thiopedia*. Обитатель щелочных высокоминерализованных водоемов *Ectothiorhodospira* откладывает серу вне клетки.

**Несерные пурпурные бактерии** объединяют преимущественно фотоорганотрофные или  $H_2$ -использующие анаэробные бактерии с широкими метаболическими возможностями. Многие из них растут не только на свету, но и в темноте. Морфология разнообразна. Наиболее изучены роды *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*. Некоторые виды, например, *Rhodopseudomonas palustris*, осуществляют неравномерное деление или почкование с четким разделением на материнскую и дочернюю клетки. В наибольшей степени почкование выражено у гифомикробов, где почка образуется на конце длинного выроста — гифы или простеки. Типичную форму гифомикроба имеет *Rhodomicrobium*. Вместо подвижных дочерних клеток он может образовывать устойчивые к высушиванию треугольные экзоспores. Фотосинтезирующий аппарат располагается в цитоплазматической и/или внутриклеточных мембранах, различным образом упакованных у разных родов пурпурных серных и несерных бактерий, что позволяет различать их на ультратонких срезах клеток.

**Зеленые серные бактерии** представляют совершенно отличную от пурпурных бактерий группу строго анаэробных облигатно фототрофных организмов, хотя также анаэробно окисляют сероводород на свету. Первым открытым Г. А. Надсоном представителем этой группы был *Chlorobium*. Светособирающие пигменты фотосинтетического аппарата локализованы у этих бактерий в хлоросомах — эллипсоидных телах, прилежащих к мембране. У описанных В. М. Горленко *Prosthecochloris* и *Ancalochloris* увеличение числа хлоросом достигается за счет цитоплазматических выростов (простек). Развиваясь при низкой интенсивности света, зеленые бактерии увеличивают улавливающую свет поверхность, образуя трехмерную сеть из клеток, как у *Pelodictyon*.

Среди **зеленых нитчатых бактерий**, представляющих филогенетически обособленную, но не однородную группу, наиболее подробно изучен термофильный фотоорганотроф *Chloroflexus* с

необычными, недавно расшифрованными путями ассимиляции углекислоты: 3-гидроксипропионатным и/или восстановительным циклом дикарбоновых кислот. Будучи факультативным фототрофом и факультативным анаэробом, *Chloroflexus*, подобно пурпурным несерным бактериям, обладает широкими метаболическими возможностями. Другой изученный представитель этой группы, мезофильный *Oscillochloris trichoides*, напротив, является облигатным фототрофом и ассимилирует углекислоту через цикл Кальвина (рибулозобисфосфатный путь). К группе скользящих трихомных фототрофных бактерий принадлежит еще ряд организмов: *Heliothrix*, *Chloronema*.

**Гелиобактерии** — единственные грамположительные фототрофы, способные к образованию настоящих эндоспор. Это облигатные анаэробы и гетеротрофы, содержащие в клетках уникальный бактериохлорофилл *g*. Как и большинство аноксигенных фототрофных бактерий, гелиобактерии являются активными азотфиксаторами. Они встречаются в почвах и содовых озерах. Пока известно немного родов гелиобактерий, из них типичные — *Helio bacterium* и *Helio bacillus*. В содовых озерах Центральной Азии В. М. Горленко недавно открыл спиральную форму *Helio restis*.

**Эритробактерии** и другие аэробные бактерии, образующие бактериохлорофилл *a*, являются облигатными органогетеротрофами, аэробами, лишь ограниченно способными использовать энергию света. Фототрофный метаболизм их совершенно не укладывается в разработанную схему. Сюда относятся роды *Erythro bacter*, *Roseobacter*, *Porphyrobacter*, обитающие в морских и пресных водах, в том числе на поверхности водорослей и в циано-бактериальных матах.

**Оксигенные фототрофы (группа II)**, или **цианобактерии**, раньше (а у альгологов и до сих пор) назывались **синезеленые водоросли**. Считалось, что функционально они вполне сходны с водорослями, отличаясь строением клетки и набором дополнительных пигментов. Систематика этой обширной и морфологически разнообразной группы была разработана на основе микроскопии природного материала по принципам ботанической номенклатуры в 1920-х гг. Компильтивная классификация, созданная Л. Гейтлером (L. Geitler) и А. А. Еленкиным, сохранилась как основа до

настоящего времени, потому что оказалась удобной для гидробиологов и, особенно, для микропалеонтологов. Попытка ввести правила бактериологической таксономии на основе типовых чистых культур оказалась лишь частично удачной, потому что многие представители обширной группы цианобактерий еще не поддаются культивированию, а те, которые поддаются, нередко теряют в культуре характерные признаки, часто основанные на агрегировании клеток. Тем не менее после исследований Р. Стейниера, Р. Риппки, Дж. Ватербарри (R. Stanier, R. Rippka, J. Waterbury, 1979) чистая культура цианобактерий — нормальный объект лабораторной работы. По строению клетки цианобактерии — типичные прокариоты с фотосинтетическими мембранами, собранными в пачки ламелл, называемые тилакоидами. В них располагается хлорофилл *a*, как у зеленых растений, но отсутствует хлорофилл *b*. В качестве дополнительных пигментов цианобактерии имеют фикобилины, представляющие развернутые в цепь порфирины, которые собраны в фикобилисомы — тельца в виде кнопок на внутренней стороне фотосинтезирующей мембраны. Схема окисленного фотосинтеза была представлена на рис. 6, Б.

Фотосистема II ответственна за выделение  $O_2$  и за все далеко идущие последствия для биоты и всей биосферы. Ассимиляция  $CO_2$  осуществляется по классическому рибулозобисфосфатному пути (циклу Кальвина) с характерным фракционированием изотопов С ( $\sigma^{13}C = -25\%$ ). Запас рибулозобисфосфаткарбоксилазы (рубиско) обнаруживается в клетках в виде гексагональных карбоксисом. Физиология фототрофных организмов, в связи с неравномерностью получения световой энергии в течение суток, отличается значительной ролью внутриклеточных запасов. Поэтому при описании кинетики роста таких организмов приходится опираться не на концентрацию вещества в среде, например фосфатов, а учитывать и весь фосфор, в том числе и внутриклеточный. Углерод накапливается в виде полиглюкозы, фосфор в виде полифосфатов, азот в виде цианофидина — полимерной цепи аспарагиновой кислоты, содержащей боковые цепи аргинина. В темноте идет аэробное дыхание, в анаэробических условиях — сбрасывание полиглюкозы, например по пути молочнокислого брожения; цианофидин разлагается по орнитиново-мочевинному циклу. За-

пасание азотистых соединений цианобактериями возможно потому, что многие из них способны к азотфиксации, особенно в отсутствие  $O_2$ ; в аэробных условиях наиболее характерна азотфиксация в гетероцистах.

Филогенетически цианобактерии составляют отдельную ветвь 16S рДНК дерева, в которую входят также хлоропласты эукариот.

Морфология цианобактерий достаточно разнообразна, чтобы опознавать их микроскопически, и на ней была основана их классификация. Простейшие формы либо одноклеточные, либо объединены в специфические для родов микроколонии-агрегаты наружными слоями оболочки. Для многоклеточных характерной формой является *трихом* — нить из цилиндрических клеток с сильно варьирующим отношением высоты к диаметру. Трихом ведет себя как многоклеточный организм, размножение его осуществляется распадением на короткие, но многоклеточные *гомогонии*. Трихомы обладают скользящим движением. Цианобактерии — в основном пресноводные организмы, но часть их характерна для прибрежной зоны моря, а *Trichodesmium* вызывает цветение в открытом океане.

Цианобактерии разделены бактериологами на крупные порядки по морфологии, альгологи дают гораздо более детализированную систематику, и ниже приведены лишь наиболее часто упоминаемые роды:

1. *Chroococcales* — одноклеточные или колониальные, но не нитчатые. Типичными представителями служат одноклеточные *Synechococcus*, объединенные общей капсулой кокки *Gloeothece* и *Entophysalis*, слизистые агрегаты *Microcystis* с газовыми вакуолями, почкующийся прикрепленный *Chamaesiphon* в характерных бокалах.

2. *Pleurocapsales* с округлыми клетками в агрегатах образуют при размножении мелкие клетки-беоциты, как у *Pleurocapsa*.

3. *Oscillatoriales* имеют трихомы без дифференцированных клеток и в большинстве представляют бентосные формы, образующие *маты*. Типичные роды представлены скользящими голыми трихомами *Oscillatoria*, заключенными в трубчатое влагалище *Phormidium*, крупными трихомами *Lyngbya*, упакованными в общее влагалище пучками нитчатых трихомов *Microcoleus*. В планктоне

щелочных озер распространены спиральные трихомы *Spirulina*. К морским осцилляториям относится уже упомянутый *Trichodesmium*.

4. Nostocales имеют трихомы с гетероцистами и способны к азотфиксации. К ним относится заключенный в слизистый чехол и образующий крупные плотные колонии *Nostoc*, пресноводная *Anabaena* в виде нити крупных бус. Сюда же относятся *Rivularia*, *Gloeotrichia*.

5. Stigonematales имеют ветвящиеся трихомы с дифференцированными клетками. Морфология их наиболее сложна и трихомы дифференцированы по длине. Они легко опознаются морфологически, но с трудом поддаются лабораторному культивированию. В термальных источниках характерен ветвящийся термофильный *Mastigocladus* (*Fischerella*, как называют почвенные и пресноводные формы).

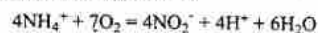
Цианобактерии, будучи основными первичными продуцентами в мире прокариот, служат организмами-эдификаторами (от edifice — здание), создающими физическую структуру цианобактериального сообщества, включающего разнообразный набор взаимодействующих между собой прокариот. (Обратите внимание, что *цианобактериальное* означает сообщество функционально сходных цианобактерий, а *циано-бактериальное* сообщество означает сообщество цианобактерий и функционально очень различных бактерий.)

**Прохлорофиты** образуют очень маленькую группу окислительных прокариот — из морского симбиотического *Prochloron* и свободноживущего *Prochlorothrix*, внешне похожего на осцилляторию, за которую он и был принят сначала. В море распространен *Prochlorococcus*, ответственный за значительную часть первичной продукции в олиготрофном океане. Большинство прохлорофит имеют ту же комбинацию хлорофиллов, что и зеленые растения: хлорофиллы *a + b*. Поэтому они вызвали большой интерес как возможные предшественники зеленых водорослей и были выделены в таксон высокого ранга. Однако теперь на основании анализа гена 16S рДНК они отнесены к цианобактериям.

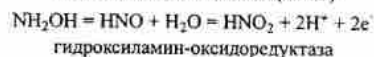
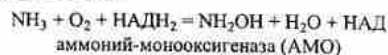
**Аэробные хемолитотрофы (группа 12)** четко разделяются на группы по используемому субстрату: соединениям азота, серы,

железа,  $H_2$ ,  $CO$ . Вместе с ними нередко рассматриваются окисляющие  $CH_4$  метанотрофы, а с последними — метилотрофы. Объединение метанотрофов с нитрификаторами не случайно, поскольку организмы имеют много общего в морфологии, обладая развитой системой внутрицитоплазматических мембран и сходным первым ферментом подготовительного обмена — метан (или аммоний-) монооксигеназой. Хемолитотрофы относятся к высокоспециализированным организмам (монотрофам) и находятся вне конкуренции за донор электрона в экологических нишах. Большинство из них — строгие автотрофы, использующие  $CO_2$  как единственный источник углерода по рибулозобисфосфатному пути. Как правило, никакие другие организмы не способны к осуществлению реакций хемолитотрофов.

**Нитрификаторы** разделены на две группы соответственно этапам окисления: нитрификаторы I фазы окисляют аммоний в нитрит, нитрификаторы II фазы — нитрит в нитрат. Обе группы организмов развиваются в поле термодинамической устойчивости окисленных соединений азота. I фаза нитрификации протекает соответственно суммарной реакции:



и разделяется на две энзиматические ступени: окисление аммония в гидроксилламин (подготовительная) и гидроксилламина в нитрит (энергетическая):



Промежуточный продукт реакции  $[HNO]$  может спонтанно распадаться с образованием устойчивой закиси азота  $N_2O$ , важнейшего парникового газа. Реакцию АМО можно подавить ацетиленом или, когда в сельскохозяйственной практике хотят избежать нитрификации, ингибитором «нитрапирином». Кроме аммония, в нитрификации хорошо используется карбамид (мочевина) даже без участия уробактерий, разлагающих карбамид на аммиак и угольную кислоту. К нитрификаторам I фазы относятся: наиболее обычный обитатель нейтральных и слабо щелочных почв



Примером ацидофильных железобактерий может служить открытая Г. Маркосяном мелкая спирилла или вибрион *Leptospirillum ferrooxidans*, составляющая отдельную филогенетическую линию. Организм окисляет в сернокислой среде либо  $Fe^{2+}$ , либо, вместе с ацидофильными тионовыми бактериями, пирит. Наиболее изученным представителем ацидофильных железобактерий служит *Thiobacillus ferrooxidans*, объединяющий свойства *Leptospirillum* и *T. thiooxidans*. Благодаря этому объединению свойств, *T. ferrooxidans* может окислять в пирите и других сульфидах чередующиеся слои металла и серы. Окисление сульфидов составляет важнейшую геохимическую функцию, ведя к сернокислотному выщелачиванию.

Примером собственно железобактерий служит *Gallionella* — исключительно своеобразный организм, напоминающий боб, на вогнутой стороне которого образуются нити гидроокислов железа (ферригидрита). *Gallionella* окисляет железо в бикарбонатной среде, большей частью в холодной воде, часто в микроаэрофильных условиях. *Gallionella* удается культивировать в градиентных условиях, где она образует пояса роста на стенках пробирки. *Gallionella* относится к хемоавтотрофам или миксотрофам. В морфологии этого организма много загадочного. Нити, сходные с нитями, экскретируемыми *Gallionella*, образует скользящая нитчатая бактерия *Toxothrix*.

*Leptothrix ferruginea* представляет цепочку псевдомонад, заключенную в трубчатый чехол из ферригидрита. Этот основной агент образования болотных руд до сих пор не поддается культивированию, несмотря на массовое развитие в природе. Морфологически он очень близок к массовой бактерии загрязненных вод *Sphaerotilus*. Считается, но не доказано, что окисление железа происходит под действием внеклеточной пероксидазы, как у других культивируемых лептотриксков, поверхность которых покрыта отложениями гидроокислов железа или марганца.

Загадочную группу «железобактерий» составляют открытые Б. В. Перфильевым формы, получившие название *Metallogenium*. Это тонкие извитые нити, расходящиеся в виде паучка от центрального округлого тела и покрытые конической шубой из окислов марганца. Металлогениум составляет массовую форму в от-

ложениях марганца и хорошо прослежен во вторичном диагенетическом профиле в осадках карельских озер. Он обнаружен в отложениях с возрастом 2 млрд лет тому назад и описан под названием *Eoastrion*. Металлогениум легко получить в лаборатории на среде с карбонатом марганца в совместной культуре, например с грибом. Американские исследователи считают его продуктом внеклеточной пероксидазы, (т. е. неживым образованием), но, как показала Г. А. Дубинина, им легко заразить культуру, ранее не окислявшую марганец.

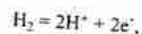
Наконец, еще одну группу железобактерий составляют «сидерокапсы» — разнообразные микроорганизмы, на поверхности клеток которых откладываются гидроокислы железа. Вероятным источником этих окислов служит остаточный продукт окисления органических комплексов железа.

Отдельную группу составляют органотрофные магнитотактические бактерии, образующие внутри клеток кристаллы магнетита — магнетосомы — и поэтому чувствительные к магнитному полю Земли.

От магнитотактических бактерий следует отличать анаэробные магнетит-образующие анаэробы, для которых образование магнетита служит катаболическим процессом. Они были открыты Д. Ловли (D. Lovley). Часть из них, как упомянутый *Geobacter*, близки сульфатредукторам, но многие относятся к совсем другим группам. Среди анаэробных магнетит-образующих бактерий многие используют водород для восстановления ферригидрита и являются эффективными гидрогенотрофами. Как показала Д. Заварзина, образование магнетита происходит у них вне клетки в процессе диагенеза из аморфного предшественника.

К литотрофным организмам следует отнести водородные бактерии, принадлежащие к разным таксономическим группам. Такие же сборные группы представляют и другие газотрофы, окисляющие  $H_2$ ,  $CO$ ,  $CH_4$  и метилированные соединения.

Водородные бактерии в 9-м издании Определителя Берджи отдельной секции не образуют. Энергетически обмен этих организмов основан на обратимой реакции гидрогеназы:



которая легко сочетается с электронтранспортной цепью. Основным продуктом обмена является  $H_2O$ . Субстрат роста —  $H_2$  — служит характерным продуктом обмена первичных анаэробов. Для литоавтотрофного роста необходима автотрофная ассимиляция  $CO_2$ , которая осуществляется через рибулозобисфосфатный цикл. Гидрогенотрофная автотрофия широко распространена среди бактерий, получивших название «гидрогеномонады». На самом деле среди них много очень разнообразных по положению организмов. Почти все они органотрофы, использующие преимущественно органические кислоты и, что характерно, формиат, но не метанол. Основной моделью водородных бактерий послужил *Alcaligenes eutrophus*, обмен которого был изучен Г. Шлегелем (H. Schlegel) и его сотрудниками в Гёттингене. В числе водородных бактерий следует отметить псевдомонады *Acidovorax* («*Hydrogenomonas facilis*»), *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Paracoccus*. Среди других форм — *Aquaspirillum*, *Ancyclobacter*, *Flavobacterium*, азотфиксирующие организмы *Rhizobium*, *Derrisia*, обязательно обладающие гидрогеназой. К грамположительным водородным бактериям относятся *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*. Штамм *Alcaligenes eutrophus* Z-1 был использован Т. Воловой в Красноярске для производства белка на водороде в сопряженной реакции с электролизом воды.

Особую группу составили экстремально термофильные роды *Hydrogenobacter* (*Calderobacterium*), *Aquifex*. Они развиваются при температуре более  $70^\circ C$ , относятся к очень глубокой филогенетической ветви бактерий и обладают необычным путем ассимиляции  $CO_2$ . Выделенный из термофильного циано-бактериального мата на Камчатке штамм *Calderobacterium* был использован для производства биомассы на водороде при температуре  $70^\circ C$ , когда исключен рост условно патогенных форм. Штамм оказался очень технологичным, с высоким содержанием цитохрома с, сходного с бычьим.

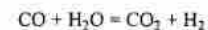
Мы не будем обсуждать здесь обширную группу анаэробных гидрогенотрофов, включающую гомоацетатные бактерии, водородные метаногены, сульфатредукторы, магнетит-образующие бактерии.

**Карбоксидактерии** осуществляют суммарную реакцию:



В большинстве это аэробные водородные бактерии, способные к использованию  $CO$  под действием специфического металл-содержащего фермента. Типичными представителями этой медленно растущей группы являются *Carboxydomonas*, *Zavarzinia* и некоторые другие роды.

От аэробных карбоксидактерий следует отличать недавно открытую у нас В. Светличным группу анаэробных карбоксидактерий, использующих в качестве окислителя воду по реакции:



с типичным представителем *Carboxydotherrnus hydrogeniformans*, термофильным организмом, использующим в качестве субстрата только  $CO$ .

**Метанотрофы** осуществляют реакцию:



которая, несмотря на кажущуюся простоту, требует высокой энергии активации и поэтому доступна лишь специфической группе организмов. Открытые в 1906 г. Н. Зённеном (N. Söhngen), они долгое время не были объектом интенсивных исследований и лишь с 1960-х гг. привлекли интерес после описания Р. Виттенбери (R. Whittenbury) их разнообразия, с последующим изучением биохимических путей метилотрофии и использованием для производства белка одноклеточных на природном газе, а также для контроля за эмиссией парникового газа метана. Ключевым ферментом обмена служит медь-содержащая метанмонооксигеназа (ММО), окисляющая  $CH_4$  в метанол по реакции:



где  $X$  — клеточный донор электрона.

От образования метанола пути его метаболизма оказываются сходными для **метилотрофов** — организмов, использующих метилированные соединения. Метанол окисляется метанол дегидрогеназой в формальдегид, который используется в анаболизме для построения углеродных скелетов по двум разным путям — рибулозомонофосфатному или сериновому.

Метанотрофы хорошо распознаются под микроскопом, представляя довольно крупные клетки, темные в фазовом контрасте

из-за пачек внутриклеточных мембран. Метанотрофы — строго специализированные организмы, имеющие высокое сродство к метану и способные извлекать его из атмосферы при концентрации 1700 ppb. Известные метанотрофы представлены нейтрофильными и мезофильными организмами. Они разделяются на две группы:

1. *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylococcus* — аэробные палочки и кокки с рибулозомонофосфатным путем анаболизма, образующие цисты;

2. *Methylocystis*, *Methylosinus* — почкующиеся или изогнутые палочки с сериновым путем анаболизма, склонные к микроаэрофилии. Для *Methylosinus* известна способность образовывать экзоспоры.

До последнего времени не были известны метанотрофы, способные развиваться в экстремальных условиях. Только недавно у нас найдены ацидофильные формы, растущие при pH 4–5, алкалофильные и психрофильные организмы с оптимумом вплоть до 2°C.

Метилотрофы разделяются на облигатные и факультативные, к последним принадлежат представители различных групп бактерий и некоторые дрожжи, использующие метилированные соединения.

**Почкующиеся бактерии и простекобактерии.** В эту группу (группа 13) попали бактерии с выраженным жизненным циклом, в котором различаются материнская и дочерняя клетки. В типичном случае материнская клетка последовательно образует подвижные дочерние клетки, которые образуют стадию расселения и должны претерпеть созревание, прежде чем приступить к размножению.

Почкующиеся бактерии, в наиболее типичном случае, представлены **гифомикробами**, у которых имеется длинный вырост клетки диаметром около 0,2 мкм (гифа-простека), на конце которой образуется небольшое вздутие, превращающееся в подвижную клетку со жгутиком. Эта клетка отрывается и уплывает, а на ее месте образуется новая. Подвижная клетка прикрепляется, теряет жгутик и образует гифу, на конце которой образуется почка. В некоторых случаях гифы ветвятся. Вместо почки иногда образуются устойчивые к высушиванию экзоспоры. К гифомикробам принадлежат метилотрофный *Hyphomicrobium*, органотрофный

*Hyphomonas*, разлагающий почвенные гумусовые комплексы *Pedomicrobium*, упомянутый выше пурпурный несерный *Rhodomicrobium*, галофильный *Dichotomicrobium*.

К микроорганизмам, у которых почка образуется непосредственно на материнской клетке, относятся физиологически разнообразные *Nitrobacter*, *Blastobacter*, *Methylosinus*, *Rhodopseudomonas*. Такой тип строения часто связан с наличием чашевидной пачки мембран, которая не может быть разделена надвое при делении и остается в материнской клетке, в то время как дочерние синтезируют новую.

**Простекобактерии** представлены грамтрицательными организмами с нитевидными выростами клетки. В эти выросты входит цитоплазма и таким образом поверхность клетки и пространство перипласта существенно увеличиваются. Морфология этих организмов сначала была изучена в электронном микроскопе Д. И. Никитиным как «необычных микробов». Сейчас имеется хорошее представление о распространении и деятельности этих организмов в почве и водоемах благодаря работам П. Хирша (P. Hirsch), Дж. Сталей (J. Staley), Л. Васильевой, которым удалось выделить их культуры. Большинство простекобактерий относится к олиготрофам, развивающимся при крайне низкой концентрации питательных веществ в среде. Типичным представителем их служат **каулобактеры**, удлинённые изогнутые клетки которых несут одну простеку с прикрепительным диском на конце. Дочерняя клетка со жгутиком образуется делением и освобождается от прикрепленной материнской клетки, плавает, затем прикрепляется и образует простеку, часто объединяясь в виде розетки. Каулобактеры были обнаружены в олиготрофных озерах и в дистиллированной воде лабораторий, где они попадали на сетки для электронной микроскопии. К каулобактерам относятся несколько видов *Caulobacter*, *Asticcacaulis* — олиготрофных аэробных органотрофов с широким спектром используемых веществ. *Prostheco bacter* не имеет подвижной стадии и напоминает две клетки, соединенные доньшками. Несколько простек имеют виды *Prosthecomicrobium*, *Ancalomicrobium*. Плоская *Stella* имеет вид шестилучевой звезды. *Labrys* имеет форму дулезовидного топора.

**Планктомицеты (подгруппа 2 группы 13)** — своеобразные водные организмы, размножающиеся почкованием, тоже рассматриваются как олиготрофные органотрофы. Они с трудом поддаются культивированию, но некоторые из них удалось выделить Х. Шлесснеру (H. Schlessner), и они были выделены в самостоятельный класс в 16S рДНК системе. Наиболее известен из них *Planctomyces* («*Gallionella kljasmiensis*»), представляющий собой кокки на слизистых стебельках, собранные в розетку, и размножающийся образованием почек на противоположном стебельку конце. Планктомицеты имеют много особенностей, отличающих их от типовых бактерий. Одной из принципиальных особенностей планктомицетов служит наличие у них пиреллусомы — мембраны вокруг нуклеоида, двойной у *Gemmata* и одиночной у *Pirellula*. Наличие ядерной мембраны обуславливает их сходство с зукариотами. Клеточная стенка у них белковая. Судя по олигонуклеотидным пробам планктомицеты составляют значительную часть бактериального населения природных сред.

