

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное агентство по образованию
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова

Н.В. Шеховцова

**ЭКОЛОГИЯ ВОДНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Учебное пособие

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета
для студентов, обучающихся по специальности Биология*

Ярославль 2008

УДК 579.26
ББК Е48я73
Ш 54

Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2008 года

Рецензенты:

кафедра микробиологии с иммунологией и вирусологией ЯГМА;
д-р биол. наук, проф. МГУ Н.В. Верховцева

Шеховцова, Н.В. Экология водных микроорганизмов: учебное
У 91 пособие / Н.В. Шеховцова; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль: ЯрГУ,
2008. – 132 с.
ISBN 978-5-8397-0604-0

Излагается теоретический материал спецкурса, который читается автором около 20 лет. Содержится исторический обзор развития водной микробиологии, в котором обсуждены основные направления и современные технологии изучения водных микроорганизмов. Классические представления о роли бактерий в функционировании водных экосистем сочетаются с новыми сведениями о филогенетической принадлежности и систематике водных прокариот. Приведены неизвестные ранее примеры ассоциаций прокариот друг с другом и с водными растениями и животными. Особо рассматривается роль бактерий в переносе вещества и энергии в водоемах, а также в их продуктивности и самоочищении водной среды.

Предназначено для студентов, изучающих спецкурс “Экология водных микроорганизмов” (блок ДС) и обучающихся по специальности 020201 Биология по очной и заочной формам обучения. Рекомендуется студентам-экологам при изучении дисциплины “Экология организмов”, а также специалистам в области экологии и гидробиологии.

Табл. 4. Рис. 21. Библиогр.: 24 назв.

УДК 579.26
ББК Е48я73

На обложке: *Methanosarcina* sp. штамм Pr1 (фото любезно предоставлено канд. биол. наук С.Н. Паршиной)

ISBN 978-5-8397-0604-0

© Ярославский государственный
университет, 2008

ВВЕДЕНИЕ

Экология водных микроорганизмов изучает взаимодействие микроорганизмов с водной средой и населяющими ее другими организмами. Соответствующий раздел общей микробиологии по традиции называют кратко – водная микробиология. Однако водная микробиология, развиваясь как часть гидробиологических исследований, особое внимание уделяла роли микроорганизмов в процессах продукции и деструкции органического вещества в водоемах, а также участию микроорганизмов в круговоротах биогенных элементов и металлов с переменной валентностью. Такой экосистемный подход предусматривал, прежде всего, валовые оценки массы и активности микроорганизмов. Сейчас, когда оказалось, что многие процессы в биосфере осуществляются не отдельными видами микробов, а их ассоциациями, возникла необходимость обратиться к более детальному изучению таксономического, метаболического разнообразия микроорганизмов в природе, условиям формирования их ассоциаций и сообществ.

Вместе с тем изучение водных микроорганизмов все больше распространяется на такие искусственные экосистемы (очистные сооружения, скважины), в которых циклы элементов могут быть и незамкнутыми, что также расширяет предмет водной микробиологии как гидробиологической науки. В связи с вышеизложенным спецкурс по водной микробиологии получил более общее название “Экология водных микроорганизмов”. Теоретической предпосылкой для освоения данного спецкурса являются знания по общепрофессиональным дисциплинам “Микробиология и вирусология”, “Экология”, специальным – “Гидробиология” и “Экологическая альгология”, курса по выбору студента “Санитарная микробиология”.

Водные микроорганизмы играют ключевую роль в жизни водоемов, осуществляя замкнутые циклы основных биогенных элементов (С, N, S, P, Fe и др.). В состав водных микробоценозов входят продуценты (микроводоросли, цианобактерии, фото- и

хемоавтотрофные бактерии), деструкторы (большинство бактерий и грибы), а также регуляторы численности микроорганизмов: консументы (простейшие, присутствующие в водных экосистемах в разных пропорциях) и бактериофаги. Однако специальным объектом водной микробиологии являются прокариоты, отличные от цианобактерий. Последние по метаболизму и выполняемым функциям в водных экосистемах объединяются с зелеными водорослями и изучаются альгологией.