**Нитчатые бактерии с чехлом (группа 14)** являются массовыми водными формами. Типичным представителем их служит «водный гриб» *Sphaerotilus*, образующий белесые, а чаще серые обрастания в загрязненных водах. Он представляет собой цепь псевдомонад, заключенных в общий трубчатый чехол и благодаря этому удерживающихся в потоке. Аналогичные организмы, чехлы которых инкрустируются окислами металлов, относятся к *Leptothrix*. В азотенках вспухание активного ила обуславливает нитчатый *Haliscamenobacter*. Наконец, в текущих водах и колодцах встречается *Crenothrix* с расширяющимся к концу чехлом, где происходит образование мелких клеток дроблением.

**Скользящие бактерии (группы 15, 16)** разделяются на большие группы одноклеточных цитофаг и трихомных бактерий. Причиной объединения их послужил способ движения: при контакте с твердой фазой они могут скользить по ней, как это свойственно и цианобактериям. Жгутиков у них нет.

**Цитофаги** разлагают полимеры, такие как целлюлоза или хитин. Колонии их на агаризованных средах расплзаются, образуя «шварм», и часто окрашены в желтый цвет, который при обработке 20%-ным раствором КОН становится пурпурным, указывая на присутствие характерного каротиноида флексирубина. Цитофаги

относятся к важнейшим аэробным целлюлозоразлагающим организмам. За гидролиз целлюлозы ответственны связанные с мембраной эндогликоказы и периплазматические экзогликоказы. Поэтому клетки должны осуществлять тесный физический контакт с волокнами полимера. Клетки цитофаг обычно длинные, гибкие, с приостренными концами. В группу цитофаг входят собственно *Cytophaga* и *Sporocytophaga*, образующая крупные микроцисты.

К цитофагам относят также длинные нитевидные пресноводные *Flexibacter* и морские *Microscilla*. Многие из этих организмов синтезируют активные гидролитические ферменты, позволяющие им лизировать структурные белки вплоть до кератина. Некоторые скользящие бактерии, например *Lysobacter*, способны лизировать клетки бактерий, образуя на газоне расплзающиеся негативные пятна, подобные тем, которые оставляют за собой амёбы.

**Трихомные скользящие бактерии**, помимо рассмотренной с серобактериями группы беггнатоа, включают органотрофные формы как аналог формидиумов *Herpetosiphon*, аналог осцилляторий *Vitreoscilla*, аналог тиотриков *Leucothrix*, поэтому их часто обозначали как «бесцветные водоросли», имея в виду синезеленые. Они в большом количестве наблюдаются на поверхности ила, где их способ передвижения в интерстициальной воде между частицами оказывается наиболее удобным. Несмотря на их обилие и разнообразие, лишь немногие представители этой важной группы бактерий изучены.

**Миксобактерии (группа 16)** привлекли к себе внимание способностью образовывать плодовые тела, состоящие из экскретуемых ими полисахаридов и входящих в них устойчивых миксоцист (или, иначе, микроцист). Миксобактерии обладают не только индивидуальной способностью к дифференциации от вегетативной клетки до покоящихся микроцист, но и коллективной дифференциацией, приводящей к образованию из колонии оформленного плодового тела, как у зукариотных миксомицетов. Вегетативные клетки миксобактерий представлены одиночными скользящими палочками с заостренными или тупыми концами, размножающимися делением перетяжкой и образующими координированно движущуюся колонию (шварм); подобно миксомицетам и акразиям. Передовые клетки выделяют слизь, и последующие движутся за



ними по слизистому следу. Опознаются колонии миксобактерий по ярко окрашенным плодовым телам, составляющим спорангии, иногда приподнятые над поверхностью на стебельках и имеющие размеры до 1 мм.

Миксобактерии — аэробные органотрофы с выраженной гидролитической активностью. Особенностью миксобактерий является их способность коллективно лизировать твердые частицы с помощью гидролитических ферментов. Часть из них обладает протеолитической способностью и лизирует клетки бактерий, попадающие под шварм. Поэтому миксобактерии относят к хищным бактериям. Однако некоторые миксобактерии способны лизировать также целлюлозу. Часто они развиваются на навозе. В чистой культуре поддерживать удается только часть родов, и в природе их идентифицируют по спорангиям.

Основные роды миксобактерий следующие: не образующие спорангиев миксобактерии с веретеновидными клетками рода *Mucosoccus*, у которого наиболее подробно изучена дифференциация в круглые микроцисты; *Archangium* с палочковидными микроцистами; *Cystobacter*, образующий спорангии без стебелька; *Mellitangium* и *Stigmatella*, — на стебельке. Клетки с прямыми концами имеет целлюлозолитический *Polyangium*, образующий округлые спорангии. Сложные плодовые тела имеют *Nannocystis* и *Chondromyces*.

**Грамположительные кокки (группа 17).** Микрококки составляют обширную группу органотрофных бактерий с аэробными *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, издавна различаемыми по форме агрегатов клеток и хорошо известными своими патогенными представителями. К анаэробным коккам, осуществляющим разные брожения, относятся молочнокислые стрептококки, крупная анаэробная *Sarcina ventriculi* — обитатель желудка при крайне низком pH, обитатели рубца — разнообразные *Ruminococcus*, а также сбраживающие азотистые соединения *Peptococcus*.

Совершенно самостоятельную филогенетическую ветвь образуют дейнококки (род *Deinococcus*), чрезвычайно устойчивые к радиации.

**Образующие эндоспоры грамположительные организмы (группа 18).** Бациллы и клостридии относят к двум родам: аэробным *Bacillus* и анаэробным *Clostridium*, обычно представленным довольно крупными палочками с перитрихальным жгутикованием. Благодаря наличию термоустойчивых спор, они относительно легко выделяются в лабораторные культуры после прогревания в течение 5 мин при 80 °С. Это массовые формы копитрофов-колонизаторов, споры которых составляют резерв готовых к размножению зародышей. По своим физиологическим функциям виды этих морфологических родов чрезвычайно разнообразны. Спорообразующие организмы представляют преимущественно почвенные формы, поскольку эндоспоры являются приспособлением к высушиванию. В большинстве своем бациллы представлены органотрофами, использующими широкий круг органических веществ. Клостридии более специализированы и осуществляют разнообразные брожения, в типичном случае — маслянокислое. Они послужили моделью для изучения разных брожений — пуринов, аминокислот, а также гомоацетатного. Многие из них обладают мощными гидролазами и сбраживают полимерные углеводы, например, целлюлозу, как *Clostridium thermocellum*. Первым среди свободноживущих азотфиксаторов был открыт *C. pasteurianum*, но в общем это свойство присуще многим анаэробным клостридиям. В настоящее время большие ветви клостридий разделены на группы с низким и высоким Г + Ц, генетически крайне различные, и происходит быстрое их дробление на множество родов. Специализированную группу среди анаэробных спорообразующих грамположительных организмов составляют сульфатредуцирующие *Desulfotomaculum*.

**Неспорообразующие грамположительные палочки правильной формы (группа 19)** в основном представлены родом *Lactobacillus*, и по нему их обычно называются **лактобациллами**. Они осуществляют молочнокислое брожение и относятся к азототолерантным анаэробам. Сюда же относится ряд менее известных родов, часто отличающихся по форме, как, например, образующий многоклеточные трихомы *Caryophanon*.

**Корнеформы.** Это грамположительные палочки неправильной формы (группа 20), иногда склонные к ветвлению. Наиболее

многочисленный и разнообразный род *Corynebacterium* представлен аэробными органотрофами. Очень разнообразны артробактеры *Arthrobacter*, аналогичные по своим функциям псевдомонады и широко распространенные в холодных почвах тундры. К коринеформам принадлежит и целлюлозолитический *Cellulomonas*.

Анаэробные организмы в этой группе представлены органотрофными неспоровыми бактериями: маслянокислыми *Eubacterium*, *Butyrivibrio*, гомоацетатными *Acetobacterium*, молочнокислыми *Bifidobacterium*, пропионовокислыми *Propionibacterium*, термофильными *Thermoanaerobacter*, осуществляющими разнообразные брожения с выделением  $H_2$  и образованием различных жирных кислот.

**Микобактерии (группа 21).** В группу входят кислотоустойчивые (по окраске) органотрофные палочки *Mycobacterium* с характерным составом липидов оболочки.

**Нокардиеформы (группа 22).** Эта группа организмов близка олигоспоровым актиномицетам и включает склонные к образованию ветвящихся форм и слабо развитого мицелия грамположительные организмы, опознаваемые по «сухим», не покрытым слизью колониям, выдерживающим прямой контакт с воздухом. Типовым родом группы служит *Nocardia*, которую можно рассматривать как типичного представителя «автохтонной» микрофлоры, способной использовать органические вещества «черного пара», т. е. устойчивые вещества, остающиеся в конце процесса деструкции. Органотрофные *Rhodococcus*, несмотря на свое название, не имеют ничего общего с пурпурными несерными бактериями, представляя собой аэробные, относительно медленно растущие органотрофы, известные своей способностью эффективно использовать углеводороды нефти. Коринебактерии, нокардиеформы, стрептомицеты представляют ряд морфологически усложняющихся организмов, приспособленных к существованию в засушливых почвенных условиях и приобретающих для распространения способность к образованию воздушного мицелия и колоний как стадии расселения. В 9-м издании Определителя Берджи остальные актиномицеты попали в секции 23–28.

**Геодерматофилы и франкии (группа 23)** рассматриваются как не образующие мицелия актиномицеты. Представители рода

*Geodermatophilus* широко распространены в почве и развиваются в виде микроколоний, сложенных паренхиматозной массой клеток, часто окрашенной в черный цвет. Это аэробные органотрофы, скорее всего, олигокарбофильные. На поверхности микроколоний некоторые клетки почкованием образуют подвижные грушевидные клетки, которые служат стадиями расселения. Вследствие своего сходства с патогенным *Dermatophilus*, этот организм не стал объектом детальных исследований дифференциации у прокариот.

*Frankia* представляет азотфиксирующий симбионт ольхи, образующий на ее корнях клубеньки, подобно ризобиям. У нее имеется типичный воздушный мицелий со спорангием, разделенным на много спор. Этот эффективный симбиотический азотфиксатор с трудом поддается культивированию.

**Актинопланы (группа 24),** или водные актиномицеты, имеют развитый мицелий, как субстратный, так и воздушный. Споры образуются в мешковидном спорангии и в нем переживают высушивание. Однако при увлажнении споры выходят наружу в виде подвижных жгутиковых клеток. Актинопланы часто развиваются на пыльце растений, плавающей на поверхности воды в нейстоне, и способны разлагать воскоподобные соединения кутикулы. Сюда относятся роды *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*.

**Стрептомицеты (группа 25).** Именно для них прочно укоренилось тривиальное название актиномицеты, составляющее резкое противоречие с бактериологической номенклатурой, поскольку родовое название *Actinomyces* было изначально присвоено анаэробным патогенным организмам. Актиномицеты характеризуются развитым мицелием из ветвящихся гиф и имеют общее строение, совершенно аналогичное эукариотным грибам, но с гораздо более тонкими прокариотными гифами, содержащими много нуклеоидов и не всегда разделенными на отдельные клетки. Это, прежде всего, почвенные организмы. Актиномицеты приспособлены к развитию в относительно засушливых условиях на твердом субстрате и соответственно обладают выраженной гидrolитической активностью по отношению к разным полимерам, но особенно выражена хитинолитическая активность с развитием

актиномицетов по отмершему грибному мицелию. Мицелий актиномицетов делится на субстратный и, предназначенный для размножения, воздушный. Гифы воздушного мицелия имеют предохраняющую от высушивания оболочку; на концах гиф образуются конидиоспоры (термины «конидии» и «споры» тоже употребляются). Конидиоспоры одновременно служат и стадией, переживающей высушивание, и стадией размножения, отличаясь в этом от эндоспор бактерий, и стадией расселения, распространяемой воздушными потоками. Актиномицеты — относительно медленно растущие организмы. Все они — органотрофные аэробы и в значительной части гидролитики, использующие очень широкий круг разнообразных органических веществ. Выделяют их на средах с крахмалом и/или глицерином при высоком отношении углерода к азоту.

Соответственно форме спороносцев различают роды: *Streptomyces* с почти 500 видами, *Streptovorticillum*, *Kineospora*, *Sporichthya*. Актиномицеты явились объектом крайне интенсивных исследований в поисках образуемых ими антибиотиков, которые, предположительно, обеспечивают в природе их конкурентоспособность. Для биотехнологии они очень важны, поскольку примерно половина антибиотиков образуется этой группой.

**Мадуромицеты или олигоспоровые актиномицеты (секция 26)** имеют такое же мицелиальное строение, как и другие актиномицеты, но в отличие от них образуют небольшое число конидий. Роды различаются прежде всего по форме конидионосцев. Это *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, названия которых говорят сами за себя.

**Термоактиномицеты (секции 27 и 28)** выделены по их способности к умеренной термофилии.

**Микоплазмы (секция 30).** К ним относят организмы, лишенные клеточной стенки и ограниченные только мембраной. Поэтому форма клеток у них менее определенная, чем у других бактерий. Обычно это очень мелкие организмы размером до 0,2 мкм в диаметре. На ультратонких срезах они опознаются по отсутствию клеточной стенки. *Mycoplasma mycoides*, обладательница самого

маленького генома, имеет кокковидные клетки, иногда с нитевидными выростами. Паразит растений *Spiroplasma* получила название из-за спиральной формы. Большинство микоплазм развивается в межклеточном пространстве тканей животных, растений, колоний бактерий и являются паразитами, хотя *Acholeplasma laidlawii* — распространенный сапрофит, а *Thermoplasma* — встречается в гидротермах и саморазогреваемых кучах угля. Термоплазма может служить хорошим примером параллелизма в морфологии, потому что эта «микоплазма» на самом деле относится к архебактериям. Культивируют микоплазмы на сложных средах с включением сыворотки, на плотных средах они образуют колонии в виде «яичницы-глазуньи». Сначала микоплазмы рассматривали как наиболее примитивных бактерий и относили к порядку Mollicutes. По филогенетической системе они относятся к ветви клостридий. В микоплазмо-подобное состояние переходят грамположительные бактерии с подавленным синтезом клеточной стенки, образующие сферопласты.

## 5. АРХЕБАКТЕРИИ

Морфологически архебактерии, кратко обозначаемые как археи, не имеют резких отличий от эубактерий. При большом навыке можно отличить их клетки по некоторой угловатости, но эти отличия не выходят, например, за пределы отличий азотобактера от псевдомонад. Цитологические отличия их клеток с типично прокариотным строением так же не существенны. Физиологически многие архебактерии относятся к организмам, развивающимся в экстремальных условиях, — экстремофилам. Архебактерии осуществляют такие уникальные процессы, как метаногенез; особый тип фотосинтеза с участием бактериородопсина; использование серных соединений. Основное отличие архей от эубактерий — в аппарате синтеза белка.

Архебактерии отличаются от эубактерий по ряду хемотаксономических признаков. Их мембраны содержат не эфиры глицерина и жирных кислот, а этерифицированы изопреноидами. У эубактерий и эукариот изопреноиды содержатся в боковых

цепях хинонов, хлорофиллах, образуются при синтезе холестерина и каучука, но не входят в мембраны. В клеточной стенке архебактерий цепи полисахаридов и глюкозамина соединены пептидами с иным набором аминокислот, чем у бактерий с муреином, и поэтому получили название псевдомуреина. Ингибиторы синтеза муреиновой клеточной стенки (антибиотики пенициллин, цикloserин, ванкомицин, цефалоспорин) не действуют на архебактерий. У многих архебактерий клеточная стенка сложена белковыми глобулами, образующими так называемый S-слой, хорошо различимый на электронных фотографиях как упорядоченная поверхность, напоминающая вышивку бисером. S-слой чувствителен к детергентам. Такой же слой свойственен ряду бактерий как дополнительное образование на поверхности, а у планктомицетов S-слой служит основной структурой стенки.

РНК-полимераза архебактерий, как и у эукариот, содержит 9–12 субъединиц, а не 4, как у эубактерий. Поэтому археи нечувствительны к рифампицину, ингибирующему в низких концентрациях бактериальную РНК-полимеразу. Синтез белка не подавляется у архей хлорамфениколом, циклогексимидом, стрептомицином. Тетрациклин действует на архебактерии гораздо слабее, чем на эубактерии.

Архебактерии входят в три фенотипические группы: 1) метанобразующих организмов, 2) экстремальных галофилов, 3) экстремальных термофилов. В 9-м издании «Определителя бактерий Берджи» архебактерии составляют группы 31–35.

**Метаногены (группа 31)** осуществляют уникальную в живом мире реакцию синтеза метана и играют важнейшую роль в биосферных механизмах. Это высокоспециализированные анаэробные организмы, для которых реакция метаногенеза служит единственным источником энергии. Окислителем в реакциях метаногенеза является  $\text{CO}_2$ . Соответственно донорам электрона, метаногены разделяются на три группы: 1) водородные (гидрогенотрофные); 2) ацетокластические; 3) метилотрофные, окисляющие метилированные соединения с группой O, N, S. Политрофная метаносарцина, способна использовать все три пути. Соответствующие реакции приведены ниже с указанием дополнительных соединений, используемых некоторыми представителями каждой группы:

	$\Delta G^{\circ}$ , кДж/моль $\text{CH}_4$
водородные:	
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 = \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130
$4\text{HCOOH} = \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-119
$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$	-185
ацетокластические:	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ = \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-32
метилотрофные:	
$4\text{CH}_3\text{OH} = 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-103
$4\text{CH}_3\text{NH}_3^+ + 2\text{H}_2\text{O} = 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	-74
$2(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+ + 2\text{H}_2\text{O} = 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4^+$	-74
$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6\text{H}_2\text{O} = 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	-74
$2(\text{CH}_3)_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} = 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{S}$	-49

Кроме того, некоторые метаногены способны использовать в качестве доноров водорода высшие спирты, но пока неизвестно, играет ли эта реакция существенную роль.

Метаногены относятся к строгим анаэробам и быстро погибают при контакте с воздухом. Они послужили моделью для отработки методики работы с облигатными анаэробами в атмосфере инертного газа, с предварительно восстановленной средой, получившей название методики Хангейта.

Морфологически метаногены очень разнообразны: среди них есть палочки *Methanobacterium* с клеточной стенкой из псевдомуреина, кокки *Methanococcus* с белковой клеточной стенкой, плоские угловатые формы *Methanohalobium*, псевдопаренхиматозные агрегаты *Methanosarcina* с гетерополисахаридом, цепи палочек в трубчатых чехлах *Methanothrix* (*Methanosaeta*) и спирали *Methanospirillum* с белковой клеточной стенкой. В таксономии метаногенов употребляется обозначение *Methano-*, в отличие от аэробных метанооксиляющих метанотрофов *Methylo-*; словосочетание «метановые бактерии», хотя и должно относиться только к метанобразующим, может быть неправильно понято.

Обычным местообитанием метаногенов являются донные отложения водоемов, пищеварительный тракт растительноядных животных, в особенности рубец жвачных, гидротермы с  $\text{H}_2$ . За исключением последнего случая, метаногены зависят от анаэробного микробного сообщества, продуцирующего те немногие субстраты,

которые они могут использовать, в особенности ацетат. Особый случай составляет симбиоз метаногенов, в том числе внутриклеточный, с анаэробными протистами, для которых они составляют терминальный сток  $H_2$ . В анаэробном микробном сообществе они замыкают трофическую цепь, потребляя ацетат и  $H_2$ . Метаногены чрезвычайно важны для биогеохимии, потому что служат главным источником метана на Земле.

Широкое применение анализа по 16S рРНК привело к очень дробной систематике метаногенов на уровне крупных таксонов с созданием порядков: гидрогенотрофных *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, морских *Methanomicrobiales*, ацетокластических и метилотрофных *Methanosarcinales*.

Механизм образования метана оказался совершенно своеобразным, он представляет ступенчатое восстановление  $CO_2$  с участием специфических ферментов, переносчиков  $C_1$ -группы, переносчиков электрона. Основным переносчиком служит производное флавина — фактор  $F_{420}$ , получивший свое название по максимуму поглощения. В окисленном состоянии он обладает сильной зеленой флуоресценцией и по этому признаку метанообразующие бактерии, кроме ацетокластических, легко опознаются в люминесцентном микроскопе. Однако некоторые другие организмы, богатые флавинами, дают аналогичное свечение, поэтому автофлуоресценцию следует считать указанием на весьма вероятное присутствие метаногенов, но не доказательством.

Открытие пути метаногенеза стало одним из последних достижений биохимии путей метаболизма микробов. Энергетический обмен у метаногенов, приводящий к образованию АТФ, обусловлен хемиосмотическим механизмом с участием протонной (иногда натриевой) помпы и, таким образом, относится к дыхательным процессам.

Метаногены не нуждаются в экзогенном органическом веществе и относятся к автотрофам. Образование биомассы идет в общем по обычным для анаэробов путям через синтез ацетата с участием  $CO$ -дегидрогеназы, аналогично процессам у гомоацетатных бактерий. Центральный метаболизм не имеет существенных отличий. В восстановительной зоне, где развиваются метаногены, для азотфиксации нет таких препятствий, как в аэробной зоне, и она распространена у метаногенов.

Метаногены развиваются при очень низком  $Eh$ , в термодинамическом поле устойчивости метана. Поле рН для них совпадает с областью бикарбонат-иона, и соответственно они являются нейтрофилами. Исключение составляет метилотрофный алкалофил *Methanosalsus*, развивающийся в содовых водоемах. Ацидофильные метаногены пока не идентифицированы.

По отношению к температуре большинство метаногенов является мезофилами с нижней границей около  $15^\circ C$ . Поиски психрофилов или психроактивных форм затруднены из-за крайне медленного роста, но такие организмы существуют. Так, психрофильный метаноген *Methanococcoides burtonii* имеет минимальную температуру роста  $-2,5^\circ C$  при максимальной —  $+28^\circ C$ . Среди метаногенов много термофилов, в том числе и экстремальных, развивающихся в гидротермах при температуре до  $98^\circ C$ , как *Methanopyrus*,  $85^\circ C$ , как *Methanothermus*, *Methanocaldococcus*,  $70^\circ C$ , как *Methanobacterium thermoautotrophicum*, послужившая важнейшей моделью для исследования метаногенов.

По отношению к минерализации среды метаногены делятся на группы пресноводных, к которым относится большинство метанобактерий и метаносарцин; морских метаномикробов, галофильных метилотрофов, в том числе экстремальных, как *Methanohalobium*.

**Экстремальные галофилы (группа 33)** представлены небольшой группой археобактерий (галообактерий), развивающихся в рассолах при содержании  $NaCl$  не менее 10% (или 1,8M) и вплоть до насыщения, когда они доминируют. При понижении концентрации солей они лизируются. К ним относятся палочковидные *Halobacterium*, кокковидные *Halococcus*, плеоморфные, иногда в виде «кусочков битого стекла», *Haloarcula*, *Haloferax*. Группа натронобактерий *Natronobacterium* и *Natronococcus* развивается при рН 10 и насыщении раствора содой. Галообактерии развиваются в лагунах или соляных чеках, где испарение приводит к концентрации солей и сопутствующему этому накоплению органических веществ, позволяющему отнести эти организмы к копитрофам. Галообактерии окрашены в вишневый цвет каротиноидами и придают рассолу яркую окраску, по которой они были впервые обнаружены на соленой рыбе.

Галобактерии вынуждены поддерживать высокое осмотическое давление в клетке и осуществляют это посредством создания в клетке высокой концентрации KCl, вплоть до 5 М, в то время как Na выкачивается из клетки. Все ферменты организма должны работать при такой концентрации солей.

Галобактерии являются аэробными органотрофами, использующими широкий круг органических веществ: аминокислоты, углеводы, органические кислоты. Они обладают несколько измененными биохимическими путями использования сахаров и полным циклом трикарбоновых кислот. Некоторые способны развиваться анаэробно, сбраживая аргинин, как *Halobacterium salinarum*. *Halobacterium* не составляет большинства среди обитателей гиперсоленых водоемов, но виды этого рода могут быть селективно выделены в анаэробных условиях на среде с аргинином.

Особое внимание привлек своеобразный тип фотосинтеза, осуществляемый галобактериями с участием бактериородопсина, комплекса белка с пигментом ретиналем, сходным со светочувствительным пигментом глаза. Под воздействием света бактериородопсин претерпевает изменения, позволяющие ему функционировать как протонная помпа, что приводит к энергизации мембраны и образованию АТФ. Этот тип фотосинтеза связан с высокими интенсивностями света, которые и наблюдаются в испарительных прудах и лагунах. Фотосинтез у галобактерий выполняет роль дополнительного источника энергии при органотрофном типе обмена.

Развиваясь в очень своеобразных условиях лагун и образования отложений эвапоритов, галобактерии представляют типичный пример экстремофилов — организмов, растущих в условиях, не пригодных для большинства других живых существ.

**Экстремальные термофилы (группа 35), Crenarchaeota**, представляют собой обитателей гидротерм и наиболее тесно связаны с эндогенными процессами в геосфере. Первоначально эти организмы были исследованы Т. Броком (Т. Brock) в термальном источнике Октопус Спринг в Йеллоустонском парке в США. В России нами была изучена кальдера Узон на Камчатке, где развиваются термофильные циано-бактериальные маты. Затем В. Циллиг (W. Zillig) и К. Штеттер (K. Stetter) исследовали, казалось бы без-

жизненные, кипящие грязевые котлы в Исландии и обнаружили в них массу кокковидных бактерий. Это послужило стартовой точкой для интенсивных исследований К. Штеттера, описавшего множество гипертермофилов, развивающихся при температуре в диапазоне 80–110 °С и относящихся к организмам с наиболее глубокой точкой ветвления по 16S рРНК филогении. Особое значение гипертермофилы приобрели с изучением подземной биосферы, открытой при бурении глубоких скважин для добычи нефти и газа, как организмы, развивающиеся в подземных водах на большой глубине, вплоть до 3 км, где геотермический градиент приводит к высоким температурам, вплоть до 100 °С. Организмы, развивающиеся при температуре выше 90 °С. Штеттер предложил называть гипертермофилами и обозначать термином *Pyro*.

Экстремально термофильные археи составляют самостоятельную ветвь на филогенетическом дереве архей и получили название Crenarchaeota, в связи с тем что растут в потоке гидротермальной воды и газа. Действительно, для многих из них важно удаление продуктов обмена.

Большинство гипертермофилов (но не все, например, упомянутые выше метаногены) связаны с обменом серы и относятся к сульфидогенам. Многие способны использовать H<sub>2</sub> и растут литотрофно, другие относятся к органотрофам, использующим небольшие полимеры, как пептон или крахмал.

Среди кренархеот следует выделить группу аэробных ацидофильных организмов, развивающихся на богатых серой вулканических площадках, получивших название сольфатар. Эти ацидофильные термофилы были открыты Т. Броком и названы *Sulfolobus*. Впоследствии к этой группе присоединили еще несколько родов. Сульфолобусы имеют форму неправильных кокков и растут при pH 1–5, предпочтительно при pH 2–3, и температуре от 60 до 90 °С. Обмен сульфолобусов очень разнообразен. Они могут расти органотрофно, окисляя органические вещества в CO<sub>2</sub>; литоавтотрофно, окисляя серу в серную кислоту, подобно тиобациллам или окисляя сульфиды железа в окисное железо и серную кислоту. Сходный с *Sulfolobus* другой род ацидофильных термофильных археобактерий, *Acidianus*, может расти и анаэробно, обладая способностью к сероредукции и восстанавливая S<sub>0</sub> в H<sub>2</sub>S.

Анаэробный нейтрофильный органотрофный *Desulfurococcus* принадлежит к сероредуцирующим органотрофам. Такими же свойствами обладают *Thermococcus*, палочка *Thermoproteus*, длинная нить *Thermofilum*, гипертермофил *Pyrococcus furiosus*. Органотрофные экстремальные термофилы используют преимущественно разнообразные протеины и по типовому роду *Thermoproteus* образуют порядок *Thermoproteales*. Все эти организмы, различающиеся по оптимальной температуре роста, восстанавливают серу и используют ее как сток для водорода при анаэробном полном окислении органических веществ. *Staphylothermus*, в виде цепочки кокков растущий на поверхности «черных курильщико-ков», сбраживает органические вещества до ацетата и изовалерата.

**Термофильная сульфатвосстанавливающая архебактерия *Archaeoglobus* (группа 32)** с оптимумом температуры около 80 °С восстанавливает сульфаты в H<sub>2</sub>S, подобно термофильной бактерии *Thermodesulfobacterium*, используя H<sub>2</sub>, лактат, пируват, глюкозу, смеси органических веществ. *Archaeoglobus* содержит компоненты, до сих пор обнаруженные только у метаногенов.

*Pyrodictium* имеет температурный оптимум при 105 °С и выделен из морских гидротерм. Он представлен округлыми диско-видными клетками, соединенными длинными нитями, которые состоят из белковых трубок, прикрепляющих организм к твердому субстрату. Это строгий гидрогенотрофный анаэроб, восстанавливающий серу и растущий литотрофно, но стимулируемый органическими веществами. Морфологически его напоминает органотрофный *Thermodiscus*.

Своеобразный организм представляет выделенная Брокком из куч саморазогревающегося угля *Thermoplasma* (группа 34) — лишенная клеточной стенки архебактерия, подобная микоплазмам. *Ferriplasma*, аналогичная по обмену *Leptospirillum ferrooxidans*, недавно открыта Г. И. Каравайко.

Если для гидрогенотрофных гипертермофильных организмов источником энергии может служить эндогенный водород земных недр, то откуда они могут получать сложные органические вещества? Возможным ответом на этот вопрос служит гипотеза «бойлера», предложенная Г. А. Заварзиным, по которой кренархеоты

получают органические вещества с конвекционным потоком воды, проходящим через их местообитание, от организмов, которые свариваются при этом (отнюдь не напоминая «первичный бульон»).

Молекулярные методы идентификации обнаружили характерные для *Stenarchaeota* клоны рДНК и показали, что организмы, филогенетически относящиеся к архебактериям, многочисленны в морском планктоне, где они составляют очень значительную часть популяции, в почвах суши, морских и пресноводных осадках, а также в числе симбионтов *Metazoa*. Все эти организмы пока относятся к некультивируемым.

## 6. ЭУКАРИОТЫ

Быстрая дифференциация наук привела к тому, что под понятием микробиология стала подразумеваться почти исключительно бактериология, в то время как другие микроскопические организмы остались в ведении альгологии, протистологии, микологии, ориентированных на описание биоразнообразия, с лишь немногими представителями микроводорослей, простейших, грибов, вовлеченными в сферу экспериментальных исследований. Наиболее удобной моделью для изучения эукариот стали дрожжи, с которыми можно работать, применяя лабораторную микробиологическую технику. Природоведческая микробиология, ориентированная на изучение деятельности микроорганизмов в природных условиях, должна оценивать процессы первичной продукции, деструкции, биогеохимических циклов вне зависимости от того, какими организмами они вызываются. Однако есть определенные основания для того, чтобы рассматривать бактерии отдельно от других микроскопических организмов, прежде всего потому, что жизнь на Земле была представлена и сформирована как определяющая часть биогеохимической системы бактериями. Примерно 1 млрд лет назад в эту систему встроились и на нее наложились процессы, обусловленные деятельностью распространившихся тогда эукариотных организмов, которые, однако, лишь модифицировали уже имевшуюся систему. Современная система

с растительным покровом на континентах начала складываться лишь около 400 млн лет назад.

Различие в клеточном строении прокариот и эукариот есть наиболее значимая граница в разнообразии живого мира. Клетка эукариот разделена мембранами на части, выполняющие определенные функции и до известной степени самостоятельные: ядро с генетическим аппаратом, митохондрию с хемотрофным энергодающим аппаратом, хлоропласт с оксигенной фотоавтотрофной функцией, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, цитоплазму. Область функционального распределения обязанностей между органеллами внутри эукариотной клетки получила название «цитобиологии». Важнейшим фактором, связывающим компоненты разделенной на части эукариотной клетки, оказывается внутриклеточный транспорт веществ, который уже не может обеспечиваться молекулярной диффузией, как в пределах малой прокариотной клетки с характерными размерами в 1 мкм, и требует концентрации взаимозависимых процессов в определенных блоках; для эукариот характерна величина клетки более 5 мкм. Эта размерная граница условна, потому что есть крупные прокариоты и мелкие эукариоты, и различие между ними устанавливается прежде всего на основе цитологической ультраструктуры; многочисленные молекулярно-биологические и хемотаксономические свойства служат коррелирующими признаками, несмотря на очень глубокие различия в протекании процессов (табл. 7).

Ключевым функциональным различием между прокариотными и эукариотными микроорганизмами оказывается способность части эукариот к фаготрофии, т. е. захвату твердых частиц или жертвы внутрь клетки. Эта способность привела к возможности построения эукариотной клетки как композитной системы из различных организмов-компонентов путем эндосимбиоза. Гипотеза эндосимбиотического происхождения эукариот, развитая Л. Маргулис (L. Margulis), получила очень убедительные молекулярно-биологические подтверждения относительно самостоятельности митохондрий и хлоропластов и их аналогии, соответственно, аэробным органотрофным бактериям и оксигенным цианобактериям. Митохондрии и пластиды произошли из прокариот, и концепция серийного эндосимбиоза хорошо поддерживается анали-

Таблица 7

Основные различия прокариот и эукариот

Признак	Прокариоты	Эукариоты
Размер	Обычно < 5 мкм	Обычно > 5 мкм
Ядро с ядерной мембраной	Нет	Есть
Хромосомы	Одна	Более одной
Половой процесс	Редко, с обменом частью генома	Обычен, с обменом хромосомами
Митохондрии	Нет	Есть
Хлоропласты	Нет	Есть у части
Рибосомы	70S	80S
Тип питания	Широкое разнообразие	Аэробная органогетеротрофия, оксигенный фотосинтез у части
Поступление пищи	Осммотрофия	Осммотрофное (сапротрофное) или зоотрофное (фаготрофное)

зом рРНК и белков. Но эта картина сильно осложняется вторичными эндосимбиозами, характерными для эволюции протистов, в том числе и с эукариотными организмами, превращающимися в пластиды с многочисленными мембранами, как у динофлагеллят. Комбинаторное, а не последовательное, происхождение крупнейшей группировки живых существ принципиально влияет на понимание хода макроэволюции. Понимание симбиогенеза, как важнейшего явления в биологии, служит границей между традиционным филогенетическим и функциональным подходами.

Граница между микробиологией как наукой, изучающей микроорганизмы, и остальными разделами биологии лежит на этапе образования ткани, которую следует считать свойством макроорганизмов. В отличие от границы между прокариотами и эукариотами, появление ткани представляет постепенный переход от недифференцированной или слабо дифференцированной колонии



к дифференцированному целостному организму. Этот переход осуществлялся многократно в разных линиях живых существ, создавая параллельные ряды следующих общим закономерностям морфологической дифференциации организмов. Наиболее известным примером служат параллельные ряды красных, бурых, зеленых водорослей, морфологическая система которых была разработана в 1920-х гг. альгологами.

Постепенность переходов между макроорганизмами и эукариотными микроорганизмами сделала последние естественными объектами ботаников и зоологов с их традициями и накопленной огромной суммой знаний о биоразнообразии, преимущественно на основе морфологической идентификации, сведениях о распределении по местообитаниям и соответственно экологическим характеристикам. Условно эукариотные микроорганизмы объединяют под названием протистов (Протисты / Под ред. А. Ф. Алимова. 2000).

### 6.1. ПРОТИСТЫ И ИХ БИОРАЗНООБРАЗИЕ

Низшие эукариоты относятся к протистам, преимущественно одноклеточным или колониальным микроскопическим организмам. Все они характеризуются наличием истинного ядра и компартментализации клетки. Некоторые протисты интересны как микроскопические хищники, способные захватывать твердые частицы и переваривать их внутри клетки. У них широко распространена способность к эндо-, эктосимбиозу и даже к слиянию с симбионтами в организм-химеру. Это сборная группа различного происхождения, разделяющаяся на много крупных таксонов — около 40 классов — с не очень четкой номенклатурой, варьирующей у разных авторов.

Происхождение протистов основывается на сопоставлении «16S рРНК-подобных молекул», причем они оказываются очень разнообразными. Дерево протистов предложено М. Согиним (M. Sogin) в 1991 г., и в нем лишённые митохондрий организмы оказались у основания дерева. Отсюда делается предположение, что митохондрии представляют позднейшее приобретение у первоначально анаэробных протистов. Включение бактериального эндосимбионта — предшественника митохондрий произошло до

появления эвгленид, представляющих важнейший шаг в эволюции протистов. Euglenozoa включают гетеротрофные Kinetoplastida (включая свободноживущие Bodolida и паразитические Trypanosomatida), причем автотрофные эвглени в качестве фотосинтезирующего симбионта имеют не цианобактерии, а зеленые эукариотные водоросли, т. е. их симбиоз представляет позднее событие. Миксомицеты и акразии появляются на дереве еще позднее. Паразитические формы у них утратили митохондрии вторично.

Протисты разделяют на Algae и Protozoa по наличию или отсутствию хлоропласта и соответственно фототрофному («растительному») или органотрофному («животному») способам питания. Эта функциональная система более не соответствует представлению о протистах. Филогенетическая схема разделения их на группы изображена на рис. 30. Здесь представлена попытка построить «лестницу существ» для протистов по мере усложнения. На самом деле филогенетическая система протистов, более чем любой другой группы, представляет комбинаторную сетку, вследствие самого способа возникновения низших эукариот как химер. В рассмотрении этих групп мы сосредоточим внимание на свободноживущих организмах, представляющих приоритет для прикладного подхода.

**Дипломонады.** Первоначально считают организмы, лишённые митохондрий, а сейчас это анаэробы пищеварительного тракта, как лямблии (*Giardia intestinalis*). Интереснее симбионты термитов, способные захватывать кусочки древесины и анаэробно сбраживать ее до ацетата, который и усваивается насекомым. Эти организмы очень склонны к симбиотическим ассоциациям с бактериями, например, с покрывающими их поверхность спирохетами, которые функционируют как их органы движения.

Остается неясным, почему предполагаемые первичные анаэробные протисты сохранились лишь как паразиты и симбионты, и почему исчезли из анаэробных мест обитания, где большинство анаэробных протистов развивается как вторичные вселенцы за счет симбиоза с прокариотами.

**Кинетопластиды и эвглени.** У основания дерева свободноживущих протистов, обладающих митохондриями с дисковидными кристами, и соответственно аэробных, располагаются **эвгленовые**.

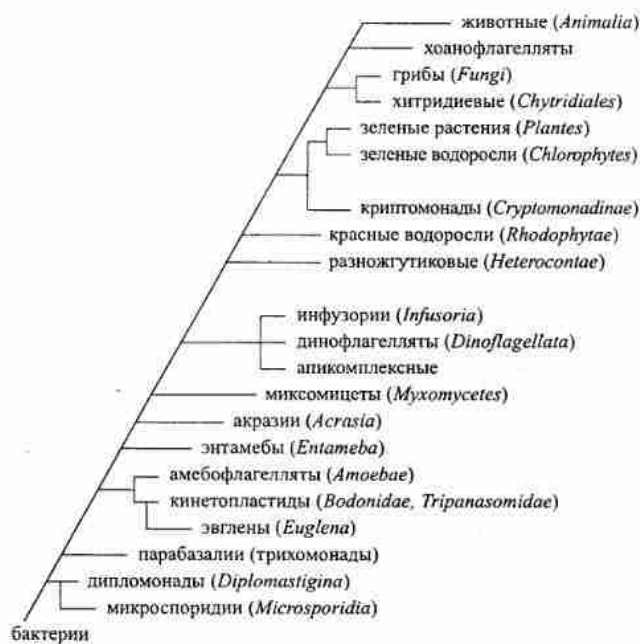


Рис. 30. Вариант филогенетического дерева эукариот на основании сравнения последовательностей рибосомальных РНК (По J. Perry, J. T. Staley. 1997)

Их питание очень разнообразно: фототрофное, фаготрофное, сапротрофное. Фототрофное питание осуществляется за счет захваченной и инкорпорированной зеленой водоросли с хлорофиллами *a* и *b*, причем она довольно легко теряется. Фаготрофные эвглены захватывают добычу с помощью микротрубочек глотки, расположенной рядом с резервуаром, откуда выходит жгутик. Наконец, сапротрофное питание осуществляется за счет развития в местах, обильных органическим веществом — мезосапротрофной зоне.

К эвгленам близки **кинетопластыды**, имеющие своеобразную организацию митохондриальной ДНК в виде кинетопласта — сетки связанных между собой кольцевых структур. Несмотря на необычность организации генома, эти протисты процветают и представлены широко распространенными в загрязненных водах и почве бодонидами. *Bodo* имеет глотку из микротрубочек и питается бактериями. Паразитическими родственниками его являются *Leishmania*, *Trypanosoma* — возбудители тяжелых заболеваний.

Третью ветвь в этой группе составляют распространенные в почве, пресной воде и море **амебофлагелляты**. При снижении уровня питательных веществ амёбы переходят в жгутиковую стадию. В отличие от истинных амёб, они вытягивают единственную псевдоподию. Большинство из них питается бактериями. Размножаются они очень быстро.

Следующими на филогенетическом дереве появляются **миксомицеты**. Их объединяют по трубчатой форме митохондриальных крист. К грибам они никакого отношения не имеют и название возникло по внешнему сходству их плодовых тел. Миксомицеты — это почвенные амёбы, плодовые тела которых обеспечивают стадию расселения спор токами с воздуха аналогично тому, как это происходит у настоящих грибов. Собственно миксомицеты образуют плазмодий. Он образуется слиянием гаплоидных жгутиковых в диплоидную стадию, разрастающуюся в огромную многоядерную амёбу — плазмодий.

**Акразии**, как *Dictyostelium*, напоминают миксомицеты, но остаются в виде отдельных одноядерных амёб, обладающих, однако, способностью к кооперативному действию при образовании плодового тела.

Объединение следующей группы протистов основано на присутствии под унитарной мембраной альвеол — слоя мелких пузырьков; они особенно выражены у инфузорий, а у динофлагеллят образуют целлюлозные пластинки клеточной стенки *под* мембраной.

**Динофлагелляты** представляют важнейшую и разнообразнейшую группу протистов, преимущественно фототрофных. Помимо свободноживущих планктонных форм, они дали начало

симбиотическим «зооксантеллам», превратившим ряд других протист, как фораминиферы, и низших многоклеточных организмов, как кишечнополостные и губки, в фотоавтотрофные симбиотические консорции. Морской фитопланктон в значительной степени представлен динофлагеллятами.

**Инфузории** стали наиболее известной линией крайнего морфологического усложнения одноклеточного организма. Классификация их основывается на морфологии, хотя вследствие крупных размеров относительно несложно получить их монокультуры и даже клоны. Для очистки от бактерий широко применяются антибиотики. Инфузории в основном хищники, питающиеся бактериями или другими протистами. Первая чистая культура инфузорий была получена 21-летним А. Львовым (А. Lwoff) в 1923 г., и это была *Tetrahymena*, послужившая затем моделью для исследований протист, аналогично чистым культурам бактерий.

Следующие группы организмов представляют предмет альгологии, и только их наиболее простые одноклеточные представители попадают в группу протистов-микроорганизмов.

**Разножгутиковые** составляют важнейшую группу фототрофов, доминирующую в море и столь же значимую для него, как растения для суши. К ним принадлежат золотистые водоросли, например *Ochromonas*, ксантофиты от *Botrydopsis* до *Vaucheria*, отвечающие примерно за 20% первичной продукции, диатомовые, многоклеточные бурые водоросли-макрофиты. Разножгутиковые интересны тем, что составляют ряд усложняющихся морфологически форм от одноклеточных жгутиковых до гигантских морских водорослей со сложным дифференцированным талломом. Хлоропласты их имеют пачки мембран, собранные по три, и их наружная мембрана связана с эндоплазматическим ретикуломом и через него с ядерной мембраной.

Из бесцветных разножгутиковых большую группу составляют водные «грибы» — оомицеты, например *Saprolegnia*, по своим молекулярным характеристикам не имеющие ничего общего с собственно грибами.

**Криptomonеды** представляют фототрофных одноклеточных жгутиковых, фотосинтетический аппарат которых, скорее всего, представляет дегенерировавшую эукариотную водоросль. Эта

малая группа рассматривается сейчас как химера — продукт симбиогенеза.

**Красные водоросли** образуют такой же параллельный ряд усложняющихся форм, как бурые водоросли, но не имеют жгутиковых стадий, а их пигментный состав отличается от других оксигенных фототрофов и ближе всего к цианобактериям. Их хлоропласты сложены отдельно располагающимися мембранами с фикобилисомами на них, как у цианобактерий. Это преимущественно морские бентосные организмы.

**Зеленые водоросли** составляют наиболее разнообразную группу «классических» оксигенных фототрофных организмов. Они доминируют и на суше, и в континентальных водах. Последовательный ряд морфологического усложнения при одинаковом типе обмена прослеживается здесь с наибольшей очевидностью. Микроводоросли, такие как *Chlorella*, со времен Бейеринка стали объектом микробиологических исследований в чистой культуре. Хлоропласты их имеют пачки мембран и включают пиреноид — место синтеза крахмала. Зеленые водоросли достигают крупных размеров и сложной дифференциации у харовых водорослей, представляющих вероятных предшественников наземных растений.

**Наземные растения** — Plantae — включают как сосудистые растения, так и криптогамовые. Они появляются на Земле относительно поздно — в силуре — в условиях уже развитой биосферы со сложившимися биогеохимическими циклами и осуществляющими разнообразные реакции организмами. Отличительной особенностью растений, в отличие от водорослей, является вынесение фотосинтезирующего аппарата в виде листьев в атмосферу к свету, что потребовало создания устойчивого к разложению органического опорного «скелета» на основе лигноцеллюлозы. Растения становятся обитателями азотопы — прилегающего к поверхности Земли слоя атмосферы, пронизанного стеблями растений.

Корень дерева **животных** — Animalia — связывается с одноклеточными и колониальными **хоанофлагеллятами**. Это мелкие преимущественно морские протисты-фильтраторы. Они имеют венчик липких щупалец, к которым прилипают частицы при биении единственного жгутика, создающего ток воды. Клетки

хоанофлагеллят иногда окружены корзинкой-лорикой. Точно такие же клетки составляют основу пищевого аппарата губок. От колониальных эукариот начинается хорошо разработанная зоология систематика беспозвоночных животных, основанная на наличии у них для питания твердыми частицами пищеварительного тракта с населяющими его микроорганизмами.

Следующую группу эукариот составляют **грибы** — объект микологии. Их ближайшие родственники — связывающие их с протистами **хитридиомицеты**. Это водные организмы со жгутиковыми зооспорами. Тело их представлено либо одной клеткой, либо неправильно ветвящейся массой, напоминающей мицелий.

Истинные грибы, Fungi — наземные организмы, мицелий которых сходен с мицелием прокариотных стрептомицетов и представлен длинными ветвящимися гифами — трубками со сложенной хитином оболочкой. Мицелий составляет один большой организм. Несмотря на то, что грибы относят к микроорганизмам, они на самом деле представляют, формально говоря, самые крупные организмы на Земле. Мицелий грибов приспособлен для развития в почве и способен переносить контакт с воздухом, нередко образуя воздушный мицелий; поэтому грибы выигрывают у бактерий при переходе к засушливым (ксерофитным) условиям. Грибы размножаются неподвижными спорами, разносимыми ветром, и соответственно способу размножения разделяются на аскомицеты и базидиомицеты. Сеть мицелия обеспечивает возможность транспорта по ней питательных веществ от клетки к клетке. Грибы — строго осмотротные организмы с жесткой клеточной оболочкой, не допускающей возможности проникновения твердых частиц. Вместе с тем грибы обладают мощным аппаратом гидролитических экзоферментов, обеспечивающих им возможность деградации полисахаридов растительных оболочек (и, что особенно важно, лигнина), липидов, нерастворимых азотистых соединений. Они составляют группу сапрофитных микромицетов, особенно богатых в лесной подстилке. Многие грибы вступают в симбиотические и паразитические отношения с сосудистыми растениями, так что их можно рассматривать как постоянные компоненты растительно-грибной системы. Так называемые лихенизированные грибы, имеющие морфологически

оформленные симбиотические группировки с микроводорослями, получили название **лишайников**. С грибами как важнейшими деструкторами в углеродном цикле связано функционирование наземных экосистем. Некоторые грибы стали лабораторным объектом микробиологии и биотехнологии, как хорошо известный продуцент пенициллина *Penicillium*. Сейчас известно несколько сот тысяч видов грибов и, конечно, такая обширная и важная группа служит объектом специальной дисциплины — микологии.

Из приведенного очень белого обзора низших эукариот с очевидностью следует, что их морфологическое разнообразие подчиняется общим законам дифференциации в большей степени, чем общности происхождения. Филогенетическая система на основе последовательностей РНК, приведенная здесь, отвлекает от независимых от происхождения законов морфологической дифференциации. Функциональные особенности протистов в гораздо большей степени, чем у бактерий, зависят от их морфологии. Типы питания протистов определяются дыханием митохондрии и/или фотоавтотрофией хлоропласта. Между тем все остальные особенности, позволяющие им занять разнообразные ниши, связаны с физическими факторами. Растения, грибы и животные представляют продукты усложнения очень немногих исходных групп протистов, и их филогению можно представить в виде деревьев, возвышающихся над кустарником многочисленных групп протистов. Для многоклеточных эволюция связана с последовательной дифференциацией на основе морфологического усложнения в монофилетических линиях и явно связана с увеличением размеров, требующим нового способа решения проблем транспорта внутри организма, обеспечиваемого сосудистой системой растений и подвижностью пищи у животных, например, в пищеварительном тракте. Характерной особенностью протистов, в отличие от происходящих от них многоклеточных организмов, оказывается способность к многократному последовательному усложнению путем комбинирования в разных типах симбиогенеза. Они принципиально полифилетичны.