Вода является идеальной средой обитания для микроорганизмов. Она защищает их от высыхания и от экстремальных перепадов температуры: в водоемах они не превышают 20–30°C, в то время как на поверхности суши могут достигать 80°C (от –20 до +60°C). Вода – универсальный растворитель для органических и неорганических веществ. Водная среда является гомогенной по сравнению с почвой. Однако вода на Земле распределена неравномерно и имеет весьма разное качество (см. табл. 1). Кроме того, увеличивается количество водных экосистем техногенного происхождения: водохранилища, сооружения биохимической очистки сточных вод (аэротенки), различные скважины и т.п.

Таблица 1

Распределение воды на Земле [18]

Запас воды	Объем, 10 ³ км ³	% массы общей во- ды	% массы пресной воды	Время оборо- та, годы
Всего	1 458 703	100	–	–
Океаны	1 370 373	94	–	3 000
Глубокие грунтовые воды	60 000	4	–	5 000
Общая доступная пре- сная вода	28 329	1,94	100	–
Полярный лед	24 000	1,64	84,5	8 000
Активные грунтовые воды	4 000	0,27	14	330
Пресноводные озера	125	0,0086	0,4	1-100
Соленые озера	104	0,0071	0,36	10-1000
Почвенная влага	85	0,0058	0,3	1
Водяной пар в атмосфе- ре	14	0,00096	0,05	0,027 (10 сут)
Реки	1,2	0,00008	0,004	0,031 (11 сут)

Изучение экологии водных микроорганизмов связано с поисками ответов на фундаментальные вопросы современного естествознания.

- К каким группам относятся водные микроорганизмы?
- Насколько их много?
- Что они делают?
- Каким образом выживают в водной среде?
- Какие факторы контролируют их активность и численность?
- Какую роль они играют в глобальных циклах углерода, следовых газов и биогенов?

Ответы на эти вопросы следует искать на глобальном, региональном и местном уровнях, а также на уровне микробного сообщества, организменном, физиологическом и молекулярном.

1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ВОДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ И МЕТОДЫ

1.1. Формирование водной микробиологии как науки

Вода как объект исследования микроорганизмов легко поддается прямому микроскопическому наблюдению в отличие от почвы. Микроскопическое исследование водных организмов началось в середине XIX века, прежде всего Ф. Коном, до начала развития методов культивирования бактерий. Первыми в поле зрения микроскопистов попали крупные нитчатые бактерии, такие как *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Crenothrix*, *Sphaerotilus*, *Gallionella*, *Leptothrix*, *Peloploca*. Они легко идентифицируются под микроскопом по характерной морфологии, как и цианобактерии. Они дают массовые разрастания и служат индикаторными формами для характеристики состояния водоема. Однако многие из них до сих пор с трудом поддаются лабораторному культивированию. Таким образом, водные микроорганизмы дали первые доказательства того, что между организмами, вырастающими на питательных средах и теми, что живут в водоеме, есть большая разница.

На **первом этапе** развития водной микробиологии, в восьмидесятых годах XIX в., в связи с распространением эпидемий “водных инфекций”, прежде всего холеры, стали производить посеvy природной воды по Р. Коху, на богатые питательные среды МПЖ и МПА. Выросшие колонии подсчитывали и микроскопировали. Этими методами пользовались М. Серте (1884) и Б. Фишер (1889) при исследовании морей и океанов, а также А. Клейбер (1894), В.В. Воронин (1897) и А. Пфеннигер (1902) при изучении озер.

Основными результатами этих исследований являются представления о повсеместном, но неравномерном распространении

сапротрофов в водной среде, их приуроченности к местам накопления или поступления органических веществ (ОВ) в водоемы. Кроме того, были открыты типично водные гетеротрофные бактерии, которые ранее из других местообитаний на тех же питательных средах не выделялись. Среди них особое положение сразу заняли истинно морские виды, для выращивания которых необходимо внести в питательную среду достаточно большое количество поваренной соли.

Вместе с тем расчеты геологов позволяли предполагать биологическую природу некоторых уже известных в XIX веке геологических процессов. В начале XX в. с помощью метода накопительных культур С.Н. Виноградского, которые получали на селективных питательных средах, было подтверждено участие микроорганизмов в метановом брожении (Н. Шонген – В.Л. Омелянский) и окислении метана (Н. Шонген – Г. Касерер). Сам С.Н. Виноградский обнаружил способность к хемосинтезу у водных сероокисляющих бактерий р. *Beggiatoa*. Таким образом были открыты хемолитотрофные микроорганизмы, которые участвуют в циклах различных элементов и биогеохимических процессах образования горючих газов, сероводорода, нитратов, руд в пресных и морских водоемах.