Геохимической особенностью протистов стала отсутствующая у прокариот способность к построению минерального скелета

с участием внутриклеточных органелл. В результате в биогеохимические циклы оказались вовлечены такие элементы, как кальций, кремний, стронций, которые у прокариот участвовали в циклах лишь через биологически опосредованные реакции.

В функционирование биосферы протисты привнесли способность питаться твердыми частицами. В роли твердых частиц оказались бактерии, составлявшие, вероятно, первоначальную пищу эукариот-протистов. Поскольку это принципиально иной тип питания, чем фотосинтез зеленых растений, гидролитическая активность грибов и даже всасывание пищи в результате ее переваривания в пищеварительном тракте, его следует рассмотреть специально как *фаготрофию* — способность осуществлять внутриклеточное переваривание.

## 6.2. ФАГОТРОФИЯ

Понятие Protozoa было введено в практику Голдфузом в 1817 г., затем Эренберг написал в 1838 г. «Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen» («Инфузории как полноценные организмы»), но только в середине XIX столетия протистов опознали как одноклеточные организмы. За этим последовала идея происхождения многоклеточных из колоний одноклеточных. Разнообразие протистов очень велико, и здесь следует ограничиться только их функциональным разнообразием. Оно связано с распространением *фаготрофии*, т. е. способности организмов захватывать твердые частицы и проводить их через мембрану внутрь клетки. Такой способ питания принципиально невозможен для прокариот и соответственно исключил для них способность к эндосимбиозу. А у эукариот эта способность, в свою очередь, открыла путь к эндосимбиозу как системному усложнению в строении путем включения жертвы в состав организма и создания таким способом полифункционального объединения — «сообщества-организма», где отдельные компоненты теряют индивидуальность.

Фаготрофия требует наличия проницаемой мембраны на поверхности клетки или одном участке ее (цитостом) и пищеварительной вакуоли, которая движется внутри клетки. Верхний пре-

дел для рецикла пищеварительной вакуоли фаготрофных протистов составляет около 100 объемов клетки в час. Далее требуется эффективный механизм концентрирования взвеси. Для крупной добычи возможно хищничество. При пастбищном типе питания на газоне из обрастаний проблема захвата пищи решается просто, как это делают ползающие амёбы, гораздо сложнее она для питания взвесью мелких частиц — фильтрацией или пассивной ловлей. Пассивная ловля обусловлена тем, что подвижная добыча сталкивается с внеклеточными придатками, как у солнечников, фораминифер, радиолярий. Для неподвижной добычи гидродинамическая задача решается созданием тока воды через внеклеточное ловчее приспособление — сеть слизистых придатков, как воротничок у хоанофлагеллят. Создание потока возможно для прикрепленного организма, иначе он будет двигаться вместе с объемом воды, в котором находится. Сидячие организмы требуют разных усилий для создания потока параллельно или перпендикулярно поверхности. Скорость потока быстро падает у поверхности клетки, и поэтому необходимы дополнительные приспособления для улавливания частиц. Скорость, создаваемая жгутиком или ресничками, составляет 10–100 мкм/с и резко возрастает на расстоянии около 10 мкм от поверхности клетки. Продуктом работы фаготрофных фильтраторов является «прозрачная вода», лишенная рассеивающих свет частиц. Для свободноживущих протистов осмотрное питание, по мнению Т. Фенхеля (T. Fenchel), имеет ограниченное значение. Это мнение не является общепринятым, хотя и очень продуктивным.

Попавшая в вакуоль пища должна быть гидролизована. Для внутриклеточного пищеварения имеются лизосомы — мембранные везикулы, отпочковывающиеся от аппарата Гольджи и содержащие гидролитические ферменты. Они сливаются с пищеварительной вакуолью и изливают в нее свое содержимое. В дополнение к обычным гидролазам у фагоцитов высших животных имеется возможность посредством миелопероксидазы продуцировать активные формы кислорода, осуществлять хаотическое расщепление полимеров на олигомерные остатки, что особенно важно для разрушения относительно устойчивых оболочек добычи.

У фаготрофов есть довольно четкая зависимость между размерами хищника и жертвы, примерно десятикратная. Отсюда получаются логарифмические классы размеров в пелагическом сообществе.

По размерным группам пищевая цепь представляет: бактерии 2 мкм (пикопланктон) — жгутиковые 20 мкм (наннопланктон) — цилиаты до 200 мкм (микропланктон) — радиолярии, акантарии, фораминиферы, копеподы размерами более 200 мкм (мезопланктон). На соответствующем уровне в цепь поступает фитопланктон: наннопланктон до 20 мкм, диатомовые и перидинии — до 200 мкм, нити, вроде *Chaetoceros*, — на уровне свыше 200 мкм. Хоанофлагелляты составляют до половины всех гетеротрофных жгутиковых планктона.

Местообитание (patch) связано с размерами организма, скоростью его роста и подвижностью. В результате размер местообитания жгутикового составляет сантиметры. Минимальная плотность бактерий для роста бактериотрофных протистов составляет менее  $10^5$  клеток/мл.

В современной экологической теории принцип конкурентного исключения Гаузе комбинируется с понятием ниши и созданием устойчивого сосуществования. Ниша подразумевает пищевой ресурс, местообитание, время. При различии в размерах пищевых частиц возникает группировка сосуществующих организмов, называемая гильдией. Размеры пищевых частиц должны отстоять друг от друга на одно стандартное отклонение  $\sigma$ . Сукцессия бактерий, гетеротрофных жгутиковых, цилиат впервые была показана в 1977 г. Ю. И. Сорокиным для планктона.

Считается, что энергетический метаболизм протистов тот же, что и у всех организмов, обладающих митохондриями. Принимается, что это дыхание без существенных отклонений от нормы. Вместе с тем интерес представляют пищеварительные вакуоли, в которых происходит гидролиз полимеров вне цитоплазмы клетки. Объекты, вышедшие за пределы вакуолей, не могут быть переварены, поскольку это привело бы к разрушению и структурным компонентам хозяина. Таким образом, гетерофобия эукариотной клетки ослаблена, и она оказывается способной к включению в свой состав симбионтов при очень скромной специфичности.

### 6.3. СИМБИОЗЫ У ПРОТИСТ

Наиболее типичным для Protozoa является симбиоз с фототрофными организмами. К ним относят «цианеллю», «зоохлореллю» (фототрофные симбионты: хлорофиты, прازیномонады, вольвоксовые), «зооксантеллы» (динофлагелляты, хризомонады, диатомовые). Наконец, некоторые протисты, как эвлены, представляют продукт симбиоза с эукариотными фототрофами, в свою очередь представляющими продукт более отдаленного симбиоза с цианобактериями. Этот принцип «матрешки» или системного изменения, в результате крупной комбинаторной перестройки, представляет очевидную альтернативу постепенным мутационным изменениям с последующей селекцией. Выгоды симбиоза более или менее очевидны, как выигрыш в подвижности и оптимизации положения, минеральном питании, использовании углекислоты от дыхания или кальцификации для фототрофа. Ассоциация становится автотрофной. Это особенно выгодно в олиготрофных водах, где циклы биогеовых замыкаются в пределах наиболее выгодных диффузионных расстояний. Так, из планктонных радиолярий сплеллярии, населлярии и акантарии содержат симбиотические динофлагелляты. То же справедливо для планктонных фораминифер с динофлагеллятами или прازیнофитами в наружной сети псевдоподий. По содержанию хлорофилла *a* эти протозоа сопоставимы с нормальными фотосинтетиками. Гигантские бентосные фораминиферы коралловых экосистем в олиготрофных тропических водах тоже содержат фотосимбионтов. Наконец, сама экосистема коралловых рифов автотрофна.

Особую группировку составляют бактерии-эндосимбионты простейших, в особенности инфузорий, но функция их далеко не ясна, и некоторые являются внутриклеточными паразитами.

Внимание вызвал симбиоз протистов с метаногенами, который дал первым возможность развиваться анаэробно. Анаэробноз вообще не свойственен эукариотным организмам, и те достаточно многочисленные представители их, которые приспособились жить в отсутствие кислорода, применяют разного рода приспособления, чтобы решить задачу. Наиболее известно брожение у дрожжей. Однако есть и более сложные симбиогенетические пути решения задачи. Значительную часть анаэробов составляют

протисты и грибы пищеварительного тракта, паразиты и некоторые свободноживущие организмы. В рубце жвачных число клеток протистов достигает  $2 \cdot 10^5$  в  $\text{см}^3$ , например *Entodinium* и *Dasytricha*. В насекомых есть инфузории *Nyctotherus*. Протисты особенно важны для ксилофагов. В анаэробных осадках присутствуют свободноживущие инфузории *Plagiophyla*, *Metopus*, *Saprodinium*, *Trimyema*, амебофлагеллаты *Pelomyxa*, *Psalteriomonas*.

Анаэробные протисты часто представляют единственных хищников в анаэробной зоне, если не считать роющих беспозвоночных, которые захватывают и анаэробный слой ила, отправляя его в свой пищеварительный тракт. Очень большое внимание было обращено на анаэробные протисты и их симбиоз с метаногенными архебактериями. Этот симбиоз может быть внеклеточным, и тогда протисты покрыты ворсистой шубой из нитевидных водораспользующих метаногенов, преимущественно *Methanobrevibacter*, прикрепленных одним концом к поверхности протиста; под УФ-облучением эти бактерии обладают собственной зеленоватой флуоресценцией и так легко распознаются. Термодинамический смысл этой организации метаногенного сообщества в одну систему понятен: протисты способны захватывать и гидролизировать частицы, продукты могут быть дегидрированы и образующийся восстановитель окислен с образованием  $\text{H}_2$ ; давление  $\text{H}_2$  за счет его конверсии в метан снижается и реакция становится необратимой.

Основан анаэробноз протистов на взаимодействии их оргanelл, получивших название гидрогеносом, с экзо- или эндосимбиотическими метаногенами. Гидрогеносомы были открыты лет 20 назад сначала у *Trichomonas vaginalis*, а затем были найдены у свободноживущих анаэробных протистов и гриба из рубца *Neocallimastix*. Гидрогеносомы продуцируют водород, ацетат, углекислоту, представляющие стандартные субстраты для метаногенов. Первоначально гидрогеносомы предполагали результатом эндосимбиоза с кластридиями, однако впоследствии на основании состава белка их стали рассматривать как дериваты митохондрий. В инфузориях происхождение гидрогеносом и, соответственно, анаэробного способа существования, несомненно, вторично. Может быть, это было не так у наиболее древних протистов.

Гидрогеносомы и метаногены образуют эндосимбиотическую структуру. Гидрогеносомы опознаются по цитохимической окраске на гидрогеназу, а метаногены по автофлуоресценции. Эндосимбиотические метаногены близки к разным родам метаногенов: у инфузории *Metopus palaeoformis* — *Methanobacterium formicicum*; *Metopus concertus*, *Plagiophyla frontata*, *Trimyema* имеют плоские метаногены с неровными краями, скорее всего, *Methanocorpusculum parvum*; *Plagiophyla nasuta* — *Methanospirillum*. Филогенетической связи между деревом цилиат и метаногенными симбионтами нет. Приобретение метаногенов явно представляло собой вторичное событие. Инфузории, как известно, содержат бактериальных эндосимбионтов, в большинстве своем некультивируемых. Эта система превосходит последующую систему рубца в очень лаконичной и миниатюрной форме.

Следующим шагом служит пищеварительный тракт беспозвоночных, где возможны два варианта: ацетогенный и метаногенный. Эти варианты были исследованы Дж. Брезняком (J. Breznak) для термитов, среди которых есть две группы — использующие древесину и использующие грибные садки. Те, которые используют грибы, в качестве заключительного звена пищеварения имеют гомоацетатных бактерий и выигрывают в образовании усваиваемого ацетата, но проигрывают в общей термодинамике систем, поскольку вынуждены выделять в довольно высокой концентрации  $\text{H}_2$ . Другие, напротив, выделяют метан; именно этим ксилофагам и приписывается высокий уровень эмиссии метана в атмосферу. Заметим, что для растительноядных животных эти две возможности представляют альтернативу для усвоения целлюлозы, поскольку ни одно из них не обладает целлюлазой и вынуждено представлять собой носителя для микробного сообщества. Таким образом, мы имеем развитие по пути интегрированной кооперативной системы, для которой, как это было доказано для сверчков, достаточно представителей всего шести функциональных групп бактерий симбионтов.

Более сложную систему представляют бентосные кишечнополостные. Они развиваются в олиготрофном океане, очень бедном питательными веществами. В этой ситуации преимущество имеют

кренофилы, которые получают питание из потока. Экосистема должна образовывать ловушку для питательных веществ, с тем чтобы осуществлять эффективный рецикл лимитирующих компонентов. Это невозможно без активно работающей деструкции, возвращающей азот, фосфор и другие элементы сообществу.

Итак, возьмем в качестве исходного сообщества губки и кораллы. В роговых губках из Карибского бассейна — типичного олиготрофного океана с высокой прозрачностью воды — располагаются бактерии, составляющие до 50% биомассы. В большинстве своем это грамотрицательные бактерии, как можно определить по ультратонким срезам. Выделенные организмы оказались способными использовать широкий круг субстратов и по окислительному и по бройдильному пути. Примечательно, что из углеводов анаэробно не использовалась глюкоза. Хорошо использовались такие полимеры, как хитин или ДНК. Особый интерес вызвала синяя нитчатая бактерия, занимающая 60–80% внутриклеточного объема губки. Пигментация обусловлена каротиенопротеином. Внешне она похожа на метанотрикс. По последовательности 16S рРНК она не относится ни к одной из ветвей Bacteria, имея глубокое ветвление ниже «грамположительных» бактерий с низким содержанием Г + Ц». Культивировать ее не удалось, а губка, лишенная симбионта, погибает. Симбиоз, по-видимому, облигатный.

Сходная ситуация имеет место с кораллами. Склерактиновые кораллы представляют классический случай симбиоза кишечнополостных с фотосинтезирующими динофлагеллятами или зооксантеллами. В ткани коралла имеются овальные тела, представляющие сжатую массу бактерий. Из тех, что росли на индивидуальных субстратах, большинство оказалось принадлежащими *Moraxella*.

Интересно, что мозговатые кораллы бывают подвержены болезни, получившей название «черная повязка». Болезнь вызывается развитием на поверхности цианобактерии *Phormidium corallolyticum*, за которой тянется набор цианобактериального мата, включая другие цианобактерии, как *Spirulina*, серобактерии *Beigiatoa*, множество гетеротрофов и протистов.

## ВОПРОСЫ К ЧАСТИ 2

1. Что такое естественная систематика?
2. Имеется ли прямая связь между числом мутаций и временем?
3. Равнозначны ли понятия филогении и эволюции?
4. Можно ли построить всеобъемлющую классификацию по одному признаку?
5. С какими признаками коррелирует рибосомальный аппарат?
6. Какие организмы относятся к протеобактериям?
7. Могут ли протеобактерии полностью обеспечить деструкционную ветвь углеродного цикла?
8. Как распределяются характерные функции по филогенетическому дереву? Например, азотфиксация, термофилия, автотрофия, анаэробноз, гидрогенотрофия?
9. Почему цианобактерии составили отдельную ветвь, а не распределились по ветвям, как другие фототрофы?
10. Как коррелирует морфология с химической функцией у бактерий?
11. Можно рассматривать геном бактерий как мозаику свойств или же как ряд последовательных приобретений, и каким образом могли такие распределения возникнуть?
12. Представляет ли биоразнообразие бактерий упорядоченное множество или же систему?



## СООБЩЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ

### 1. МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО КАК ЦЕЛОСТНОСТЬ

Микробное сообщество представляет совокупность взаимодействующих между собой организмов, а не множество видов, находящихся в одном месте и представленных аналогом флористического перечисления, например, идентифицированных клонов ДНК. Способы взаимодействия микроорганизмов между собой различны.

Для всех организмов первоочередное значение имеет питание. Взаимодействующие микроорганизмы связаны между собой либо конкуренцией за общие субстраты, либо кооперацией в их использовании. Слово «субстрат» в микробиологии многозначно и может обозначать как твердый носитель, например поверхность растения, так и сумму используемых веществ, но чаще всего употребляется как «субстрат питания», т. е. источник питания, индивидуальное химическое вещество, реактант в химическом смысле. В микробном сообществе, в связи со специализацией функций, кооперация имеет гораздо большее значение, чем, например, в сообществе растений, принадлежащих к одной физиологической группе и конкурирующих за свет, воду, биогены. Конкуренция у бактерий проявляется в пределах одной функциональной группы, например, при колонизации общего субстрата, скажем, молока молочнокислыми бактериями. Кооперация нагляднее всего проявляется в последовательном разложении сложного субстрата как мортмасса растений, где каждый компонент используется своим специалистом, а продукты его обмена, в свою очередь, используются другими специалистами. Химические взаимодействия настолько доминируют в микробном сообществе, что его можно представить как гомогенную систему, бактериальную

взвесь или суспензию. Именно эта система охотнее всего исследуется микробиологами по соображениям удобства и дает представление о природе микробного сообщества.

### 2. КООПЕРАТИВНЫЕ ВЗАИМОТНОШЕНИЯ

Кооперативные трофические взаимоотношения в сообществе могут быть рассмотрены на качественном уровне по списку веществ, поступающих в функциональный блок как субстраты, и списку продуктов, образуемых в этом блоке. Наиболее наглядны кооперативные отношения в разнообразной группе органотрофов, осуществляющих деструкционную ветвь в цикле углерода. Осуществляемая микроорганизмами химическая реакция должна обеспечить достаточную энергию для существования организма. Биоэнергетика клетки была разобрана ранее. Здесь же идет речь о взаимодействии видов, осуществляющих разные реакции. В трофической системе микробного сообщества образуется сеть взаимосвязанных химических реакций.

Под сообществом мы понимаем набор организмов, занимающих определенные фундаментальные ниши в экосистеме и связанных между собой трофическими взаимоотношениями. Среди этого набора типов взаимоотношений нас интересуют те, которые приводят к формированию микробного сообщества как кооперативного целого, способного взаимодействовать со средой обитания как некое единство. Прежде всего сообщество как целое должно соответствовать требованиям термодинамики и в данных условиях обитания обеспечивать необходимую энергию всем своим компонентам. Для бактерий и их сообществ термодинамика осуществляемых ими химических процессов играет определяющую роль. Далее, из имеющегося набора функционально сходных организмов доминируют те, кинетические характеристики которых более всего соответствуют условиям, складывающимся в сообществе. Сообщество, с химической точки зрения, определяется термодинамикой и кинетикой осуществляемых окислительно-восстановительных реакций. Но физико-химический подход дает только первую приближительную картину возможностей,

реализация которых зависит от биологических особенностей организмов. К таким особенностям относятся, например: способность к выживанию, сопротивление выносу из системы, выеданию и другие свойства, которые могут обеспечить процветание в экологических нишах, входящих в абстрактные «фундаментальные ниши».

Микроорганизмы получают энергию для своей жизнедеятельности от окислительно-восстановительных реакций, представляющих перенос электрона от донора к акцептору. По сути дела, в энергетике микроорганизмов мы имеем дело с электрохимической реакцией. Микробиологам такие расчеты особенно удобны для выяснения обмена литотрофных организмов. Общее правило такое: *хемолитотрофный организм может развиваться в области термодинамической устойчивости продукта энергодающей реакции*. Такие диаграммы приведены, например, в книге Г. А. Заварзина «Литотрофные микроорганизмы» для наиболее известных групп хемолитотрофов (см., например, рис. 3). Однако работает и обратная закономерность: в местообитании сообщества, создающего определенные Eh-pH условия, химические соединения переходят в формы, соответствующие области их устойчивости в так называемых биологически опосредованных реакциях.

Для сообщества действует закон Гесса, согласно которому для системы сопряженных реакций важна только разность между исходным и конечным состояниями. При этом допускается множество путей между исходными субстратами и конечными продуктами, лишь бы выход энергии был достаточен. Тот же закон действует и для системы реакций внутри клетки. Однако для сообщества имеется ограничение, заключающееся в том, что для *каждого вида*, входящего в метаболическую систему сообщества, выход энергии должен быть достаточен для его существования. Таким образом, в многоступенчатой системе реакций деструкции органического вещества каждая ступень, осуществляемая видом микроорганизмов, должна быть выше некоторого минимального уровня.

Для того чтобы реакция могла быть энергодающей, во-первых, выход энергии должен быть достаточен для синтеза АТФ, в том числе и за счет протонной помпы, во-вторых, плотность потока вещества должна быть достаточна для поддержания популя-

ции соответствующих организмов, т. е. их урожай  $Y$  для данной реакции должен обеспечить поддержание популяции организмов вопреки их естественному отмиранию и гибели. Если поток энергии от реакции превращения определенного вещества через локальное местообитание организмов недостаточен для поддержания популяции, то маловероятно и существование специализированной группы организмов.

Выход энергии суммарной реакции для сообщества зависит не только от донора электрона, но и от реакций, связанных с окислением. В результате для сообщества деструкторов будут существовать разные возможности, если заключительный этап осуществляется через эндогенные акцепторы, как при брожении или использовании образуемой органотрофами  $CO_2$  для метаногенеза или ацетогенеза, или же при использовании внешних доноров, как  $O_2$  или  $SO_4^{2-}$ . Поэтому здесь работает обратная связь от конечных этапов к начальным.

Пути метаболизма в сообществе, превращающем субстрат  $s$  в продукт  $p$  для организмов  $A, B, C, D...$  и образуемых ими промежуточных продуктов  $a, b, c, d...$ , могут быть представлены следующими графами:

1.  $S \rightarrow A \rightarrow a \rightarrow B \rightarrow b \rightarrow \dots \rightarrow p$
2.  $S \rightarrow A \begin{cases} \rightarrow a' \rightarrow B \rightarrow b \rightarrow \dots \rightarrow p \\ \rightarrow a'' \rightarrow C \rightarrow c \rightarrow \dots \rightarrow p \\ \rightarrow a''' \rightarrow D \rightarrow d \rightarrow \dots \rightarrow p \end{cases}$
3.  $S \rightarrow A \rightarrow a \begin{cases} \rightarrow B \rightarrow b \rightarrow \dots \rightarrow p \\ \rightarrow B' \rightarrow b' \rightarrow \dots \rightarrow p \end{cases}$
4.  $S \rightarrow A \rightarrow a \begin{cases} \rightarrow B \rightarrow b \rightarrow D \rightarrow \dots \rightarrow p \\ \rightarrow C \rightarrow c \rightarrow E \rightarrow \dots \rightarrow p \end{cases}$
5.  $S \rightarrow A \begin{cases} \rightarrow a' \rightarrow B \rightarrow b \rightarrow E \rightarrow \dots \rightarrow p \\ \rightarrow a'' \rightarrow C \rightarrow c \rightarrow F \rightarrow \dots \rightarrow p \\ \rightarrow a''' \rightarrow D \rightarrow d \rightarrow G \rightarrow \dots \rightarrow p \end{cases}$

На первом графе представлена простая трофическая *цепь*; на втором — образование разных продуктов, как, например, при смешанном брожении; на третьем — конкуренция за общий субстрат физиологически сходных организмов; на четвертом — конкуренция между организмами, образующими разные продукты; на пятом — комбинация с использованием разных промежуточных продуктов и промежуточным образованием сходных продуктов видами *E* и *F*. Трофическая *сеть* в сообществе представляет комбинацию разветвленных цепей, ветвящихся либо по продуктам, либо по субстратам.

Если  $p = s$ , то образуется цикл. Такая структура метаболической сети представляет наиболее общий случай, если рассматривается не только деструкционная ветвь, но и продукционная. В этом случае сообщество имеет внешний источник энергии в виде солнечного излучения, а трофическая цепь относится лишь к материальному балансу. Сообщество, осуществляющее замкнутый цикл (точнее, замкнутые по биогенным элементам циклы) является *автономным* и способно развиваться в течение длительного, даже в геологических масштабах, времени. Это достигается взаимодействием различных по функциям организмов, составляющих сообщество.

При рассмотрении цепи реакций важно заметить, что в условиях сообщества концентрация промежуточных метаболитов *a*, *b*... снижается до минимума, обусловленного их потреблением следующим в цепи организмом. Типичным примером может служить низкая концентрация нитрита в реакции нитрификации.