Формирование водной микробиологии как отдельного научного направления в нашей стране связано с именами В.Л. Омелянского, Г.А. Надсона и Б.Л. Исаченко.

Василий Леонидович Омелянский (1867 – 1928) – основатель пресноводной микробиологии, исследовал озера Белое, Коломенское Калининской обл. Он изучал роль целлюлозоразлагающих, азотфиксирующих, нитрифицирующих микроорганизмов в круговоротах азота и углерода. Первым начал изучать микробиологическое разложение целлюлозы.

Георгий Адамович Надсон (1867 – 1939) – академик, создатель крупнейшей советской школы в области общей биологии. Он также занимался вопросами экологии водных микроорганизмов. Обобщая результаты изучения ила Славянских минеральных озер, в монографии “Микроорганизмы как геологические деятели” (1903) он пришел к выводу, что “черный” ил (лечебная грязь) есть продукт жизнедеятельности бактерий, участвующих в кру-

говоротах серы, железа и кальция. Г.А. Надсон установил, что сверлящие водоросли выделяют щавелевую кислоту, которая растворяет известковый субстрат, тем самым участвуя в круговороте кальция. Позднее он изучал микроорганизмы Ладожского оз., Каспийского и Белого морей.

Борис Лаврентьевич Исаченко (1871 – 1948) – основатель двух направлений: морской и геологической микробиологии, изучал роль различных групп микроорганизмов в природных процессах круговорота веществ в Мировом океане и месторождениях полезных ископаемых. В своей монографии “Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана” (1914) он проанализировал методические трудности изучения микроорганизмов непосредственно в водоемах. Основными среди них являлись нестерильность отбора проб, неопределенная длительность хранения проб перед микробиологическим анализом в нестандартных условиях, использование богатых питательных сред, которые не соответствуют условиям естественной водной среды [5, 15].

1.2. Советский период

Второй этап развития водной микробиологии (1925 – 1950 гг.) сопровождался организацией сети стационарных научно-исследовательских микробиологических лабораторий непосредственно на берегах различных водоемов в СССР, США, Франции, Германии, Великобритании и Японии. Благодаря этому основной акцент в исследованиях ставился на изучении водных микроорганизмов непосредственно в их естественной среде обитания, появились приборы для стерильного отбора проб воды и ила.

Для изучения численности бактериопланктона за основу был взят метод С.Н. Виноградского для определения общей численности микроорганизмов в почве. Н.Г. Холодный (1928) и А.С. Разумов (1932) модифицировали метод прямого счета бактерий под микроскопом с помощью предварительного концентрирования водных бактерий путем фильтрования пробы через стерильные мембранные фильтры. Далее производили подсчет микробных клеток на стеклах (по Холодному) или на тех же фильтрах (по Разумову). Таким образом, было установлено, что общая численность водных бактерий существенно превосходит количество,

определенное ранее методами посева, и колеблется от 10^5 до 10^6 кл/мл. Также было подтверждено неравномерное распределение бактерий водной толщи по вертикали: максимумы численности наблюдали в зонах верхней или нижней границ термоклина и в донных отложениях.

С целью наблюдения за микроорганизмами в естественных условиях были разработаны методы прямой микроскопии: стеклообрастания Н.Г. Холодного и капиллярной микроскопии Б.В. Перфильева. В результате изучения формирования биопленок на стеклах обрастания и микробных сообществ в капиллярах

– впервые показано существование множества некультивируемых микроорганизмов,

– изолированы новые виды водных бактерий, в частности, *Metallogenium personatum*, образующий железо-марганцевые конкреции и хищная бактерия *Bdellovibrio bacteriovorus*;

– установлена разница в размерах природных микроорганизмов и выделяемых на лабораторных средах;

– определены микроскопические размеры местообитаний конкретных видов микроорганизмов непосредственно в водоемах;

– выявлено, что образование биопленок – естественный способ существования водных бактерий в природной среде.

Поиск приведения в соответствие условий выделения микроорганизмов с условиями их существования в водоемах привел к предложению К. Зобелла и К. Гранта использовать разбавленные питательные среды с содержанием растворенного органического вещества (РОВ) в количестве не более 10 мг/л [2].

Интенсивность микробиологических процессов в водоемах в основном оценивали по численности соответствующей физиологической группы микроорганизмов, определенной с помощью селективной питательной среды. В 1935 г. Г.Г. Винберг предложил метод изолированных проб для определения скорости продукции и деструкции органического вещества в эвтрофных водоемах, который позже даст начало целому ряду методов [4, 15].