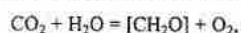
## 2.1. ПЕРВИЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Первый этап в сообществе осуществляют *первичные продуценты* — автотрофы, ассимилирующие  $\text{CO}_2$  и, таким образом, представляющие четко очерченную на биохимическом уровне группу. В подавляющем большинстве случаев это окислительные фотоавтотрофы, представленные физиологически узкими группами цианобактерий, водорослей, высших растений. Окислительные фототрофы определяют вход в систему биогеохимических циклов реакциями синтеза биомассы и образования кислорода. Они

конкурируют между собой за свет, воду, биогены. Фототрофный путь питания обусловлен ограничением фотосинтетически активной радиацией (ФАР), спектральный состав которой различается для разных групп организмов в зависимости от дополнительного набора пигментов. В целом развитие массы фототрофов имеет своим пределом самозатенение, при котором ниже расположенные организмы не получают достаточно света для развития. Нерегулярное поступление света, зависящее от сезона, времени суток и погоды, обуславливает необходимость для фототрофов первоначального накопления ассимилятов в запасных веществах, как полиглюкоза или жиры. Отсюда возникает возможность формирования клеток больших размеров, чем у хемотрофных прокариот. Например, цианобактерии имеют обычно размеры более 5 мкм. Поскольку жизнедеятельность фототрофов определяют в основном физические факторы, прежде всего поступление света, их разнообразие основывается на физическом приспособлении к условиям среды обитания. Малые размеры, обеспечивающие высокую интенсивность обмена с окружающей средой у бактерий, для фототрофов не представляют первостепенной необходимости. Из раствора поступают в первую очередь биогены: азот, фосфор, калий, металлы; для важной группы диатомей лимитирующей оказывается концентрация кремния. Фототрофы обладают возможностью запасания веществ: фосфаты накапливаются у прокариот в форме полифосфатов, а у растений — в форме органических фосфатов, как фитин; азот цианобактерии накапливают в форме цианофидина (полимера аргинина и аспаргиновой кислоты) в периоды возможности азотфиксации, но этот тип обмена связан с большими энергетическими затратами. Наличие запасов в клетках приводит к тому, что кинетика роста фототрофов более зависит от общего содержания питательных веществ в системе «клетки + среда», чем только от растворенных веществ, как у хемотрофов, поскольку фототрофы осуществляют быстрое поглощение биогенов в форме так называемого «глотка». Важную роль играет темновой обмен фототрофов в течение ночи, когда осуществляется дыхание или, в анаэробных условиях, брожение.

Первичные продуценты, если отвлечься от светозависимых реакций, составляют практически весь вход энергии в

экосистему, ограничены конструктивным обменом, анаболизмом, и синтезом биомассы. Вторым продуктом реакции после биомассы является кислород. Общую реакцию первичных продуцентов можно записать как стехиометрическое равенство:



осуществляющееся с точностью до 20%, в зависимости от синтезируемого запасного вещества, где  $[\text{CH}_2\text{O}]$  — эквивалент биомассы или органического углерода ( $\text{C}_{\text{орг}}$ ) вообще. С учетом других элементов для состава биомассы принимается отношение Редфильда, установленное для морского фитопланктона  $\text{C}_{106}\text{N}_{16}\text{P}_1$ . Выделение  $\text{O}_2$  определяет формирование окислительной зоны для аэробов.

Разнообразие фототрофов определяется вариациями в окружающей среде и благодаря этому их сообщества могут служить хорошими индикаторами ее состояния. Как правило, фототрофы образуют сообщества из различных видов, причем доминирующий вид получает иногда название *эдификатора*, строителя здания, поскольку от него зависит все сообщество в целом. Альгологи и геоботаники имеют разработанную систему номенклатуры сообществ, основанную на термине, производном от доминирующего организма-эдификатора, например, «пинета» от *Pinus*, «сфагнета» от мха *Sphagnum* и т. д. Изучение деятельности фототрофов составляет предмет экофизиологии растений и водорослей. В этом отношении следует особо отметить переход к функциональной системе, основанной на «жизненных формах», физиологических типах вне зависимости от происхождения, к анализу

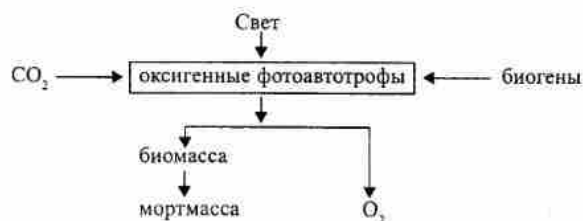


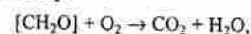
Рис. 31. Первичная продукция

консорциумов и сообществ и далее к растительному покрову ландшафта и региона или фитопланктону водоема.

Первичную продукцию определяют либо по накопленной биомассе, либо по ассимиляции  $^{14}\text{CO}_2$  в краткосрочных опытах. Другим путем служило определение выделяющегося  $\text{O}_2$ . Первичная продукция составляет первую часть углеродного цикла. Она может быть представлена простой схемой (рис. 31), относящейся к дневному периоду; для упрощения в схеме опущены количественно второстепенные экскретируемые вещества.

## 2.2. ДЕСТРУКЦИЯ

Вторую часть цикла составляет *деструкция*, возвращающая первичным продуцентам-автотрофам исходные вещества за счет их минерализации (термин очень неудачный, поскольку образование минералов представляет особый раздел природоведческой микробиологии). Деструкцию осуществляют прежде всего микроорганизмы; животные-консументы в наземных экосистемах ответственны лишь за 3% круговорота углерода, но много больше в морских экосистемах. В морских пелагиальных системах цикл можно полагать замкнутым за счет реакции дыхания, обратной окисленному фотосинтезу:



осуществляющейся частично прямо консументами зоопланктона, частично многоступенчато под действием бактерий. Деструкция может быть оценена по выделению  $\text{CO}_2$ , а для аэробов и по поглощению  $\text{O}_2$ .

Трофическая структура микробного сообщества определяется взаимодействиями между функциональными группами микроорганизмов, обладающих специализированными наборами ферментов, дающими им возможность использовать те или иные вещества. Допустим, что рассматриваемое микробное сообщество получает в качестве субстрата мортмассу фотоавтотрофов, состоящую из белков, жиров, углеводов и других соединений клеток. Отдельно рассматриваются растворенные органические вещества и находящиеся в частицах взвешенное органическое вещество, которое составляет основную массу остатков.

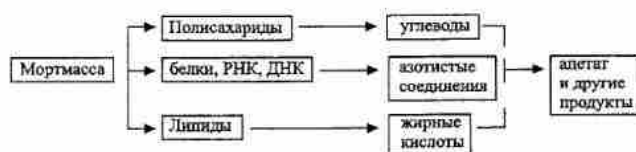


Рис. 32. Начальные этапы деструкции

Соответственно трем основным компонентам мортмассы рассматриваются пептолитический, липолитический, сахаролитический пути (рис. 32). Согласно первому постулату Виноградского, «функции микробов в природе специализированы; для каждой работы есть свой специалист, приспособивший к ней весь химизм своего существования», каждый путь обслуживается своей функциональной группой организмов.

Первый этап деструкции представляет гидролиз, осуществляемый бактериями-гидролитиками. Стратегией гидролитиков является заселение поверхности субстрата, и их развитие прямо зависит от доступной поверхности. В технике такой процесс называется «твердофазной ферментацией». Бактерии-гидролитики переводят вещества твердой фазы в раствор, гидролизуя их вне клетки под действием соответствующих экзоферментов-гидролаз, соответственно протеаз, липаз, целлюлаз. Общая картина гидролиза сводится к появлению вместо индивидуальных полимеров унифицированных мономеров, поступающих в общий резервуар растворенных веществ.

Низкомолекулярные соединения поступают в клетки бактерий-осмотрфов и окисляются в зависимости от доступного окислителя. Особое место среди продуктов деструкции занимает ацетат, образующийся из большинства соединений и поступающий для окончательного окисления в  $C_2$ -метаболическом пути в сообществе.

Таким образом, деградация мортмассы дает возможность существования нескольких специализированных групп организмов: гидролитиков, диссипотрофов, использующих низкомолекулярные соединения, вторичных окислителей, использующих конечные продукты обмена. Возникает вопрос, зачем столько разных

специалистов, не может ли все эти реакции осуществить один организм, последовательно адаптируясь к использованию сначала наиболее доступных веществ, а затем труднее разлагаемых? Такой процесс известен для чистых культур, использующих набор субстратов, и носит название диауксии. В сообществе, однако, времени для адаптации нет, и вещество, используемое с запозданием, съест другой организм. Ложное впечатление создается и в связи с примером животных-консументов, которые почти полностью усваивают мортмассу. На самом деле зоотрофное питание обусловлено развитием в пищеварительном тракте микробного сообщества, которое переводит в форму всасываемых эпителием веществ те соединения, которые не растворяются ферментами животного; целлюлоза служит обычным примером для растительноядных животных.

Организация трофической системы микробного сообщества складывается таким образом, что для каждого соединения есть свой специалист; это позволяет реконструировать систему по списку субстратов, используемых компонентами сообщества. Именно такой анализ имел в виду С. Н. Виноградский, когда он предложил сопоставить список природных веществ со списком организмов. По требованиям «минимальных стандартов» в таксономии список субстратов должен сопутствовать описанию каждого вида и его получают, засеивая пробирки с индивидуальными веществами. Такая фенотипическая диагностика широко применялась в медицинской практике, например, для энтеробактерий. Сейчас для решения этой задачи при массовых анализах, помимо традиционного посева в пробирки, развита многоканальная система «Биолог», в которой культура засеивается в ячейки на пластинке для иммунохимических реакций, куда, помимо набора субстратов, добавляется хлорид трифенилтетразолия (ТТХ). В случае использования субстрата образуется красный формазан. Пластинка сканируется фотометром и по набору реакций можно идентифицировать организм, используя компьютерные программы. П. А. Кожевин создал аналогичную систему «Эколог» и ее программное обеспечение для почвенных микробных сообществ, которые имеют свои характерные наборы субстратов, однако пока их не удается сопоставить с определенным набором видов.

### 2.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГИДРОЛИТИКОВ И ДИССИПОТРОФОВ

Рассеиваемый при гидролизе полимера олигомерный продукт может быть использован «микрофлорой рассеяния», теперь получившей название *диссипотрофов*. Эти организмы легче всего выделяются в культуру и лучше всего известны в лабораторной практике. Диссипотрофы представлены в основном одиночными клетками, часто подвижными. В анаэробном сообществе они нагляднее всего представлены спирохетами с очень выгодным отношением поверхности к объему. Зависимость диссипотрофов от гидролитиков очевидна. Менее ясна зависимость гидролитиков от диссипотрофов, связанная с тем, что диссипотрофы снижают концентрацию продуктов гидролиза ниже порогового уровня, останавливающего синтез гидролаз, находящийся под метаболическим контролем ретронингибирования. Необходимость взаимодействия двух групп организмов при разложении даже такого простого вещества, как линейный полимер глюкозы — целлюлоза — лучше рассмотреть на конкретном примере анаэробных термофильных целлюлозолитических организмов.

Разложение целлюлозы представляет важнейший маршрут в наземных и многих морских экосистемах, поскольку целлюлоза образуется в больших количествах как структурный компонент клеточной оболочки растениями и водорослями. Способностью к разложению целлюлозы обладают многие грибы, из которых наиболее подробно была изучена *Trichoderma*, некоторые актиномицеты, часть которых специализирована на разложении хитина, в том числе грибной стенки, аэробные бактерии, как, например, цитофаги, некоторые миксобактерии, бациллы, целлуломонас, целлвибрио. Среди анаэробов наиболее легкими для исследования объектами оказались клостридии. Знания относительно целлюлозолитических организмов были сильно расширены за счет описания анаэробных неспоровых организмов.

Использование целлюлозы обусловлено взаимодействием с нерастворимым гидрофильным субстратом, представляющим структурно-организованные волокна. Отсюда следуют необходимость физического контакта клеток с нерастворимым субстратом и образование его биопленкой. Дегградация целлюлозы требует действия внеклеточных ферментов целлюлаз. Доступность для

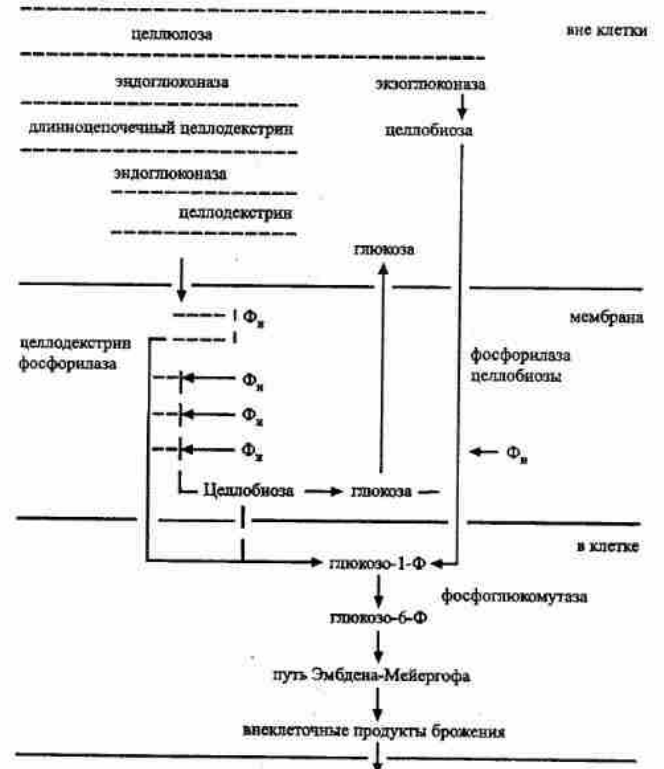


Рис. 33. Использование целлюлозы *Clostridium thermocellum*

фермента сильно коррелирует с пористостью целлюлозного материала. Физический предел пор для действия фермента составляет величина в 40–50 ангстрем.

Разложение целлюлозы было подробно исследовано на примере *Clostridium thermocellum* в связи с организацией производства этанола на целлюлозе (рис. 33). Гидролиз осуществляется

внеклеточным целлюлазным комплексом (целлюлосомой), включающим ряд ферментов, прежде всего *эндогликоказа*, гидролизующую  $\beta$ -1,4 связь в разных местах с образованием случайных по длине целлодекстринов, которые могут быть далее гидролизованы до более коротких олигомеров и поступать в клетку. У *C. thermocellum* эндогликоказный комплекс наиболее активен. Менее активна у этого организма *экзогликоказа*, отщепляющая с редуцирующего конца полимерной цепочки дисахарид целлобиозу. Соотношение эндогликоказа/экзогликоказа различно у разных организмов. Например, у гриба *Trichoderma* преобладает экзогликоказа. Целлюлазный комплекс по-разному ингибируется конечными продуктами у разных целлюлозолитиков.

Продукты гидролиза целлюлозы переносятся в клетку двумя разными путями с участием необычных ферментов: фосфорилазы целлобиозы или целлодекстрин-фосфорилазы. Обе эти реакции фосфорилирования термодинамически обусловлены гидролитическим выбросом глюкозы вне клетки при АТФ-независимом транспорте остающейся части полиглюкозы внутрь клетки. Там она подвергается сбраживанию, по обычному пути брожения, с образованием летучих жирных кислот и, прежде всего, бутирата, ацетата, этанола,  $H_2$ . Глюкоза не обязательно используется всеми целлюлозолитиками.

Сходные пути гидролиза действуют и с другими полисахаридами, требуя специфических ферментных систем. Легче всего гидролизуются растворимые полисахариды, для которых есть соответствующие ферменты: крахмал с амилазой, пуллулан с пуллулазой, ксилан с ксиланазой и т. д.

Из описания действия целлюлазного комплекса с очевидностью следует, что целлюлозолитические организмы должны развиваться в тесных симбиотических отношениях с другими организмами. Прежде всего это относится к необходимости удаления глюкозы диссипотрофами. В исследованной бинарной культуре с *C. thermocellum* глюкозу использовал *Thermoanaerobacter*, но можно привести много подобных примеров, таких как пару галофилов *Halocella* — *Haloanaerobium*. Аэробным целлюлозолитикам цитофагам сопутствуют типичные диссипотрофы простекобактерии, как показала Л. В. Васильева, развивающиеся на

фильтровальной бумаге в зоне вслед за движущимся фронтом цитофага. Таким образом, образование пары «гидролитик — диссипотроф» представляет правило. Для анаэробных целлюлозолитиков необходимо удаление продуктов брожения, так же как для многих первичных анаэробов. Поэтому целлюлозолитические организмы развиваются в тесных синтрофных отношениях с рядом сопутствующих форм.

Помимо катаболических взаимодействий, спутники обеспечивают анаболические нужды целлюлозолитиков. А. А. Имшенецкий обратил особое внимание на симбиотические отношения с азотфиксаторами, снабжавшими целлюлозолитиков связанным азотом, а также различными факторами роста. В результате целлюлозолитическое сообщество взаимодополняющих организмов представляет функционально нечто совершенно иное, чем чистая культура, где необходимо специальными приемами восполнять недостающие потребности организма. Поэтому в каждой экологической обстановке формируется своя группировка, связанная с разложением целлюлозы, включающая функционально сходные, но различные по происхождению организмы.

Молекулярные методы позволили разобраться в происхождении целлюлозолитической активности на примере узкой группы экстремально термофильных целлюлозолитиков. Из них наиболее изучен *Caldicellulosiruptor*, первоначально выделенный из гидротерм Курильских островов под названием «*Anaerocellum*». Кроме того, есть филогенетически далекие *Rhodothermus marinus*, *Caldibacillus*. Гены, определяющие целлюлозолитическую активность, часто полифункциональны, несколько различаются по последовательностям, но вместе с тем существует высокая вероятность того, что латеральный перенос генов имел важное значение в эволюции этой функциональной группы организмов.

#### 2.4. ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ АНАЭРОБЫ

Группы анаэробных гидролитиков и диссипотрофов объединяются в группировку *первичных анаэробов*, очень четко просматриваемую при анаэробных процессах как группировку бродительщиков, осуществляющая *кислотогенную* или, иначе, *водородную фазу*.

И гидролитики, и диссипотрофы в анаэробном сообществе не нуждаются во внешнем стоке электронов и осуществляют брожение за счет веществ, получаемых исключительно из субстрата. Поэтому большинство из них способно к выбросу молекулярного водорода, катализируемому выделяющей гидрогеназой. Особенности брожений связаны, как известно, с вариациями в использовании разных внутренних акцепторов водорода. Почти все продукты брожений представлены, помимо водорода, низшими жирными кислотами, спиртами и аналогичными продуктами, которые не могут быть сброжены далее.

Группировка *вторичных анаэробов* включает организмы с анаэробным окислительным обменом, обусловленным использованием несбраживаемых продуктов первичных анаэробов в качестве доноров электронов, и внешних неорганических акцепторов электронов в окислительно-восстановительных реакциях, приводящих к образованию полностью окисленного продукта разложения органического вещества —  $\text{CO}_2$  — и восстановленного неорганического соединения.

Важнейшими донорами электронов для вторичных анаэробов служат: 1) водород и/или  $\text{HCOOH}$ ; 2) ацетат и/или этанол; 3) летучие жирные кислоты. Эти соединения лежат на главных трофических маршрутах метаболизма сообщества. Вторичные анаэробы используют *все* продукты первичных анаэробов. Поэтому получается трофическая структура сообщества с *продукт-субстратным* взаимодействием как основным принципом организации. Продукты обобществляются, образуя *пулы*. Поскольку разные организмы образуют сходные продукты, то вместо цепей, получаются *сети*, когда в графе трофических отношений ребра от нескольких узлов сходятся вместе.

Пока мы разбирали лишь донор электрона. Но это составляет только полуэлемент окислительно-восстановительной реакции. Вторую половину составляет акцепторная реакция. Для аэробов акцептором служит кислород. Проблему составляет лишь его транспорт и средство организмов к кислороду, разделяющее их на аэробные и микроаэробные, причем из-за малой растворимости кислорода дело состоит в транспорте его, т. е. физических условиях обитания организма. Для неорганических соединений

четко соблюдается термодинамическая последовательность окислительно-восстановительных потенциалов как предпочитаемых акцепторов; наименее выгодные термодинамически акцепторы используются в последнюю очередь. Поэтому развитие вторичных анаэробов возможно лишь в зоне термодинамической устойчивости восстановленного продукта реакции. Последовательность использования акцепторов электронов включает: 1) восстановление  $\text{Fe}^{3+}$ , 2) восстановление нитратов или *денитрификацию*, 3) восстановление соединений серы в сероводород или *сульфидогенез*, 4) восстановление углекислоты в метан или *метаногенез*.

Каждый из этих процессов наблюдается в природе в определенных условиях, и их оценка служит предметом биогеохимии.

Вопрос состоит теперь в том, насколько общие закономерности биоэнергетики, установленные для отдельного организма, могут быть применены для сообщества в целом. Представляет ли сообщество единство, соответствующее «организму»?

Подобно тому, как внутри клетки микроорганизма сопрягаются энергодающие и энергопотребляющие реакции, в химической системе сопряженных окислительно-восстановительных реакций, осуществляемых микробным сообществом, возможно такое сочетание, которое в сумме дает энергетический выигрыш, достаточный для существования сообщества. Но в отличие от клетки, где есть переносчик энергии, в сообществе условия должны быть таковы, чтобы обеспечить выигрыш, достаточный для существования каждой отдельной группы или вида организмов.

Продукты первичных анаэробов не могут быть разложены далее с выигрышем энергии. Если условия складываются таким образом, что развитие первичных анаэробов проходит очень быстро, вследствие обилия доступных веществ, прежде всего растворимых полисахаридов, то накопление продуктов останавливает развитие сообщества. Типичным примером служит компостирование растительных остатков и его бытовые варианты в виде квашения капусты. В этом случае развитие первичных анаэробов останавливается не из-за использования субстрата, а из-за накопления продуктов, в первую очередь органических кислот. Снижение pH оказывается консервирующим фактором для анаэробов и



на диаграмме Eh-pH левый нижний угол оказывается запрещенным. Напротив, в аэробных условиях органические кислоты окисляются аэробными ацидофильными организмами, например, уксуснокислыми бактериями. Крайний случай представляет окисление органических веществ при pH 2-3 бактериями рода *Acidiphilum*, открытыми как спутники тионовых бактерий.

Как уже упоминалось, вторичные анаэробы в качестве субстратов-доноров электрона получают ограниченный набор соединений, разделяющихся на три категории: водород, ацетат, «летучие жирные кислоты» (ЛЖК). В последнюю группировку причисляются и нейтральные продукты брожения, как спирты. Соответственно этим категориям выделяются H<sub>2</sub>-использующие (водородотрофные) и ацетат-использующие (ацетотрофные) организмы. Анаэробное окисление ЛЖК включает два варианта: прямое окисление при достаточном окислительном потенциале акцептора или конверсию в водород и ацетат особой группой синтрофных организмов.

Прямое окисление ЛЖК известно прежде всего у факультативно анаэробных денитрификаторов, для которых окисление всех продуктов первичных анаэробов представляет вполне банальную вещь и не привлекает специального внимания. Классическим примером такого организма явился *Paracoccus denitrificans*, послуживший для К. Ван Ниль моделью для иллюстрации способности микробов осуществлять разные типы обмена (Клюйвер А., Ван Ниль К. 1959). Действительно, параккок хорошо растет аэробно с широким набором органических веществ. Он может расти хемолитоавтотрофно, как водородная бактерия, и относится к гидрогенотрофам. Хорошо выделяется на ацетате, как ацетотроф. Меньшее внимание привлек его рост на ЛЖК. Те же субстраты параккок использует и с нитратом как акцептором электрона. Подобными же свойствами обладает и широкий круг универсалов-псевдомонад, некоторые бациллы.

Прямое окисление водорода и ацетата осуществляют Fe<sup>3+</sup>-редуцирующие бактерии, многообразие которых установлено лишь недавно. Внимание было сосредоточено на ацетотрофах и гидрогенотрофах, а окисление ЛЖК для этой группы пока не исследовано.

Сенсацией явилось открытие Ф. Видделем (F. Widdel) в 1970-х гг. сульфатредукторов с полным окислением. До этого времени счи-

талось, что сульфатредукторы осуществляют неполное окисление лактата или этанола в ацетат, либо относятся к гидрогенотрофам с модельным организмом *Desulfovibrio*. Это мнение господствовало, хотя уже очень давно, начиная с работ Л. Рубенчика, была известна сульфатредукция на ацетате как мощный природный процесс. Сначала был открыт ацетотрофный *Desulfobacter*, осуществляющий полное окисление ацетата. Затем Виддель описал и чистые культуры сульфатредукторов, окисляющих пропионат, бутират и ряд других несбраживаемых соединений. Таким образом, сульфатредукторы разделились на группы ацетогенных (группа I) и осуществляющих полное окисление органического вещества (группа II, см. табл. 5).

Метаногены способны использовать из всего набора продуктов анаэробных превращений только три вещества: водород, ацетат, метилированные C<sub>1</sub>-соединения. При этом, в отличие от сульфидогенов, они не требуют притока окислителя извне, а могут обходиться CO<sub>2</sub>, образуемым при брожении. Поэтому метаногенное сообщество автономно. Продукт их обмена — метан — остается инертным в анаэробных условиях, несмотря на термодинамическую возможность окисления при сульфидогенезе. Наблюдаемый в природных условиях процесс анаэробного окисления метана пока не воспроизводится в лаборатории даже на уровне устойчивой накопительной культуры с сообществом. В природе установлено симбиотрофное анаэробное окисление CH<sub>4</sub> парой метаноген + сульфатредуктор, образующей консорциум, за счет обращения в этих условиях реакции метаногенеза.

Итак, к сульфидогенезу или метаногенезу ведут два пути: водородный и ацетатный. Остальные пути считаются второстепенными по значимости. Между водородным и ацетатным путями обмена есть мостик, реализуемый группой гидрогенотрофных гомоацетатных бактерий, которые могут осуществлять хемолитоавтотрофно реакцию ацетогенеза, аналогичную метаногенезу:



Оказалось, что в некоторых условиях гомоацетатные организмы могут доминировать; наиболее ярким примером стало психрофильное сообщество тундры. В результате происходит перекачивание потока вещества с гидрогенотрофного пути на ацетотрофный.