Третий, послевоенный, этап (1950 – 1990) развития водной микробиологии был связан с необходимостью оценки ресурсов для восстановления разрушенного хозяйства страны. Решению

этих задач в области водной микробиологии была посвящена научная деятельность **С.И. Кузнецова**. Под его руководством исследования были организованы в трех направлениях, что привело к образованию **советской школы водных микробиологов**.

1.3. Основные направления и методы водной микробиологии

Первое направление исследований было связано с **оценкой общей численности и изучением морфологического и физиологического разнообразия водных бактерий**. Прогресс в этой области был определен усовершенствованием методов прямого микрокопирования. С помощью флюоресцентных красителей А.Г. Родина повысила точность определения общей численности бактерий в водной среде.

Представления о биоразнообразии водных микроорганизмов весьма расширились благодаря применению электронной микроскопии. В результате в пробах воды и ила были открыты

- фильтрующиеся и ультрамикроскопические (менее 0,2 мкм) формы;
- бактерии нетрадиционной морфологии: стебельковые, простековые, звездчатые, треугольные и т.п.;
- свободноживущие микоплазмы.

Развитие идеи применения разбавленных питательных сред для выделения водных микроорганизмов нашло свое воплощение в том, что численность КОЕ, полученная В.И. Романенко при посеве водной пробы на агаризованную природную воду, приблизилась к общей численности бактерий, определенной методом прямого счета. Таким образом был доказан олиготрофный характер бактериопланктона в Рыбинском водохранилище.

Применение разбавленных селективных сред позволило Г.А. Дубининой выделить в чистые культуры новые виды железобактерий рр. *Leptothrix*, *Ochrobium* и бесцветных серобактерий рр. *Beggiatoa*, *Macromonas*, а также отнести виды р. *Metallogenium* к свободноживущим микоплазмам.

В.М. Горленко, изучая аноксигенных фототрофных бактерий, также пересмотрел их систематику и таксономию. Г.И. Каравайко

создал коллекцию хемолитотрофных бактерий, окисляющих Fe^{2+} , S^0 и сульфидные минералы.

Изучение роли микроорганизмов в круговоротах веществ и элементов привело к выделению в чистые культуры новых видов, осуществляющих неизвестные ранее биогеохимические функции. Так, Е.В. Лебедева выделила нитритокисляющих бактерий *Nitrospira moscoviensis* из труб горячего водоснабжения. Н.Н. Ляликова открыла бактерию *Stibiobacter senarmontii*, окисляющую трехвалентную сурьму (Sb_2O_3). В.И. Романенко и С.И. Кузнецов выделили хромвосстанавливающих бактерий. Н.Н.Ляликова и Н.А. Юркова обнаружили микроорганизмов, способных восстанавливать ванадий или технеций, окислять молибден, а также хемолитотрофных ацетогенных бактерий *Acetoanaerobicum romashkovii* [4].

Большой прогресс был достигнут в области оценки интенсивности микробиологических процессов в водоемах с помощью радиоактивных изотопов. В работах **биогеохимического** направления стали применять две группы методов: 1) **прямые методы** определения прироста продуктов жизнедеятельности специфических групп микроорганизмов в краткосрочных экспериментах с **изолированными пробами** воды или ила с помощью газовой хроматографии или радиоактивно меченных соответствующих субстратов, 2) **анализ соотношения стабильных изотопов биогенных элементов** (углерод, кислород, водород, сера, азот) в субстратах и продуктах жизнедеятельности микроорганизмов, а также в образцах воды, газов, органического вещества и в отдельных минералах, отобранных из естественных мест их обитания.

Первая группа методов была модификацией кислородного метода Г.Г. Винберга (1934), предложенного им для измерения скоростей продукции и деструкции в изолированных пробах воды и ила эвтрофных и мезотрофных озер и водохранилищ (1935). В 1951 г. Стиман-Нильсен сумел во много раз повысить чувствительность скляночного метода определения фотосинтеза, предложив добавлять в пробы изучаемой воды меченную по углероду углекислоту в виде $Na_2^{14}CO_3$. Зная исходное содержание растворенного минерального углерода в анализируемой пробе и величину радиоактивности углерода, внесенного в пробу, а затем об-

наруженного в биомассе, можно легко рассчитать весовое количество углерода, включенного в планктонные организмы. В 1953 г. С.И. Кузнецов попытался получить первые сравнительные результаты величин фото- и хемосинтеза в водной толще оз. Байкал, добавляя меченую углекислоту, как в светлые, так и в темные склянки.