## 2.5. МЕЖВИДОВОЙ ПЕРЕНОС ВОДОРОДА И СИНТРОФИЯ

Помимо прямого окисления ЛЖК вторичными анаэробами, существует иной термодинамически возможный процесс разложения этих соединений, обусловленный бинарным взаимодействием между группами микроорганизмов.

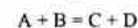
Принципиальным открытием в этой области было открытие М. Брианом и Е. Волиным (М. Bruant, E. Wolin) в 1970-х гг. *катаболической синтрофии*, под которой подразумевалось осуществление реакции катаболизма только в случае взаимодействия двух организмов. На самом деле это понятие имеет гораздо более широкое значение и не позволяет ставить знак равенства между чистой культурой и возможностями микроорганизмов в сообществе. Явление катаболической синтрофии означает, что сообщество микроорганизмов можно и следует рассматривать как биологическое единство, обусловленное термодинамическими возможностями совокупности его компонентов.

Наиболее ясно дело обстоит с водородом. История такова. В 1936 г. Г. Баркер (H. Barker), работая в Дельфте, описал под названием «*Methanobacillus omelianskii*» спорный организм, который образовывал метан из этанола. Потом в Калифорнии ученица Баркера Т. Штадтман (T. Stadtman) описала еще ряд культур метаногенов, которые превращали в метан органические кислоты (бутират, пропионат). Таким образом, была, казалось бы, решена задача описания биологического процесса метанового сбраживания органических кислот, который с очевидностью наблюдался на практике при метаногенезе. В 1970-х гг. с развитием строго анаэробной техники было подтверждено утверждение Н. Зёнгена (N. Söhngen), что большинство метанобразующих бактерий использует водород и есть только два организма, способных использовать ацетат, *Methanosarcina* и *Methanotherix (Methanosaeta)*. Волин и Бриан доказали, что на самом деле культура «*Methanobacillus omelianskii*» содержит два организма: один («форма S»), спорный, близкий к *Clostridium kluyveri*, разлагающий этанол с образованием ацетата и выделением  $H_2$ , и второй (штамм «М.о.Н.»), превращающий  $H_2$  в инертный метан. Реакция выделение  $H_2$  из этанола термодинамически невыгодна и становится

возможной лишь при глубоком удалении  $H_2$  из сферы реакции. В результате суммарная реакция термодинамически возможна и способна обеспечить оба организма необходимой энергией. Реакция была названа *межвидовым переносом водорода*.

За этой работой последовала целая серия других и был разобран ряд реакций с бинарными культурами. Организмы, способные к развитию при условии, что  $H_2$  удаляется из сферы реакции, получили название *синтрофов* и составили особую функциональную группу в сообществе. Из несбраживаемых соединений они образуют ацетат и водород. Синтрофы развиваются совместно с  $H_2$ -использующими анаэробными организмами. Среди  $H_2$ -использующих бактерий важны две группы: литотрофные метаногены и литотрофные сульфидогены. Был описан целый ряд культур, в которых анаэробное окисление субстрата обусловлено присутствием  $H_2$ -использующего компонента.

Развитие синтрофов обусловлено выигрышем свободной энергии за счет уменьшения концентрации продукта. Для реакции



даже при недостаточном или же положительном значении свободной энергии в стандартных условиях возможен выигрыш, если концентрация продуктов мала, и значение концентрацион-

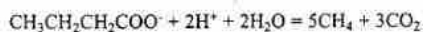
ного члена  $\ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$  перекрывает недостаток энергии в соответствии с уравнением:

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Поскольку окислительно-восстановительная реакция может быть представлена как реакция дегидрогенизации, то ключевой оказывается реакция удаления  $H_2$ . Снижение концентрации  $H_2$  может осуществляться любым способом, например: продувкой газом, реакцией с окислителем (например, с серой, как было показано Е. А. Бонч-Осмоловской для «серозависимых» археобактерий *Desulfurococcus*), но наиболее важным способом удаления служит использование  $H_2$  гидрогенотрофами. В этом случае

процесс принципиально может осуществляться только в присутствии двух организмов: одного, обладающего «выделяющей гидрогеназой», и другого, с «поглощающей гидрогеназой», хотя функции фермента зависят от сопряжения с системой реакций внутри организма. Для сообществ, как и для клеток бактерий, принцип «единства в биохимии» (Einheit in der Biochemie) А. Клюйвера (А. Kluuвер) сводится к окислительно-восстановительным реакциям с переносом водорода, но не дегидрогеназами, а в виде  $H_2$ .

Термодинамика межвидового переноса водорода была разобрана для разложения летучих жирных кислот в метаногенном сообществе Б. Шинком и М. Фридрихом (В. Schink, M. Friedrich, 1994). Рассмотрим окисление бутирата в метаногенном сообществе:



$$\Delta G_0' = -177 \text{ кДж на 2 моля}$$

В метантенке концентрация бутирата составляет 10 мкМ, метана — 0,7 бар, углекислоты — 0,3 бар и выход реакции снижается до -145 кДж, на которые надо прокормить три организма: один, разлагающий бутират на ацетат и водород, второй, окисляющий водород, и третий, ацетокластический. Проходит семь реакций: для бутирата две, для водородного метаногена одна, для ацетокластического метаногена четыре. Для получения трех минимальных выходов энергии по 21 кДж концентрация ацетата должна быть 50 мкМ, а водорода —  $10^{-4,7}$  бар. Нижний термодинамический предел для водорода в реакции метаногенеза составляет  $10^{-5,7}$  бар.

Свободная энергия реакции и окислительно-восстановительный потенциал для наиболее важных реакций приведены ниже.

	$\Delta G_0'$ , кДж	n	$E'$ , мВ
$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O = 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48,3	2	-125, -250
$CH_3CH_2COO^- + 2H_2O = CH_3COO^- + CO_2 + 3H_2$	+76,0	3	+30, -176, -470
$CH_3CH_2OH + H_2O = CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+9,6	2	-190, -375
$CH_3OHCOO^- + H^+ + H_2O = 2CO_2 + 3H_2$	+19,3	3	-92, -331, -470

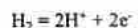
Окисление бутирата осуществляет *Syntrophomonas wolfei*. Гидрогеназа у этого организма расположена в периплазматическом пространстве и ингибируется 2–8 мМ хлористой меди, которая воздействует только на периплазматический фермент. Для активации окисления ЛЖК за счет АТФ организмы вынуждены использовать обратный транспорт. Аналогично идет окисление пропионата у *Syntrophobacter wolinii*. Получая очень мало энергии, синтрофы растут медленно, и общая скорость осуществляемого ими процесса зависит от накопленной биомассы. Поэтому в сообществах наблюдается временное накопление ЛЖК. Синтрофные отношения не обязательно обусловлены деятельностью синтрофов «в строгом смысле», их функции могут выполнять и другие организмы.

При работе с анаэробными культурами, разлагающими малодоступные вещества, синтрофные отношения наблюдаются очень часто. Соответственно нередки и ошибки при описании «чистых культур», которые при проверке оказывались устойчивыми кооперативными комбинациями.

Для термодинамического разрешения роста за счет удаления  $H_2$  из сферы реакции важен тот нижний предел концентрации, до которого тот или иной организм способен удалять  $H_2$ . Довольно быстро было установлено, что сульфатвосстанавливающие бактерии в этом отношении эффективнее метаногенов. Но для не зависящего от внешних акцепторов сообщества важны метаногены. Специальные исследования были проведены с чистыми культурами метаногенов на основе использования высокочувствительного твердоэлектролитного детектора  $H_2$  в Институте микробиологии РАН.  $H_2$  измеряли в газовой фазе, которая предположительно находится в равновесии с жидкой (по закону Генри концентрация растворенного газа находится в равновесии с газовой фазой пропорционально парциальному давлению). Оказалось, что водородные метаногены имеют определенные пороги, до которых они могут снижать содержание  $H_2$ . Для мезофильных штаммов *Methanobacterium* эта величина была около 5 р. р. т., а для *Methanosarcina* — около 50 р. р. т. Для термофильных штаммов *Methanobacterium* пороговая величина была существенно выше, чем для мезофильных, и составляла 20–30 р. р. т. Психрофильных

водородных метаногенов пока в культурах нет. Существенно, что для метаногенного сообщества навоза — а оно представляет богатейший набор разных видов — пороговые концентрации точно соответствовали пороговым значениям для чистых культур водородных метаногенов. Повышение концентрации  $H_2$  было первым сигналом разбалансированности в работе сообщества вследствие какого-либо стресса. Впоследствии аналогичные работы были проведены и в других лабораториях. Определение нижнего порога концентрации  $H_2$  стало стандартным приемом и осуществляется очень просто — определяют конечную концентрацию  $H_2$  в поздней стационарной фазе роста культуры.

Как известно, выделение и потребление  $H_2$  осуществляется гидрогеназами, катализирующими обратимую реакцию:



Следовательно, можно предположить, что устанавливаются некоторые равновесные концентрации  $H_2$ . Впервые такая равновесная концентрация была установлена Т. Н. Жилиной при разложении метанола *Methanosarcina*. При выделении чистой культуры метаногена упорным спутником ее оказался *Desulfovibrio vulgaris*, не использующий метанол, как и другие сульфатредукторы, но растущий с  $H_2$ . Выяснилось, что метилотрофные метаногены при росте на метиламинах поддерживают стационарную концентрацию  $H_2$  за счет его выделения. Таким образом, в бинарной культуре *Methanosarcina* + *Desulfovibrio* метаноген выполнял роль синтрофа по отношению к сульфидогену, имеющему большее средство к  $H_2$ .

Синтрофные отношения исследуются в основном с помощью бинарных культур. Как правило, задача решается путем анализа с выделением чистых культур, за которым следует ресинтез — подтверждение реакции в комбинации двух чистых культур. Обычно комбинированные культуры дают только качественный ответ, количественное соответствие первоначальной накопительной культуре удается редко.

Сейчас известен ряд пороговых значений для разных групп вторичных  $H_2$ -использующих литотрофных организмов. Они располагаются в следующем порядке:

Гомоацетатные	около 1000 р. р. м. $H_2$ (газ)
Метанообразующие	100–10
Сульфатовосстанавливающие	10–1
Железосовосстанавливающие	1–0,1
Аэробные водородные	< 0,1

Межвидовой перенос водорода подвел черту под эпохой исключительного господства чистых культур в бактериологии, юридически закрепленного Бактериологическим кодексом, по которому узаконивались только «чистые культуры в международно-признанных коллекциях». Этот перелом проходил в 1980-х гг. и до сих пор еще не вполне осознан представителями физиолого-биохимического направления и клеточной биологии. Для природоведческого направления общей микробиологии, наряду с чистой культурой, объектом исследования стало микробное сообщество.

Термодинамический выигрыш при удалении продукта реакции может быть получен не только для  $H_2$ , но и для других соединений. Из них особенное внимание привлечен формиат, который обладает высокой растворимостью и не переходит в газовую фазу. Формиат образуется в ряде смешанных брожений, особенно у энтеробактерий и клостридий. Он легко разлагается формиатлиазой по реакции:



Методы определения формиата менее чувствительны и удобны, чем для  $H_2$ , и отчасти поэтому ясности здесь нет. Мнение, что формиат может быть объектом межвидового переноса, сомнению не подвергается, но значение этого процесса в природе оспаривается. Катаболическая синтрофия с межвидовым переносом водорода представляет один из ключевых процессов в анаэробном сообществе. Таким образом, водородный путь с участием гидрогенотрофных вторичных анаэробов в сочетании с явлением синтрофии оказывается принципиальным для сообщества в целом.

## 2.6. АЦЕТАТНЫЙ ПУТЬ И АЦЕТОГЕНЕЗ

Главным продуктом первичных анаэробов и таких вторичных анаэробов, как гомоацетатные бактерии и I группа сульфатредукторов с неполным окислением, является ацетат. Ацетата в

сообществах накапливается много. Может ли ацетат быть объектом межвидового переноса и дать достаточный энергетический выигрыш? Термодинамический расчет показывает, что, в принципе, может. Вопрос состоит прежде всего в том, насколько эффективно используется ацетат в сообществе. Относительно использования ацетата известно, что 70% метана в метантенках образуются через ацетат. Известно только два ацетокластических метаногена — *Methanosarcina* и *Methanosaeta (Methanotherix)*, причем второй обладает значительно большим сродством к ацетату и, следовательно, на термодинамический выигрыш можно рассчитывать только в сообществе, где он доминирует. Моделирование процесса с комбинированными культурами ацетогенов с метанотриком показало, что использование ацетата вроде бы может иметь эффект, но этот эффект был незначительным. Далее, ацетат могут использовать сульфатредукторы II группы с полным окислением. На накопительных культурах сульфатредукторов Л. Рубенчиком давно было показано, что ацетат служит лучшим субстратом для сульфидогенеза и, вероятно, хорошо используется в природе. На использование ацетата ориентированы и серовосстанавливающие сульфидогены, из которых известны два характерных представителя: мезофильный *Desulfobacter* и умеренно термофильная *Desulfurella*. Пороговые концентрации ацетата для них не определены. Кроме того, недавно открытые железовосстанавливающие бактерии, например *Geobacter*, также используют ацетат как предпочтительный субстрат, но опять-таки пороговая концентрация для них не определена.

Положение с ацетатом осложняется тем, что он может использоваться синтрофно с выделением  $H_2$  по образцу других жирных кислот, как это было показано для метаногенного сообщества. Второе осложнение связано с тем, что концентрация ацетата в анаэробных осадках довольно высока и составляет миллимолярные значения, при которых термодинамический выигрыш недостаточен. Заметим кстати, что высокая концентрация какого-либо промежуточного вещества в сообществе означает, что он используется малоэффективно. Требование экологов определить наличие какого-либо вещества в заметной концентрации, как предва-

рительное условие наличия процесса, оказывается принципиально ошибочным для промежуточных метаболитов сообщества. Итак, скорее всего, в большинстве ситуаций ацетат не может служить объектом термодинамически выгодного межвидового переноса. При оценке его использования в сообществе необходимо учитывать и ограничения транспорта органических кислот в клетку.

Из этого обзора межвидового переноса в сообществе видно, что, вследствие обратимости реакции гидрогеназы,  $H_2$  может играть ключевую регуляторную роль в обмене анаэробного сообщества, термодинамически определяя возможное направление процесса. Роль других веществ возможна, но не универсальна. Далее важно, что обратимость реакции может останавливать весь процесс накоплением продуктов, как это происходит с водородом, но не происходит с метаном или ацетатом. Отсюда первостепенное значение для термодинамики имеет концентрация метаболитов в системе. Она определяется сродством организмов к субстратам, а отсюда и кинетикой их роста. С другой стороны, кинетика роста определяет конкуренцию между видами при занятии одной и той же экологической ниши и относится к сравнительной аутоэкологии видов.

## 2.7. ФИЗИЧЕСКАЯ КООПЕРАЦИЯ В СООБЩЕСТВЕ

Взаимодействие в трофических сетях между разнородными организмами обусловлено материальными потоками вещества между ними. Эти потоки зависят от скорости переноса вещества от организма *A* к организму *B* и, следовательно, от расстояния между ними. Перенос растворенных веществ между бактериями микронных размеров осуществляется путем молекулярной диффузии. Разобраться с процессами в пространственно-структурированном микробном сообществе удалось с помощью микроэлектродной техники, разработанной датскими учеными Б. Йоргенсеном (B. Jørgensen) и Н. Ревсбеком (N. Revsbeck) и широко примененной ими для природных сообществ. Ниже излагаются основные положения работы Йоргенсена.

Питание бактерий осуществляется исключительно путем молекулярной диффузии, движущей силой которой служит градиент концентрации вещества вокруг клетки. Он определяется соотношением:

$$C_r = \frac{R}{r} (C_0 - C_\infty) + C_\infty, r > R,$$

где  $C_r$  — концентрация на расстоянии  $r$ ;

$C_0$  — концентрация на поверхности клетки;

$C_\infty$  — концентрация в среде;

$R$  — радиус клетки.

Максимальная скорость поступления вещества к клетке под действием молекулярной диффузии достигается при  $C_0 = 0$ . Тогда общий диффузионный поток  $J$  к клетке:

$$J = 4\pi RDC_\infty,$$

где  $D$  — коэффициент диффузии, равный в воде для большинства мелких молекул примерно  $10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ .

Объем клетки составляет  $\frac{4}{3}\pi R^3$ , и скорость метаболизма клетки, ограниченная скоростью поступления вещества к ней, составляет на единицу объема  $\frac{2D}{R^2 C_\infty}$ . Отсюда поступление субстрата к клетке пропорционально  $\frac{1}{R^2}$ . Чем меньше размеры, тем эффективнее поступление субстрата. Бактерии размерного класса 1 мкм вообще не ограничены диффузией: за 1 с они извлекают вещества из объема, в 600 раз превышающего свой собственный.

Уменьшение объема клетки, которое наблюдается у ряда морских бактерий, обеспечивает более эффективное поступление вещества из крайне разбавленного раствора. В особенности это может быть важно для исключительно мелких фотосинтезирующих организмов «олиготрофного океана», лимитированных по азоту и фосфору. Они представлены недавно обнаруженным пикопланктоном очень мелких цианобактерий, относимых к синехококкам. Другим приспособлением служит изменение отношения «поверхность / объем» за счет образования выростов-протек или вы-

тягивания клеток в тонкие нити и увеличения пространства для расположения транспортных центров на поверхности клетки.

Расстояние  $L$ , которое проходит частица за время  $t$ , пропорционально корню квадратному из времени:  $L = \sqrt{2Dt}$ . Для бактерий размером в 1 мкм это время составляет 1 миллисекунду. Увеличение размеров влечет за собой транспортные ограничения. Время диффузии для молекулы составляет  $t = \frac{L^2}{2D}$ . Для молекулярной диффузии  $O_2$  в воде получены следующие значения:

Расстояние $L$	1 мкм	10 мкм	100 мкм	1 мм	1 см	10 см	1 м
Время $t$	0,3 мс	30 мс	30 с	4 мин	7 час	25 сут	8 лет

В коллоидах плазмы диффузия уменьшается в несколько раз. Очевидно, что в размерном классе более 10 мкм для перемещения вещества внутри клетки необходимы иные решения транспортных проблем, чем молекулярная диффузия. У эукариот, с характерными размерами клеток больше 10 мкм, задача решается локализацией процессов в структурах клетки, например митохондриях. В следующих размерных классах, помимо пространственной организации, необходимы специальные приспособления для транспорта. Нелинейный характер процесса приводит к появлению порогового значения размеров клетки, принимаемого как отличительный признак эукариот. Более крупные размерные классы организмов требуют решения транспортных проблем с участием тканей.

Перемещение клеток бактерий в жидкости с характерной скоростью 30 мкм/с не служит для облегчения поступления питательных веществ. Клетки останавливаются и меняют направление движения примерно каждую секунду. В этом случае их перемещение эквивалентно диффузии мелких молекул. Неподвижные бактерии в 1 мкм под действием броуновского движения имеют коэффициент диффузии  $2 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ , т. е. действительно неподвижны. Для подвижных бактерий коэффициент диффузии составит  $10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ . Их движение с остановками и хаотическим изменением направления движения приводит к диффузии в

направлении субстрата, причем с более частыми остановками или увеличением скорости. Этот механизм создает микрозоны, где бактерии движутся особенно интенсивно и образуют тонкие слои, как это наблюдается, например, у *Rhodospirillum*. Перемещение становится выгодным для получения субстрата лишь у организмов размером около 40 мкм, т. е. крупного фитопланктона.

Турбулентность среды не влияет на молекулярную диффузию к бактериальной клетке, поскольку размеры вихрей составляют несколько миллиметров. Отсюда даже организмы размером в 100 мкм находятся в однородной среде.

Диффузионное поле вокруг частиц зависит от их размеров. Для бактерий размером 1 мкм понятие диффузионного пограничного слоя не имеет смысла, так как 10% от общего падения концентрации происходит на расстоянии 10 диаметров клетки. У агрегатов размером в миллиметры появляется уже гидродинамически обусловленный пограничный слой. Частицы «морского снега», размером примерно 3 мм, уже имеют пограничный слой, и снижение скорости движения воды на 10% происходит на расстоянии 9 радиусов частицы. Экспериментально показанный градиент кислорода падал в темноте от 280 мкМ в воде до 50 мкМ внутри частицы и возрастал на свету до 500 мкМ и выше за счет фотосинтеза диатомовых водорослей внутри частицы. Движение агрегата со скоростью 1 мм/с увеличивает его обмен со средой в 6–10 раз.

До сих пор мы рассматривали поведение взвешенных в объеме воды частиц, которые можно рассматривать как планктон. Иные отношения складываются для бентоса и для обрастаний, таких как биопленки, располагающихся на поверхности донных отложений. В толще воды господствует турбулентная диффузия  $E$ , обусловленная движением вихрей, и выравнивающая концентрации в объеме. Примерно в 1 см от поверхности дна турбулентный перенос ограничивается вязкостью воды, и здесь господствует молекулярная диффузия. Примерно 1/10 от слоя, ограниченного вязкостью, составляет слой, получивший название *диффузионного пограничного слоя*  $\delta_c$  (diffusion boundary layer, DBL) и представляющего резкую границу между областями турбулентной и

молекулярной диффузии. Толщина этого слоя  $\delta_c$  составляет примерно 0,5 мм, и уже на расстоянии в 1 мм от поверхности турбулентный перенос в 10 раз превышает молекулярную диффузию. Поверхность биопленки слизистая. В результате турбулентная  $E$  вблизи поверхности биопленки затухает и на расстоянии долей миллиметра становится меньше молекулярной диффузии  $D$ . Над поверхностью образуется пограничный слой.

Движение воды над поверхностью приводит к утоньшению диффузионного слоя, который при больших скоростях может срываться. В общем, имеет место уменьшение толщины диффузионного слоя при повышении скорости течения над дном. Неровности рельефа приводят к изменению толщины диффузионного слоя, создавая большую мозаичность поверхности. Поэтому данные по пограничному слою относятся к таким поверхностям, как бактериальный мат, но не пористые песчаные осадки, при отсутствии тока грунтовых вод и, главное, отсутствии биотурбации донной фауной.

Диффузионный слой создает барьер между водой и осадком. При большой концентрации окисляемых веществ содержание  $O_2$  у поверхности осадка может быть низким даже при высоких скоростях потока воды, насыщенной кислородом. Такая ситуация наблюдается в областях осадконакопления, и тогда пурпурные бактерии создают слой у поверхности дна, а иногда на поверхность выступают и черные пятна сульфида. Кислород диффундирует через 0,2 мм пограничного слоя за 20 с, а через 1 мм за 480 с. Отсюда возникает задержка в переносе вещества диффундирующих через толщу осадка в воду и обратно. Перенос кислорода (260 мкМ) через диффузионный слой к поверхности, где он полностью поглощается микроорганизмами, имеет предел:

$$J = \frac{D}{\delta_c} (C_0 - C_\infty) = 1 \cdot 10^{-10} \text{ моль} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$$

или  $94 \text{ ммоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сутки}^{-1}$  при экспериментально измеренной величине поглощения  $10+30 \text{ ммоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сутки}^{-1}$  для прибрежных осадков и  $0,03+3 \text{ ммоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сутки}^{-1}$  для глубоководных осадков.

Увеличение скорости потока над биопленкой приводит к уменьшению пограничного слоя от более 1 мм в отсутствие движения

воды до 0,1 мм при скорости потока 8 см/с, обуславливая более резкий градиент, более глубокое проникновение  $O_2$  в мат. Это особенно важно для микроаэробов, как *Beggiatoa* и других градиентных организмов. Над неровной поверхностью мата пограничный слой следует рельефу мата, но возникают микрозавихрения. Состояние пограничного слоя в масштабе 100 мкм удалось экспериментально измерить электрохимически с помощью микроэлектродов по ряду показателей: pH,  $pO_2$ ,  $H_2S$ ,  $N_2O$ .

Внутри слизистой биопленки значения  $D$ , как оказалось, составляют только 50–60% от молекулярной диффузии. Для кислорода ( $C_0$  — концентрация в среде) получается следующая картина:

$$\text{турбулентный поток} = -\frac{EdC}{dL};$$

$$\text{поток через пограничный слой} = -\frac{D(C - C_0)}{L_{nc}};$$

$$\text{поток в осадке} = -\varphi D_0 \frac{dC}{dL};$$

$$\text{дыхание} \frac{dC}{dt} = \frac{Dd^2C}{dL^2}.$$

$$\text{Для стационарного состояния дыхание} = \frac{Dd^2C}{dL^2}.$$

Отсюда по наклону кривой концентрации вычисляется дыхание. Градиенты могут быть очень резкими и зависят от концентрации веществ, в первую очередь от доступного органического вещества, используемого для дыхания. Например, в исследованном заливе у берегов Дании в период до оседания планктона кислород проникал на глубину 4 мм в осадок ила, а после «цветения» лишь на 1 мм. В циано-бактериальных матах градиенты еще более резкие и составляют доли 1 мм.