Начиная с 1956 г. в лаборатории М.В. Иванова впервые в мировой практике экологических исследований был разработан пакет методов, предназначенных для определения активности специфических групп микроорганизмов с использованием краткосрочной инкубации проб озерной, пластовой и морской воды, а также донных осадков с добавлением радиоактивно меченных соединений углерода и серы. Эти методы особенно широко используются зарубежными исследователями. Они позволяют определять в условиях, близких к *in situ*, активность сульфатредуцирующих бактерий, хемо- и фотосинтезирующих серных бактерий, а также метаногенных и метанотрофных бактерий.

Вторая группа биогеохимических методов основана на избирательном использовании микроорганизмами легких изотопов молекул, в результате чего в продуктах жизнедеятельности накапливаются легкие изотопы, а в остаточном субстрате – тяжелые (рис. 1). Максимальные величины изотопного эффекта в биологических процессах достигают величины 50–70‰, а чувствительность современных изотопных масс-спектрометров не меньше $\pm 0,2\%$, поэтому изотопные эффекты величиной даже в первые промилле измеряются достаточно надежно (рис. 2).

Коренной сдвиг произошел в результате применения радиоактивных стабильных изотопов углерода, серы и азота. Было положено начало количественному изучению таких биогеохимических процессов в природе, как образование и окисление сероводорода, фиксация азота, потребление органического вещества, фосфора и других биогенных элементов, образование метана. Были оценены скорости этих процессов, определена их точная локализация в водоеме.

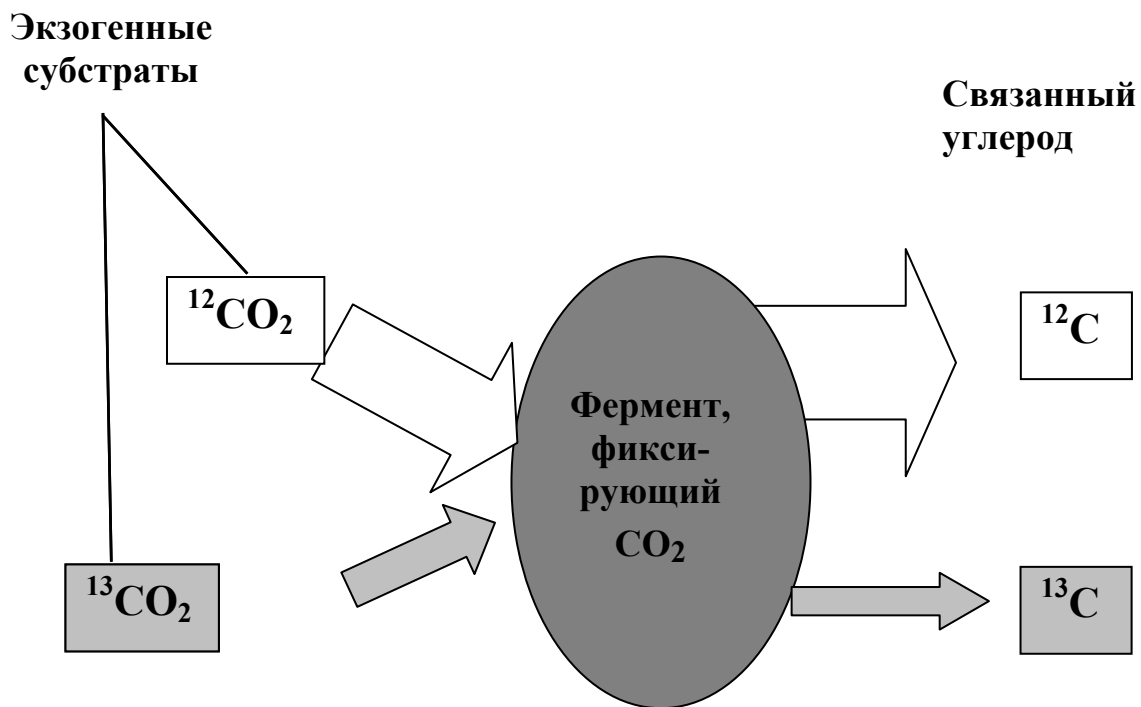


Рис. 1. Механизм изотопного фракционирования на примере углерода [23]