Поскольку в сообществе происходит обмен продуктами и субстратами между организмами, то значение приобретает перенос вещества от одного организма к другому. Этот перенос осуществляется путем молекулярной диффузии. Перенос от точечного источника пропорционален квадрату расстояния. Поэтому для взаимодействующих организмов важно сближение на *минимальное*

*диффузионное расстояние*. На самом деле источник является не единичным точечным, а некоторое число их распределено в трехмерном пространстве. Значит, оптимальным будет некое подобие кристаллической решетки. Для решения этой задачи биологические приспособления обусловили структурную организацию сообщества разнородных организмов, в котором действуют два противоположных требования. С одной стороны, размножение бактерий приводит к образованию микроколони из однородных организмов, а с другой — необходимо взаимодействие различных видов.

Прямое микроскопическое наблюдение показывает, что в природных условиях образуются группировки разных организмов, часто объединенные общей слизью в микроагрегаты. Они особенно хорошо наблюдаются у водных организмов, начиная с первых шагов микроскопического исследования бактерий в природе в конце прошлого века Ф. Коном. Однако привычка микробиологов использовать для микроскопии препараты «раздавленной капли» сильно затрудняют анализ таких сложных агрегатов с характерными размерами в десятые доли миллиметра. Чтобы преодолеть это затруднение, Б. В. Перфильев разработал специальные приемы микроскопии с помощью плоскопараллельных капилляров. Это дало ему возможность иллюстрировать концепцию *микроразноличия* развития микроорганизмов. Особенно наглядно микрзоны проявляются для железоз- и марганецокисляющих организмов, окрашенных осадками окислов. Микрзоны создают следующую размерную ступень после требований, обусловленных минимальными диффузионными расстояниями в десятки микрон. Такое мозаичное распределение организмов в почве с помощью люминисцентной микроскопии продемонстрировал Д. Г. Звягинцев.

Примером реализации правила минимального диффузионного расстояния может служить организация метаногенного сообщества в очистных сооружениях. Для очистки жидких стоков сахароваренных заводов в Голландии в начале 1970-х гг. Г. Леттинга (G. Lettinga) спроектировал метантенки с восходящим потоком. Установка сначала работала немногим лучше обычных ферментеров с полным смешением. Но постепенно ее работа все



улучшалась и ухудшалась, и наконец многократно превысила проектную эффективность. Оказалось, что ферментер заполнен гранулами миллиметрового размера. Когда гранулы этого осадка разрезали и посмотрели под микроскопом, обнаружили, что они представляют что-то вроде гастролы и сложены рыхлой псевдопаренхимой метаносарцины. В межклеточном пространстве располагались разнообразные палочковидные бактерии, среди которых можно было опознать клостридии. В результате дальнейших исследований в гранулах было установлено наличие полного набора анаэробных организмов, необходимых для полного разложения различных органических веществ. В зрелом осадке (иле) матрицу гранулы представляли сплетенные в клубок нити метанотрикса, в петлях которого располагались другие организмы.

Другим примером подобных же отношений могут служить агрегаты бактерий в аэробной зоне, как хлопья псевдомонады *Zoogloea ramigera* в аэробных очистных сооружениях или нитчатых бактерий *Haliscomenobacter* во всплывающем иле аэротенков.

Наиболее сложную группировку составляет автономное сообщество циано-бактериальных матов, где взаимодействуют многие группы разнообразных бактерий. В таких морфологически оформленных сообществах организмов большей частью можно выявить организм-эдификатор, морфология которого определяет структуру всего сообщества. Строительным компонентом для сообщества служит внеклеточная слизь, которая либо отстраняет другие организмы от микроколонии, например, от жгутов сплетенных трихомов цианобактерии *Microcoleus* или жгутов серобактерии *Thioploca*, либо объединяет разные организмы в сообществе. Одним из вариантов объединения служит образуемая метаносарциной псевдопаренхима со свободными межклеточными пространствами. Иной тип создают нитчатые организмы, переплетение которых образует достаточно механически прочную структуру ткани со свободным пространством между нитями.

Резкие градиенты в сообществе создают оптимальные условия для транспортных процессов в межвидовом обмене метаболитами в сообществе. Вместе с тем микрозоны объясняют и возможность сосуществования, казалось бы, несовместимых процессов. Постоянной загадкой служит развитие анаэробных

организмов в зоне окисленного фотосинтеза. Например, происходит образование метана в слое развития цианобактерий. Такое явление наблюдали в культуре цианобактерии из термофильного мата, подробно изучено выделение метана из клубков *Trichodesmium* в океане. Обычным является нахождение анаэробов в аэрируемом слое почвы. Наружный слой сферической гранулы (комочка почвы) сложен аэробными организмами. При достаточном поступлении растворимого субстрата из внутренней зоны, где разлагается нерастворимое органическое вещество, например растительные остатки, и вследствие медленной диффузии кислорода — в тысячу раз более медленной, чем в газовой фазе — внутри образуется анаэробная зона, где может развиваться анаэробное сообщество. Все это легко может быть подсчитано в модели и получило подтверждение микроэлектродными методами. Для нас важно, что размеры такой гранулы укладываются в миллиметровую шкалу.

Еще более наглядный пример представляют бентосные сообщества. В них последовательные этапы превращения веществ и последовательно действующие функциональные группы организмов располагаются послойно. В результате фронтального одностороннего поступления субстрата временная последовательность реакций превращается в пространственную. Трехмерная организация сообщества трансформируется в одномерную. Особенно тщательно организация сообщества была исследована на примере циано-бактериальных матов.

Модель молекулярной диффузии является не единственной, хотя и наиболее важной. Кроме молекулярной диффузии, значение имеет конвекционный перенос вещества, вследствие, например, температурного перепада днем и ночью. Особые условия возникают, когда в среде имеется турбулентность и возможно перемешивание.

Гомогенное распределение клеток в объеме невыгодно для многих организмов, особенно для их взаимодействия в сообществе. Поэтому развиваются разнообразные приспособления для удержания на месте. Основным приспособлением служит гликокаликс — слизь или чехол. Он может быть важен для разных целей, например, для образования световых колодезев у

фотосинтезирующих организмов, для удерживания на расстоянии других организмов и образования диффузионных каналов. Важнейшим свойством гликокаликса является обобществление его для разнородных организмов и объединение их в морфологически оформленное сообщество. Образование таких сообществ является не досадным препятствием для выделения чистых культур, а биологическим приспособлением, заслуживающим специального изучения, которым оно стало лишь в последние годы. Помимо физической организации химических процессов в сообществе, морфология сообщества имеет своей целью максимальное удержание массы клеток без удаления из зоны реакции. Здесь микроорганизмы осуществляют «анти-хемостатную» стратегию.

В результате организмы развиваются не в водно-солевой среде, как принято думать, а в коллоидной матрице. Это обстоятельство часто не учитывается при биохимическом подходе. В биопленке создается закономерная морфологическая структура — «псевдоткань», сложенная разнообразными организмами. Приведенные примеры гранул в метантенках и, особенно, циано-бактериальных матов, иллюстрируют эту область существования сообществ организмов в природе.

### 3. КОНКУРЕНЦИЯ В СООБЩЕСТВЕ

В сообществе, помимо разобранных кооперативных отношений, существуют и отношения конкуренции. Здесь следует рассмотреть два типа конкурентных отношений: межвидовую конкуренцию и конкуренцию между альтернативными группами в обмене сообществом. У высших организмов межвидовая конкуренция между организмами со сходными потребностями считается одним из основных факторов Дарвиновской эволюции, ведущим к естественному отбору. Согласно правилу Гаузе, установленному на питающихся бактериями видах инфузорий, происходит вытеснение одного вида другим и монополизация общего пищевого ресурса. Уход от конкуренции в разные экологические ниши служит причиной возникновения биоразнообразия. Микроорганизмы, использующие разные субстраты, ограниченно конкурируют

между собой за второстепенные факторы. При использовании одного субстрата выигрыш оказывается за тем из видов, чьи аутоэкологические характеристики позволяют при данных условиях обеспечить наилучшее размножение и выживание. Выше было показано, что скорость роста разных видов изменяется в зависимости от температуры, pH, солености и других экологически значимых факторов. Соответственно происходит и отбор наиболее приспособленных к данным условиям видов. Наиболее четко отражается эта закономерность в кинетике роста.

#### 3.1. КОНКУРЕНЦИЯ ЗА ЭКОЛОГИЧЕСКУЮ НИШУ И КИНЕТИКА РОСТА

Между видами, способными к использованию одного субстрата, возникают конкурентные отношения. Таких отношений нет между членами сообщества, использующими разные субстраты. Конкуренция между ними может касаться второстепенных факторов, но основной тип взаимодействия в микробном сообществе — трофический — не дает оснований для возникновения конкурентных отношений. Таким образом, конкуренция происходит в пределах одной физиологической группы, обозначенной боксом на графе трофических отношений.

Успех в конкурентной борьбе предполагает по умолчанию наибольшую достигаемую биомассу данного вида, обычно выражаемую через число особей  $N$ . Этот критерий достаточен в определенных пределах, но могут быть и другие не столь очевидные критерии, например, выживаемость особей, а для большого времени — длительность существования вида, его *персистентность*. Очевидно, что число особей не может возрастать неограниченно, а достигает некоторого предела, обусловленного емкостью среды  $K$ . Тогда скорость роста зависит от уже накопленного числа особей и описывается логистическим уравнением Ферхюльста (1838):

$$\frac{dN}{dt} = rN \left( 1 - \frac{N}{K} \right),$$

где  $r$  — коэффициент экспоненциального роста, а  $t$  — время.

Применение кинетического анализа к жизни микроорганизмов в почве подробно исследовано Н. С. Паниковым (1991), к книге которого мы и адресуем читателя.

Представим себе два организма  $A$  и  $B$ , использующие один и тот же субстрат. Для них можно изобразить две кривые зависимости  $\mu$  от  $s$ . Пусть для  $A$   $\mu_m$  меньше, чем для  $B$ , но и  $K_s$  меньше, чем для  $B$ . Тогда существует такой диапазон малых концентраций  $s$ , при которых медленно растущий  $A$  выигрывает у быстро растущего  $B$ . Это соотношение характеристик двух конкурирующих организмов, получившее название «правила скрещивающихся кривых», определяет преимущество того или иного организма при освоении субстрата в зависимости от его концентрации. Оно было наглядно продемонстрировано на хемостатных бинарных культурах *Pseudomonas*, относящегося к типу  $B$ , и *Spirillum* типа  $A$ .

Однако, переходя к природным условиям, можно найти целый ряд дополнительных соображений, ограничивающих абсолютизацию правила скрещивающихся кривых. Во-первых, несмотря на меньшую скорость роста в бинарной культуре,  $A$  все-таки растет и составит некоторую часть популяции. Удаление  $A$  из культуры может произойти только при равной вероятности гибели для  $A$  и  $B$ , например, за счет вымывания из проточной культуры. Но вероятность гибели определяется иными факторами, чем скорость роста. Во-вторых, успешная колонизация субстрата зависит от исходного числа клеток  $N_0$  и при большом засеве относительно медленно растущий  $A$  может доминировать. Такая возможность возникает за счет большого числа устойчивых клеток, например спор, в среде и зависит от быстроты прохождения ими лаг-фазы, т. е. пробуждения к активному росту. Наконец, в-третьих,  $\mu_{max}$  характеризует определенные условия среды и широко варьирует в зависимости от температуры, pH, солености. В результате использование одного и того же субстрата в разных условиях дает преимущество разным организмам, и число потенциальных возможностей для видовой разнообразия в выполнении одной и той же функции в сообществе многократно возрастает.

При рассмотрении конкуренции, основанной на кинетике роста, подразумевалось, что речь идет о субстрате как доноре элект-

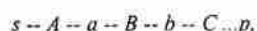
рона. Но кроме донора организм нуждается и в акцепторе. Растворимость кислорода в воде очень невелика и составляет менее 10 мг/л. При ограничении кислородом возникает конкуренция за него между аэробными организмами и микроаэробными (микроаэрофилами), развивающимися при концентрации кислорода около 1 мг/л. Отсюда конкуренция между аэробными организмами, даже использующими разные субстраты, может быть очень жесткой.

Ограничение роста «лимитирующими факторами» может относиться не только к энергетическому субстрату катаболизма, но и к субстратам анаболизма, объединяемым под понятием необходимых факторов роста. К ним могут относиться аминокислоты, витамины, минеральные компоненты не только как основные биогены N, P и S, но и соединения таких элементов, как K, Mg, Fe и большой ряд микроэлементов. Для всех этих лимитирующих факторов в хемостатной культуре (при равной вероятности гибели) было выведено правило, что число видов должно быть равно числу лимитирующих факторов (Н. С. Печуркин, 1978).

Таким образом, исходя из большой скорости размножения микроорганизмов как организмов с коротким жизненным циклом, мы вправе ожидать, что в природе большинство организмов находится в состоянии голода или лимитации субстратом и соответственно скорости их размножения минимальны. Высокая скорость размножения бактерий, наблюдаемая в лабораторных культурах, оказывается мифом, опасным вследствие своей устойчивости; речь может идти только о *потенциально высокой* скорости размножения. Физиологическое состояние организмов в природе определяет их способность к размножению. На основе молекулярных методов идентификации вида микроорганизмов и его численности в природе оказалось, что значительная часть популяции относится к так называемым *некультивируемым формам*, т. е. не прорастающим при высеве на лабораторные среды. Итак, для бактерий основным выражением конкуренции служит кинетика роста и отмирания.

Скорость роста зависит от концентрации субстрата, и по мере его истощения должна происходить смена доминирующих видов. В трофической цепи, где продукт обмена  $a$  одного организма  $A$

служит субстратом для организма В с другими возможностями обмена, возникает трофическая цепь:



где  $s$  — субстрат на входе в пищевую цепь, а  $p$  — продукт на выходе. При этом численности организмов стремятся к максимуму, а концентрации промежуточных продуктов — к минимуму. В результате сначала происходит адаптация организма к уменьшающейся концентрации субстрата путем включения все более эффективных систем улавливания субстрата и повышения *сродства* к нему за счет смены транспортных систем, а когда концентрация субстрата достигает минимального концентрационного порога для данного организма, возможна смена его другим видом с большим сродством. Классическим примером служит смена в описанном выше метаногенном сообществе ацетокластических организмов: в начале при высокой концентрации ацетата преобладает крупная метаносарцина с  $K_s = 5$  мкМ и относительно высокой скоростью роста, а при снижении концентрации ее сменяет нитевидный метанотрикс с  $K_s = 0,5-1$  мкМ и в пять раз меньшей скоростью роста. В результате при большом времени существования сообщества в нем должны преобладать виды организмов с высоким сродством к субстрату, способные развиваться при очень низкой его концентрации, обозначаемой как пороговая. Вместе с тем при низкой концентрации субстрата все большая доля доступной энергии уходит на энергию поддержания, которая не используется для роста численности организма.

### 3.2. ЖИЗНЕННЫЕ СТРАТЕГИИ

При всем разнообразии потенциальных ниш, тем не менее можно утверждать, что в мире микробов дарвиновские принципы межвидовой конкуренции полностью реализуются при занятии определенной позиции в трофической системе. Реализация конкурентных отношений в первую очередь определяется кинетикой роста в данных условиях при освоении питательного субстрата. Хемостат, обуславливающий равную вероятность гибели, представляет наглядный лабораторный пример автоселекции. Однако

«выживание наиболее приспособленных» зависит не только от максимальной скорости роста при лимитировании субстратом, но и от способности противостоять гибели от внешних причин и отмиранию от внутренних. Отсюда возникает представление о «жизненных стратегиях» организмов, для которых экологи, прежде всего геоботаники, разработали классификацию с соответствующей терминологией: для организмов, колонизирующих субстрат — «эксплеренты», для активно подавляющих конкурентов — «виоленты», для переживающих — «пациенты».

Для классификации поведения разных видов в местах их обитания применяются разные подходы. Они имеют значение главным образом для наиболее многочисленных функциональных групп в сообществе: 1) первичных продуцентов, представленных окислительными фотоавтотрофами; 2) аэробных деструкторов с органогетеротрофным типом обмена. Для относительно немногочисленных представителей высокоспециализированных групп большее значение имеет их положение в трофической системе, определяемое морфо-физиологическими критериями и специфической кatabолизма, а также кинетикой роста.

По *стратегиям роста* в соответствии с логистическим уравнением Ферхюльста выделяют два типа:

$r$  — стратеги, которые обладают высокой удельной скоростью роста, приближающейся к максимальной при освоении субстрата или места обитания, это колонизаторы, пионерные формы, *зимогены* по терминологии Виноградского;

$K$  — стратеги, приспособленные к существованию при насыщении емкости среды обитания, это представители *климаксного* или зрелого состояния сообщества.

Эти две стратегии сопоставляются с обилием субстрата. Организмы, развивающиеся при обилии субстрата получили название *копиотрофов*, а при низкой концентрации — *олиготрофов*. Количественная оценка притока субстрата для водных копиотрофов составляет более  $50 \text{ мг } C_{\text{орг}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сутки}^{-1}$ , а для олиготрофов менее  $1 \text{ мг } C_{\text{орг}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сутки}^{-1}$ , оценки получены из хемостатных опытов. Оба понятия, при всем их удобстве в практическом употреблении, не определены четко. Казалось бы, среди  $K$ -стратегов должны были бы доминировать олиготрофы, но это не совсем так.

В зрелом сообществе большее значение приобретают межвидовые связи, в то время как  $r$ -стратегии менее зависят друг от друга. Лабораторные чистые культуры, по определению, должны быть представлены  $r$ -стратегиями, не зависящими от других членов сообщества и способными развиваться в свежей среде, колонизовать ее.

Приведенные жизненные стратегии обусловлены *временем развития* сообщества в данном месте обитания или *сукцессией*, последовательностью смены видов в нем.

### 3.3. КОНКУРЕНЦИЯ МЕЖДУ ГРУППАМИ В СООБЩЕСТВЕ

Помимо межвидовой конкуренции за доминирование в пределах одной экологической ниши, существует конкуренция между группами организмов в пределах сообщества. Уже упоминалось, что предпочтение между акцепторами электрона для одних и тех же доноров определяется термодинамическими причинами с использованием в первую очередь реакций, дающих наибольший энергетический выигрыш. Наглядно этот тип конкуренции можно рассмотреть на уже неоднократно обсуждавшемся примере конкуренции между сульфидогенами и метаногенами, как это было сделано В. А. Вавилиным на основе данных микробиологов для очистных сооружений, где процесс идет в контролируемых условиях в очень большом масштабе.

Сульфидогены и метаногены имеют сходные доноры электрона —  $H_2$  и ацетат, но разные акцепторы. При конкуренции следует учитывать кинетические свойства организмов. Если имеется рост, то используется кинетика Моно с  $K_s$  и  $\mu_{max}$ :

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

если же рост отсутствует, то кинетика Михаэлиса-Ментен с  $K_m$  и  $V_{max}$ :

$$V = \frac{V_{max} S}{K_m + S}$$

В иле и в реакторах избыток сульфата приводит к полному подавлению водород-использующих метаногенов: нижнее пороговое значение  $H_2$  для метаногенов 1,1 Ра, а для сульфатредукторов этот порог ниже и составляет 0,2 Ра.

Порядок использования  $H_2$  и ацетата в анаэробном сообществе очень четкий: первым утилизируется  $H_2$  и только с большой задержкой начинает использоваться ацетат. Это не столь отчетливо видно по значениям  $\mu_{max}$  для чистых культур. В морских и пресноводных осадках ацетат потребляется в основном сульфатредукторами в условиях избытка сульфата. В метантенках это не так ясно. В морских осадках *Desulfobacter postgatei* имеет большее сродство к ацетату, чем *Methanosarcina barkeri*. Но в метантенках метаносарцины работают только в переходный период, уступая место метанотриксам, которые имеют большее сродство к ацетату. При оценке конкуренции следует учитывать и начальное соотношение биомассы конкурирующих организмов. Особенно важно это для медленно растущих организмов. Находящиеся в избытке организмы могут получить преимущество даже при худших для данных условий кинетических характеристиках.

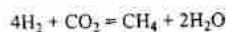
Сульфатредукторы зависят от концентрации сульфата и скорости его поступления, что важно, например, в интерстициальной воде осадков. При высокой скорости потребления сульфата он может стать лимитирующим в биопленках с толщиной менее 1 мм. В отношении сульфата виды сульфатредуцирующих бактерий различаются: для морского *Desulfobacter postgatei*  $K_m$  по сульфату составляет 200 мкМ, а у *Desulfovibrio* — 5–77 мкМ.

Конкуренция между использующими ЛЖК сульфатредукторами и синтрофными организмами сложна. При высокой концентрации сульфата эти сульфатредукторы растут быстрее синтрофов и являются основными потребителями ЛЖК. При низкой концентрации сульфата возможно разложение ЛЖК синтрофами на ацетат и водород с конкуренцией за эти субстраты между метаногенами и сульфатредукторами. Поскольку рост ацетогенов идет значительно лучше в кооперации с сульфатредукторами, создающими более низкий порог водорода, то вполне вероятен вариант, при котором гидрогенотрофные сульфатредукторы и ацетокластические метаногены создают трофическую систему разложения

пропионата. В отсутствие сульфата сульфатредукторы могут функционировать как синтрофные ацетогены. В этом случае они растут с метаногенами как организмами, удаляющими водород.

Помимо сродства к субстрату, необходимо учитывать и влияние продуктов обмена. Токсичность сульфида определяется присутствием  $H_2S$ , который может диффундировать в клетку;  $pK$  для диссоциации около 7, и поэтому небольшие вариации в  $pH$ , в пределах  $pH$  6–8, могут оказывать сильное воздействие на сообщество. Сульфид подавляет рост метаногенов, но в гораздо большей концентрации, чем самих сульфидогенов. Так, свободный  $H_2S$  подавляет метаногенез на 50% при концентрации 50–270 мг/л, а сульфатредуцирующих бактерий при 85 мг/л. Полное подавление *Desulfovibrio* происходит при 550 мг/л  $H_2S$ . Выше  $pH$  7,5 токсичность  $H_2S$  резко снижается, вследствие доминирования ионов гидросульфида и сульфида. Однако в алкалофильном сообществе при  $pH$  10,2 токсичность сульфида тоже проявляется очень резко и конечная концентрация сульфида в культурах алкалофильных сульфатредукторов обычно достигает не более 30 мМ. При этом не происходит угнетения продуцирующих  $H_2$  спиروهет. Если в сообществе присутствуют пурпурные бактерии, окисляющие  $H_2S$ , то разложение органического вещества идет гораздо быстрее и концентрация  $H_2S$  не поднимается выше лимитирующего уровня. В нейтрофильных условиях удаление  $H_2S$  и снижение его токсического действия часто обусловлено связыванием  $H_2S$  железом в нерастворимые сульфиды.

Другим примером конкуренции между функциональными группировками может служить конкуренция между гидрогенотрофными метаногенами и гомоацетатными бактериями. Организмы осуществляют реакции:



Метаногены, как уже упоминалось, обладают гораздо большим сродством к  $H_2$ , чем гомоацетатные бактерии, и поэтому в мезофильных условиях они выигрывают конкуренцию. В мезофильных условиях при температуре 18 °С основным продуктом

анаэробного разложения оказывается метан. Но при температуре ниже 15 °С высока скорость роста психроактивных гомоацетатных бактерий, и они становятся главенствующей группой, как было показано для анаэробного психрофильного сообщества тундры. В результате происходит переключение с метаногенеза на ацетогенез в зависимости от температурного порога, а не от набора субстратов. Таким образом, выигрыш зависит не только от сродства к субстрату, но и скорости роста при данных условиях, которая может быть резко различной; в приведенном примере — в зависимости от температуры. В условиях пониженных температур психроактивное сообщество переключается с метаногенеза на ацетогенез.

#### 4. ОБЩАЯ СХЕМА ТРОФИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ В СООБЩЕСТВЕ

Ознакомившись с общими принципами бинарных взаимоотношений между функциональными группами организмов можно приступить к построению общей схемы взаимоотношений в сообществе. Удобнее всего начинать этот анализ с конца трофической цепи, так как здесь приходится разбирать реакции с относительно небольшим числом субстратов и групп. Возьмем за основу метаногенное сообщество.

##### 4.1. МЕТАНОГЕННОЕ СООБЩЕСТВО

Трофические отношения в анаэробном сообществе были подробно рассмотрены выше, и поэтому здесь можно сразу построить граф отношений (рис. 34).