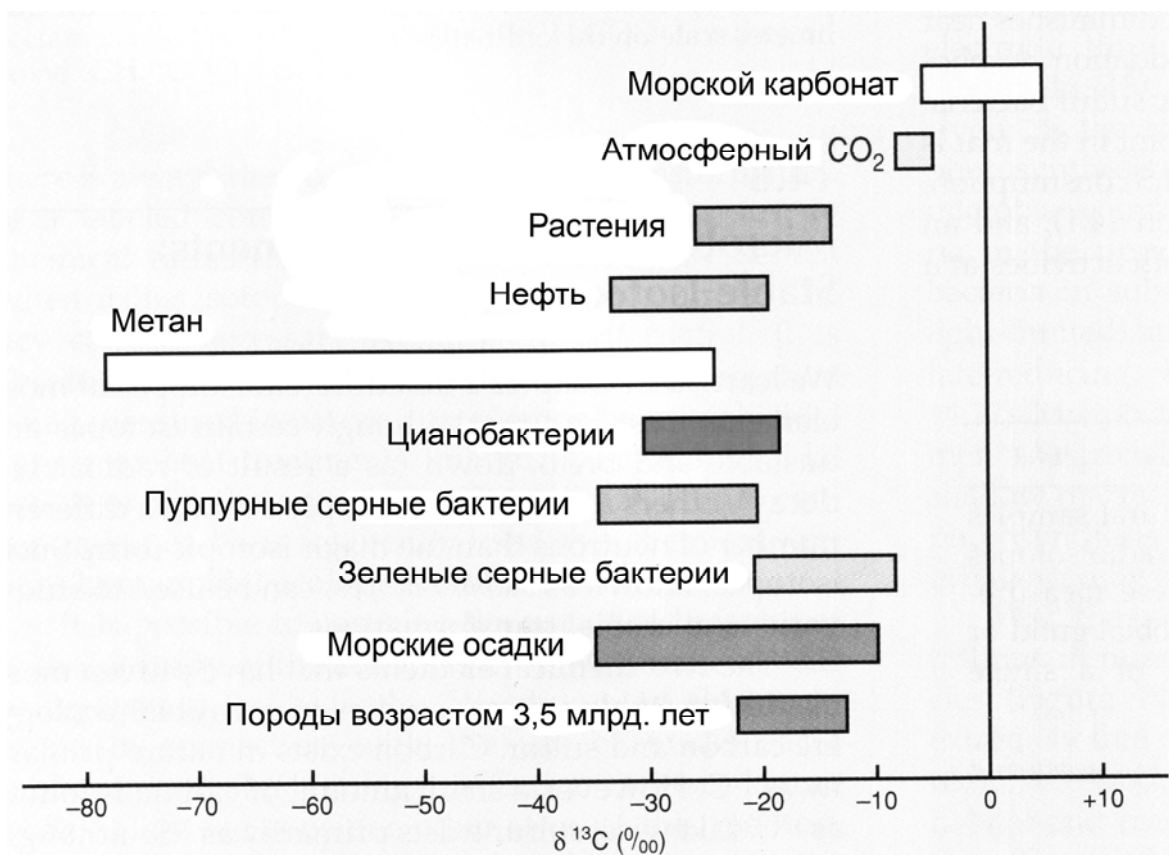


Рис. 2. Изотопный состав различных веществ [23]

Развитие третьего направления водной микробиологии, **продукционно-трофологического**, также связано с применением изотопных методов в микробиологии. Впервые в 1954 г. А.Г. Родина и А.С. Трошин применили P^{32} для демонстрации участия бактерий в питании некоторых пресноводных животных.

После того, как под руководством Г.Г. Винберга были разработаны методы определения продукции животных с использованием ^{14}C , стало возможным восстанавливать картину пищевой сети в водоемах. Так, Ю.И. Сорокин оценил продукцию и перенос энергии в оз. Дальнем (Камчатка) и Рыбинском водохранилище. Кроме того, Ю.И. Сорокин (1970) собрал уникальный материал по первичной продукции океанского фитопланктона, оценил масштабы бактериальной (темновой) фиксации CO_2 и роль микроорганизмов в пищевых цепях в океане. Это имеет фундаментальное значение для математического моделирования функционирования водных сообществ, что, может быть, даст ключ к управлению продуктивностью рыбохозяйственных водоемов и самоочищением водной среды.