В трофическую систему входят немногие функциональные группы организмов. Разложение мортмассы начинают гидролитики, специализированные по определенным полимерам, например, целлюлозолитические, пектинолитические, пептолитические и т. д., образующие веер маршрутов, сходящихся к немногим промежуточным олигомерам. В сочетании с ними действуют лишённые гидролитической активности диесипотрофы, использующие растворенные олигомеры. Если гидролитики ограничены

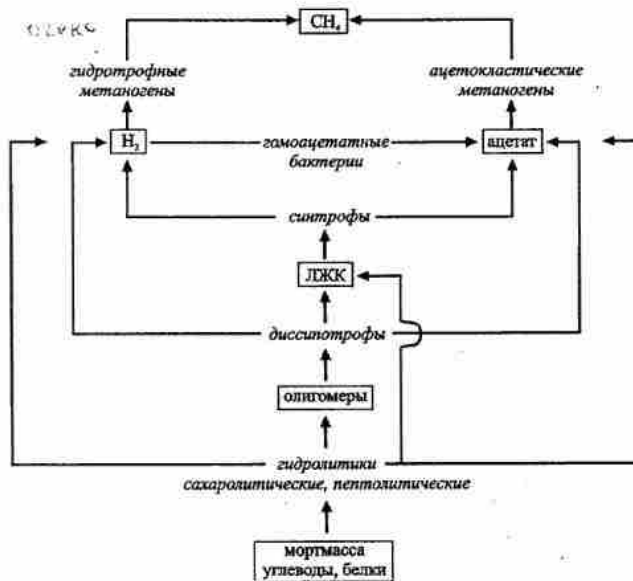


Рис. 34. Метаногенное сообщество

поверхностью гидролизуемых веществ твердой фазы, то для диссипотрофов ограничение обусловлено притоком рассеиваемых веществ. Анаэробные гидролитики и диссипотрофы составляют группировку первичных анаэробов-бройщиков, осуществляющих водородную или кислотогенную фазу с образованием несбраживаемых продуктов.

Образующие гидролитиками и диссипотрофами  $H_2$  и ацетат могут использоваться соответственно гидрогенотрофными и ацетокластическими метаногенами. Иные продукты брожения и гидролиза, суммарно обозначенные как ЛЖК, разлагаются при межвидовом переносе водорода с участием ацетогенных синтрофных бактерий при условии эффективного удаления  $H_2$  гидрогенотрофными метаногенами.

Если же  $H_2$  не используется гидрогенотрофными метаногенами в силу каких-либо причин, например низкой температуры, то начинает действовать гомоацетатный шунт, в котором гидрогенотрофные гомоацетатные бактерии образуют ацетат по реакции:



В рассмотренном сообществе необходимо взаимодействие всех групп, причем гидрогенотрофные метаногены играют роль конечного стока для  $H_2$ , обеспечивающего возможность разложения ЛЖК синтрофами. В противном случае  $H_2$  ингибирует разложение ЛЖК. Сходную роль выполняют и диссипотрофы по отношению к гидролитикам. Таким образом, здесь имеются и термодинамически обусловленные обратные связи, и регуляторные связи. Если в сообществе имеется дисбаланс между группами организмов, например, вследствие избытка легкодоступных углеводов, то происходит ингибирование микроорганизмов образующимися органическими кислотами вследствие снижения pH.

Допустим, что рассматриваемое сообщество развивается в пищеварительном тракте животного, клетки эпителия которого способны усваивать жирные кислоты. Тогда ЛЖК и ацетат будут использоваться для питания организмом животного, и только часть их перейдет вторичным анаэробам микробного сообщества. Здесь возможны два варианта: метаногенез, свойственный жвачным животным, термитам и тараканам, или ацетогенез, свойственный большинству насекомых. В случае ацетогенеза выделяемым летучим продуктом будет  $H_2$ , поскольку ацетогены имеют гораздо более высокую его пороговую концентрацию. При этом часть энергии теряется. При метаногенезе, как у жвачных, конечным продуктом служит метан. Разделить организмы на две группы по терминальным процессам в их пищеварительном тракте можно, анализируя газохроматографически газы, выделяемые с фекалиями, выносящими доминирующую микрофлору. Оказалось, что животные довольно четко разделяются на группы по газам микрофлоры пищеварительного тракта, причем это совсем не связано с растительноядным или же хищным способом питания. Например, питающаяся бамбуком большая панда оказалась в группе выделяющих водород. Хорошая корреляция обнаружилась





смены сообщества с появлением других видов в тех же функциональных группах микроорганизмов.

Сульфидогенное сообщество играет чрезвычайно большую роль в морских условиях, причем большая часть органического вещества в донных осадках разлагается по этому пути. Ограничивающим фактором служит приток сульфата извне. Регенерация сульфата возможна двояким путем: либо  $H_2S$  окисляется в аэробных условиях, либо анаэробно окисляется в сульфат аноксигенными фототрофными бактериями.

Характерным во взаимодействии сульфидогенного и метаногенного сообществ служит существование так называемого «неконкурентного  $C_1$ -пути». Например, при разложении пектина образуется метанол, не используемый сульфатредукторами, но окисляемый метилотрофными метаногенами. Даже при избытке сульфата и подавлении других метаногенов, например, в гиперсоленых водоемах, метилотрофные метаногены продолжают действовать в «неконкурентном пути» метаногенеза и служить источником метана. Для простоты на схеме неконкурентный  $C_1$ -путь не показан.

#### 4.3. АНОКСИГЕННОЕ ФОТОТРОФНОЕ СООБЩЕСТВО

В фотической анаэробной зоне заключительный этап существенно трансформируется (рис. 36). Аноксигенные фототрофы способны окислить практически все продукты первичных анаэробов ( $H_2$ , ацетат, ЛЖК) и  $H_2S$  как продукт сульфидогенов. При этом может образовываться и молекулярная сера, служащая субстратом для сероредуцирующих сульфидогенов с гораздо более широким кругом используемых веществ, чем у сульфатвосстанавливающих. Однако фотическая зона находится вне области действия гидролитиков, развивающихся в затененных донных осадках. Между продукцией субстратов для фототрофов и фотической зоной образуется транспортный разрыв, через который переносится главным образом  $H_2S$ . Окислять метан фототрофные организмы не способны.

Развитие фототрофных организмов в виде последовательных слоев моделируется «колонкой Виноградского»: это цилиндр, на

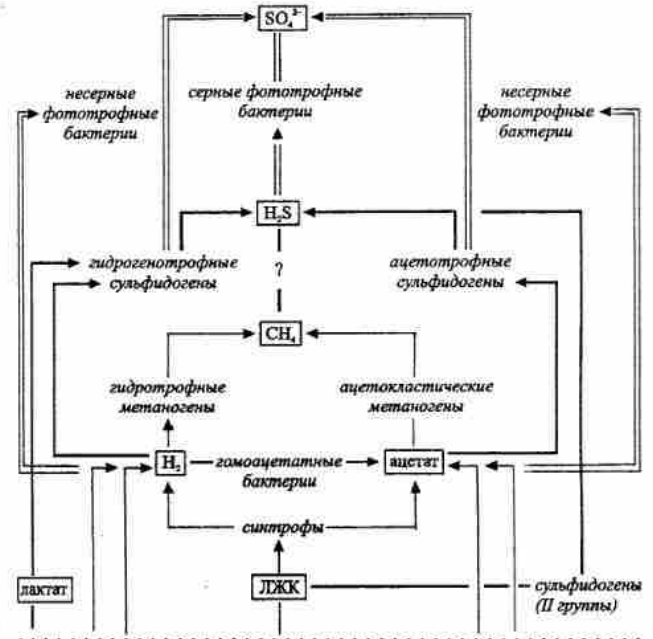


Рис. 36. Окислительный аноксигенный фототрофный фильтр

дне которого находится ил с медленно разлагающимся органическим веществом, к которому иногда добавляется гипс, и идет сульфидогенез, окрашивающий ил в черный цвет. Выше последовательными зонами располагаются фототрофные организмы серного цикла: внизу зеленые, выше различные пурпурные и, наконец, у поверхности — цианобактерии. Яркая окраска слоев позволяет наглядно видеть стратификацию фототрофных микроорганизмов, в зависимости от окислительно-восстановительных условий. В природе слои, аналогичные колонке Виноградского, наблюдаются в песке на берегу моря.



## 4.5. АЭРОБНОЕ СООБЩЕСТВО

Далее следует перейти к аэробному сообществу (рис. 38). Центральное место в нем занимают первичные продуценты — кислородные фотоавтотрофы. Они в дневное время служат источником  $O_2$  и экскретируемых органических веществ, которые могут быть использованы сопутствующими органотрофами, а для сосудистых растений — и обитателями ризопланы, потребляющими корневые выделения. В ночное время фотоавтотрофы используют запасные вещества для дыхания. В тех бентосных сообществах цианобактерий или водорослей, которые оказываются ночью в анаэробной зоне, темновой метаболизм может быть обеспечен брожением запасных углеводов в виде полиглюкозы, а у цианобактерий и брожением аргинина. Главным продуктом первичных продуцентов служит мортмасса фотоавтотрофов, включающая в себя две категории веществ: легко разлагаемые запасные вещества и компоненты цитоплазмы, преимущественно растворимые (РОВ) и нерастворимые структурные компоненты, прежде всего клеточной стенки (ВОВ), поступающие в виде опада.

Аэробные органотрофы очень разнообразны и представляют группу, привлекающую более всего внимания на уровне чистых культур. Для системы трофических связей характерна структура сходящихся пищевых маршрутов в виде перевернутого «веера», где каждое вещество имеет своего специалиста. «Веер» сходится к  $CO_2$  как конечному продукту и суммарное действие аэробов определяется по дыханию: образованному  $CO_2$  и/или потребленному  $O_2$ . В трофической системе, помимо специализации по субстратам, можно различить группы зимогенов-копиотрофов, гидролитиков, диссипотрофов, автохтонов.

Использование веществ, экскретируемых кислородными фотоавтотрофами, ведет органотрофов к временной экспозиции в условиях гипероксии, и поэтому аэробы этой группы должны иметь эффективную защиту от токсического действия  $O_2$ , усиливающегося действием света. Характерным признаком служит образование антиоксидантов каротиноидов, свойственных, например, бактериям, развивающимся в сообществе с литофильными лишайниками, особенно в высокогорье.

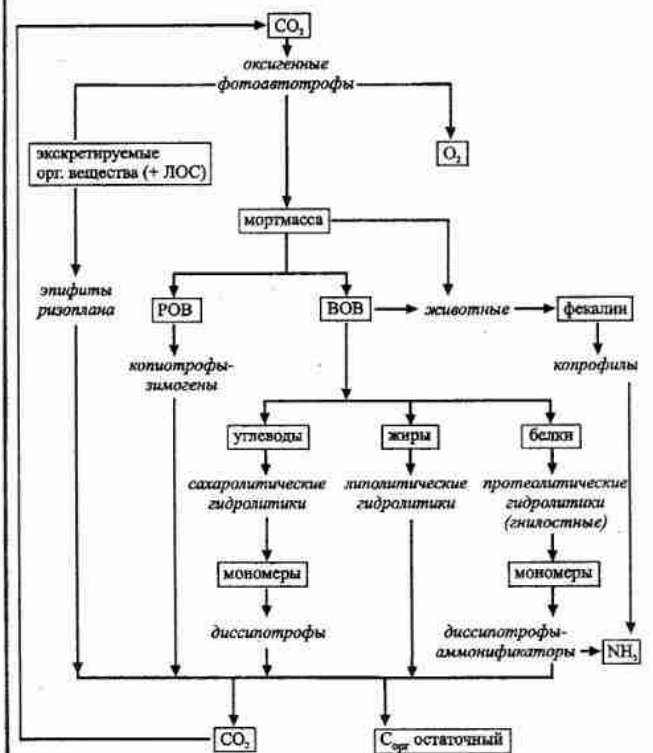


Рис. 38. Аэробное сообщество

Дыхание с потреблением  $O_2$  создает барьер для его диффузионного проникновения, обеспечивая условия для развития анаэробного сообщества.

Растворенные вещества служат субстратом зимогенной микрофлоры, представленной копиотрофами. Белковые соединения разлагаются протеолитическим путем гниения, с участием

аммонифицирующих организмов; аммиак поступает нитрификаторам. В природе этапы деградации можно наблюдать при самоочищении водотоков, в которых выделяются зоны сапробности от сильно загрязненных к очищенным водам. Моделью интенсивного разложения легкодоступного органического вещества служат аэрируемые очистные сооружения. Критическим фактором служит доступность кислорода: при высоком содержании органических веществ поступление его путем диффузии становится недостаточным и преимущество получают факультативно анаэробные организмы. Практическим приемом определения дыхания за счет растворенных веществ служит определение «биохимического потребления кислорода» — БПК. Обычно определяется потребление  $O_2$  за 5 суток (БПК<sub>5</sub>) в исследуемой природной воде или после ее разбавления аэрированной водой. БПК служит очень надежной мерой определения доступного органического вещества.

Особую роль среди экскретируемых растениями веществ представляют летучие органические соединения (ЛОС), например терпены, выделяемые растениями и токсичные для бактерий. Н. Г. Холодный обнаружил бактерии, использующие ЛОС, разветвленная структура, в листьях деревьев. Продукция ЛОС важна для химии тропосферы и образования тропосферного озона.

Нерастворимые вещества подвергаются гидролизу специализированными группами организмов. В водоемах взвешенное органическое вещество (ВОВ) в значительной степени оседает на дно и, вследствие медленной диффузии  $O_2$ , поступает в анаэробную зону. Этого не происходит при больших глубинах океана, где процесс разложения успевает закончиться в частичках «морского снега» — оседающих хлопьях ВОВ. В наземных экосистемах ведущую роль играет гидролиз лигноцеллюлозы растительных остатков. Наземные гидролитические организмы часто имеют мицелиальное строение и представлены эукариотными микромицетами и актиномицетами. Последние доминируют при разложении мортмассы грибного мицелия, представленного полимером глюкозамина хитином. Из бактерий характерными целлюлозолитическими организмами являются циофаги, целлибрио, некоторые миксобактерии. Особый путь представляет разложение лигнина, осуществляемое только грибами с помощью перекисно-

го механизма, принципиально зависящего от доступности кислорода. Образующиеся при этом фенольные соединения используются бактериями. Сообщество грибов как важнейших деструкторов одревесневшей растительной массы работает на главных трофических маршрутах в лесных экосистемах. Для водосемов грибы нехарактерны и представляют вторичных вселенцев.

Гидролитические организмы образуют сложные сообщества с диссипотрофами, в которых важны не только связи по основному субстрату, но и взаимозависимость по анаболизму, обмен факторами роста. Группировка аэробных диссипотрофов, характерным представителем которых служат простекобактерии, очень важна в сообществе, начиная доминировать на поздних стадиях микробной сукцессии деструкторов.

Особую роль в аэробных системах играют животные. Зоотрофный тип питания ориентирован на использование твердой пищи. Животные измельчают растительные остатки и в полупереваренном виде извергают их в виде фекалий. Особое значение эта цепь имеет в океане, где масса фитопланктона невелика и прирост быстро потребляется планктонными ракообразными, прежде всего различными копеподами (веслоногими), плотные фекальные частицы которых так называемые «пеллеты», будучи довольно тяжелыми, оседают в толще воды. Опускающиеся в толще воды пеллеты обрастают бактериями. На мелководье аналогичную роль играют животные-фильтраторы, создающие сложные биоценозы типа коралловых рифов. По оценке Ю. И. Сорокина, 70% органического углерода в экосистеме коралловых рифов проходит через бактериальную цепь. Животные с зоотрофным питанием и фаготрофные протисты обеспечивают бактериолитическую петлю, связанную с разложением бактериальной мортмассы. Животные дают начало особой регенеративной петле в цикле азота, связанной с продукцией мочевины, ее разложением уробактериями и нитрификаторами, дающими связанный азот для фитопланктона.

В системе аэробных деструкторов характерным продуктом оказываются остаточные вещества, например, лигнин и трудно разложимые соединения, которые дают начало гумусовым веществам. В цикле углерода эти устойчивые соединения играют

первостепенную роль при переходе ко времени геологических масштабов и эволюции биосферы в целом. Они разлагаются «автотонной» микрофлорой, как обозначил С. Н. Виноградский микроорганизмы «черного пара». Разложение идет преимущественно по пути соокисления, когда образующиеся при дыхании перекиси хаотически разрушают углеродный скелет устойчивого соединения, а продукты, часто циклические, используются автотонной микрофлорой. К ней принадлежат олиготрофные организмы иного типа, чем диссидотрофы.

#### 4.6. УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ ТРОФИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ В СООБЩЕСТВЕ

Представленная схема взаимоотношений трофических групп в микробном сообществе должна с той или иной степенью полноты реализовываться в сообществах, населяющие разные биотопы. Соответственно перечисленные группы организмов должны содержать виды, приспособленные к развитию при высокой температуре в термофильном сообществе, при низкой — в психрофильном. В пресных водоемах, в море развиваются свои сообщества; при повышенной солёности в лагунах — галофильное сообщество; в почве, в горных породах — свои. Особенно велико разнообразие продуцентов — цианобактерий, водорослей, растений — и органотрофов, аэробных и анаэробных, лежащих на главном маршруте разложения органического углерода в сообществе. В сообществе с обилием органического вещества, например в сточных водах, число культивируемых видов составляет многие сотни. Доминируют, однако, немногие десятки.

В природоведческой микробиологии требуется знание особенностей функционирования всех таких сообществ и характеристик входящих в них ключевых организмов. Поэтому знание разнообразия микробного мира является необходимым требованием для работы в этой области.

Построение трофических сетей, кажется, дает возможность для математического моделирования системы, основываясь на материальном балансе и кинетике роста микроорганизмов. Примером таких построений может служить модель метаногенного

сообщества, предложенная В. А. Вавилиным (1997). Однако разнообразие микробного мира служит причиной многочисленных отклонений, и разумно пользоваться упрощенными количественными моделями. С другой стороны, инженерная практика, прежде всего в области очистки сточных вод, привела к созданию обобщенных моделей без детализации поведения отдельных групп и тем более видов.

Качественные модели, представленные здесь в виде графов, дают иную возможность: присутствие «висячего ребра», заканчивающегося ничем, означает возможность найти пропущенную экологическую нишу и заполняющую ее группу организмов. Справедливо и обратное: наличие специализированного организма, использующего вещество, путь образования которого неизвестен, заставляет искать продуцента этого вещества. Таким образом, построение графов трофических отношений для исследуемого сообщества носит характер творческого поиска.

#### 4.7. СООБЩЕСТВО И ФИЛОГЕНИЯ

Сообщество микроорганизмов действует как метаболическая целостность, объединяя организмы с разными трофическими функциями. Эти функции имеют первостепенное значение в отношениях организма со средой и соответственно могут рассматриваться как благоприобретенные. Эубактерии представляют достаточно многочисленную и разнообразную группу, чтобы на ней проверить вопрос о том, происходили ли бактерии сообщества, населяющего одно местообитание, от общих предков путем приобретения экофизиологически значимых свойств или же сообщество образовалось иным путем. Очевидно, что этот вопрос нельзя проверить на малочисленных группах экстремофилов, например, гипертермофильных или же экстремально галофильных архебактериях.

Рассматривая совокупность обитателей одной экологической ниши, можно сделать заключение, что они часто близки между собой и большое число их представлено организмами, филогенетически родственными, например, органотрофные анаэробные копипотрофы в значительной степени представлены клостридиями

и родственными им организмами. Другими примерами могут служить энтеробактерии или сульфатредукторы, составляющие филогенетически обособленные группы, хотя способность к сульфатредукции, например, распространена и среди других филогенетических линий. В этом отношении конкуренцию, основанную на аутоэкологических характеристиках, можно полагать движущей силой возникновения биоразнообразия.

Если же рассматривать трофические связи между функциональными группами в сообществе, то оказывается, что *тесно взаимосвязанные, а иногда и прямо взаимосвязанные группировки, как правило, представлены филогенетически удаленными друг от друга организмами* (Г. А. Заварзин). Например, в анаэробном сообществе гидролитики представлены кластридиями, а взаимодействующие с ними диссипотрофы — спирохетами; взаимодействующие с грамположительными молочнокислыми бактериями сульфатредукторы — протеобактерии; взаимодействующие с синтрофными зубактериями метаногены — архебактерии. В свою очередь, метанотрофы, полностью зависящие от продукции метана архебактериями, относятся к протеобактериям. Аэробных целлюлозолитиков цитофаг сопровождают простекобактерии, относящиеся к протеобактериям. Эта обнаруженная нами тенденция указывает на совершенно иной путь формирования сообщества, чем дивергенция внутри одной фундаментальной экологической ниши. Сообщество собирается из разнородных организмов, которые оказываются вместе в одном местообитании. Сообщество конструируется из генетически разнородного материала, который функционально взаимодополняет друг друга по требованиям формирования устойчивой системы. Взаимодействие отражает тенденцию, прямо противоположную дивергенции: наиболее тесно взаимодействующими оказываются неродственные организмы. Сообщество бактерий, располагающееся на первых ступенях эволюции и не имеющее предшественников, изначально требует функционального разнообразия.

Вид организмов не может длительное время существовать вне сообщества, потому что приведет к материальному дисбалансу в месте своего обитания. Это относится даже к фотоавтотрофам, рост которых будет лимитирован биогенами без возврата их в

цикл путем деструкции. Тезис о том, что вид не может существовать в биосфере вне сообщества, был выдвинут В. И. Вернадским в начале 1930-х гг., исходя из геологически значимых масштабов времени. Это положение сразу же приводит к иной логической системе взглядов, чем при построении снизу вверх от индивидуальных изменений отдельной особи, с прослеживанием судьбы лишь нескольких поколений. Понятно, почему тезис Вернадского не встретил поддержки среди биологов-дарвинистов.

В качестве контрагумента сейчас приводят пример использующих эндогенные эманации из глубин Земли обитателей подземной биосферы, которые, по-видимому, были способны развиваться с самого древнего времени до настоящего. Их активность не уравновешена циклическим биологическим механизмом, хотя в роли такого завершающего цикл механизма для метана или сероводорода как конечных продуктов подземных гидрогенотрофных термофилов могли бы служить фотохимические процессы, заменявшие действующий сейчас окислительный биологический фильтр. Случай этот представляется количественно незначительным исключением, далеким от ствола эволюции живого мира.

При рассмотрении прокариотной клетки-организма мы установили, что она работает как система, составленная из разнородных частей-блоков. Нечто сходное обнаруживается и при анализе сообщества: существование его зависит от согласованной работы разнородных компонентов. Отсюда и сообщество можно рассматривать как некое единство. Существенным отличием сообщества бактерий как функционирующей целостности от клетки служит способ приспособления к изменяющимся условиям существования. Механизм адаптации клетки зависит от мобилизации имеющейся генетической информации и в меньшей степени от латерального переноса генов, например, факторов устойчивости. Адаптивная динамика сообщества основана на изменении количественного соотношения входящих в него видов и, при рассмотрении крупномасштабных изменений, на вербовке извне новых членов, соответствующих условиям и требованиям системы. Для сообщества бактерий, где из-за распространения с аэрозолями не существует ограничений географической изоляции, такая вербовка облегчена по сравнению с сообществами высших организмов.

Итак, во «Введении в природоведческую микробиологию» мы рассмотрели пути формирования микробного сообщества как действующей операционной единицы в ландшафте. Для построения интеграционного подхода пришлось начать с бактериальной клетки-организма как универсальной системы взаимодействующих компонент, значение которых может быть понято лишь исходя из организма как целостности. В результате мы приходим к важному выводу об организменном уровне явлений жизни и невозможности подмены организма его частными подсистемами.

Далее было рассмотрено то множество различных микроорганизмов, которое составляет специальную область знания микробиологов и позволяет решать задачи, недоступные для других специальностей. Специализация микроорганизмов прежде всего по химическим функциям позволяет построить систему взаимодействий между разными организмами. Чтобы уверенно оперировать понятиями в этой системе, необходимо ориентироваться в разнообразии микробного мира. К счастью, для большинства задач бывает достаточно знать свойства представителей физиологических типов. Этих эталонов не так много — несколько десятков достаточно для общей ориентировки. Вместе с тем ясно, что проблема биоразнообразия микроорганизмов находится сейчас в состоянии кризиса из-за разрыва между функциональным подходом и молекулярно-биологической идентификацией по филогении организмов в природе.

Наконец, суть подхода к природоведческой микробиологии составляет анализ трофических связей в микробном сообществе как функциональной целостности. Благодаря специфичности микроорганизмов, в крайних случаях узко специализированных монотрофов, можно построить схемы трофических связей, основанные на продукт-субстратных взаимодействиях между видами. Этот качественный аспект химических взаимодействий представляется главенствующим в конструировании сообщества. Следующий аспект связан с физической стороной организации сообщества в такую структуру, где физические потоки химических веществ достигают потребителя наилучшим образом. Это ведет к формированию «псевдоткани» из разнородных видов организмов. Следующий уровень занимают регуляторные взаимодей-

ствия, обусловленные прежде всего концентрацией метаболитов. Их регуляторное действие может быть обусловлено прямыми термодинамическими причинами, как в случае с концентрацией  $H_2$ . Практически не рассмотрены «сигнальные» пути в сообществе, например, под воздействием физиологически активных веществ. Причина состоит в том, что сигнальные пути в большинстве видовоспецифичны, как например, для антибиотиков. Но главное состоит в том, что они вступают в действие, когда выполнены перечисленные выше трофические требования.

Следующим этапом, уже собственно природоведческой микробиологии, а не введения в нее, представляется взаимодействие микробного сообщества в составе ландшафта с биосферой и геосферой. Эта часть поневоле распадается на рассмотрение «по стихиям»: атмосфере, химический состав которой контролируется микроорганизмами; гидросфере, включающей океан, прибрежные моря, континентальные водоемы; литосфере с почвой и корой выветривания как тонком, наиболее активном слое.