Таким образом, с помощью изотопных методов был осуществлен переход к изучению микробиологических процессов в водоемах на глобальном уровне. Появились новые представления о функционировании водных систем. В частности, в трофической сети была обнаружена так называемая “микробная петля”, которая связана с ростом бактериопланктона на растворимых органических продуктах фотосинтеза некоторых водорослей. Выяснилось, что продуктивность бактериального синтеза 35 мкг С/л/сут соизмерима с продукцией фотосинтеза в водной среде.

Следует отметить, что мировой приоритет советских ученых в области водной микробиологии во второй половине XX века связан с их активным участием в реализации Международной биологической программы (МБП), выполнением которой руководил Г.Г. Винберг (1967). Политические изменения в России в конце XX века привели к существенной зависимости развития отечественной науки от международного сотрудничества, поэтому **современный этап изучения экологии водных микроорганизмов** (с 1990-х гг. по настоящее время) связан с технологиями,

которые впервые были внедрены в практику микробиологических исследований за рубежом [19].

1.4. Современные методы изучения экологии водных микроорганизмов

Пять технологий революционизировали понимание роли микроорганизмов в окружающей среде: иммунология и иммуноцитохимия, проточная цитометрия, анализ изображений, анализ нуклеиновых кислот, трансмиссионная электронная микроскопия. Все эти методы довольно давно появились в медицинской микробиологии, но в экологии микробов стали применяться после того, как были усовершенствованы с учетом особенностей водной среды. Однако все эти методы имеют свои ограничения.

Иммунологический подход, возможно, лучший для определения специфических микробных серотипов. Однако нужно, чтобы прежде серотип имелся в культуре. Проточная цитометрия идеальна для определения численности самофлюоресцирующих популяций, но не очень достоверна для “черных ящиков”, поскольку ее результаты не согласуются с другими методами. 16S филогенетический анализ революционизировал наше понимание многообразия микроорганизмов в водной среде, но дает только филогенетические знания. Анализ изображений, возможно, лучший для подсчета и оценки биомассы, но ничего не говорит о скоростях процессов. Технология экспрессии генов потенциально может быть полезной в оценке скоростей, но ограничивается лишь несколькими консервативными локусами. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) может использоваться для регистрации генов, имеющих очень низкую частоту встречаемости, но оценка исходного обилия этого гена весьма затруднена. Таким образом, каждая из этих технологий имеет преимущество лишь при решении очень специальных задач.

Тем не менее, прогресс в изучении экологии водных микроорганизмов связан, прежде всего, с применением методов молекулярного анализа. Одним из последних примеров является открытие природы анаэробного окисления метана. Так, при изучении глубоководных морских экосистем оказалось, что значи-

тельная часть метана потребляется еще в анаэробной зоне, не доходя до слоев воды, обогащенной кислородом. Появилась гипотеза об анаэробном окислении метана. Один из гипотетических сценариев предполагал сопряженность процессов окисления метана с восстановлением сульфатов. Из природных образцов была выделена общая ДНК. С помощью ПЦР-технологии и сиквенс-анализа 16S рРНК были обнаружены флотипы ранее неизвестных архей – метаногенов и флотипы бактерий – сульфатредукторов. Далее были изготовлены специфические рРНК-зонды и с помощью FISH-технологии в природных образцах были обнаружены микроконсорциумы, состоящие из метаногенов и сульфатредукторов. Таким образом, было получено наиболее строгое доказательство того, что анаэробное окисление метана происходит как процесс, обратный метаногенезу, и сопряжен с сульфатредукцией [16].

Будущий прогресс в области экологии микроорганизмов, безусловно, связан с молекулярно-экологическими исследованиями, применение которых в комплексе с другими методами обещает новые открытия.

2. КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ВОДОЕМОВ

2.1. Аллохтонные и автохтонные микроорганизмы

По пути попадания микроорганизмов в водоем различают две составляющие в водном микробоценозе: автохтонную и аллохтонную.

Аллохтонные бактерии – "привнесенные извне", попадают в водоем с береговым смывом, грунтовыми и сточными водами, с помощью пыльных бурь и т.п. Как правило, они не приспособлены к экологическим условиям данного водоема или не способны, по крайней мере, к длительному существованию в нем. Классический пример – кефир, выплеснутый за борт лодки. Используемые для его закваски бактерии *Streptococcus lactis* и грибки *Torulopsis kefirii* могут некоторое время обнаруживаться в пробах воды, но затем бесследно исчезнут. К аллохтонным относятся патогенные микроорганизмы, которые, как правило, в воде не размножаются, но могут сохранять свою жизнеспособность довольно долгое время. Через воду может происходить распространение целого ряда кишечных инфекций: брюшного тифа, паратифа, дизентерии – и некишечных: инфекционной желтухи, бруцеллеза, туляремии, туберкулеза и других. При изучении патогенных микроорганизмов важно установить источники их попадания и время сохранения ими жизнеспособности в водоеме [2].

Другой аллохтонной группой являются типично почвенные микроорганизмы. Так, Б.Л. Исаченко по месту нахождения на дне Карского моря спор *Bacillus mycoides* смог определить районы проникновения в океан пресных вод Енисея и Оби.

Автохтонные микроорганизмы составляют основную часть микробиоты водоемов. Они постоянно развиваются в значительном количестве или испытывают вспышки сезонного развития, являются существенным компонентом трофической цепи и определяют скорости круговоротов углерода, азота, серы и железа.

2.2. Многообразие водных прокариот

Ранее, когда идентификацию прокариот проводили только по фенотипическим признакам, было установлено их необычайное систематическое, физиологическое и метаболическое разнообразие. Сформировалось представление о том, что четкой границы между водными и почвенными видами не существует [2]. К типично водным бесспорно относили облигатно морских бактерий, которые требовали для роста определенного содержания ионов натрия в питательной среде, и люминесцирующих. Тогда же было установлено, что прокариоты, выделенные из водных экосистем, способны реализовывать все известные типы метаболизма (табл. 2).

В настоящее время, когда появилась возможность построения филогенетической систематики прокариот на основании первичной последовательности нуклеотидов в гене 16S рРНК, сложилось мнение о том, что водная среда способствовала формированию у бактерий клеточной стенки грамотрицательного типа. На филогенетическом древе бактерий многие ветви представлены водными микроорганизмами (рис. 3). Некоторые из них, в частности водородные, термотоги, нитчатые фотогетеротрофные зеленые, представлены экстремальными термофилами, которых считают наиболее древними.

Особый интерес с точки зрения молекулярной эволюции и клеточной биологии представляют планктомицеты, выделенные в самостоятельный филум Planctomycetes (рис. 4). Это почкующиеся бактерии, имеющие кратерообразные структуры на поверхности клетки, способные к образованию розеток и обладающие необычным для этой группы скользящим движением. У них нет пептидогликана как у хламидий и микоплазм, но имеются ядерные тела, окруженные мембраной, что сближает их с эукариотами. Планктомицеты обладают фототаксисом, необычным для гетеротрофов. Возможно, это связано с их приуроченностью к цианобактериальным матам, из которых они были выделены. Использование N-ацетилглюкозамина предполагает их возможную роль в деградации хитина в водных экосистемах. Культивируемые планктомицеты выделены из пресной воды, гиперсоленых лагун и термальных источников. В море установлены клоны ДНК некультивируемых

Таблица 2

Классификация типов обмена у микроорганизмов [6]

Источник энергии	Донор электронов	Акцептор электронов	Источник углерода	Тип обмена	Группы микроорганизмов
Свет	Вода	–	CO ₂	Фотолитоавтотрофный	Цианобактерии
	Органический субстрат	–		Фотоорганавтотрофный	Некоторые пурпурные бактерии
	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂	–	Органический субстрат	Фотолитогетеротрофный	Некоторые цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий
	Органический субстрат	–		Фотоорганогетеротрофный	Все несерные пурпурные бактерии, некоторые пурпурные и зеленые серобактерии, галоархеи
Окислительно-восстановительные реакции	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂	O ₂	CO ₂	Хемолитоаэроавтотрофный	Нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии
	H ₂	CO ₂		Хемолитоанаэроавтотрофный	Метанобразующие археи
	Формиат	O ₂		Хемоорганонаэроавтотрофный	<i>Bacterium ferrooxidans</i>
	Органический субстрат	Органический субстрат		Хемоорганонаэрогетеротрофный	Метанобразующие бактерии
	Органический субстрат	O ₂	Органический субстрат	Хемолитоаэрогетеротрофный	Железобактерии
	H ₂	SO ₄ ²⁻		Хемолитоанаэрогетеротрофный	Сульфатвосстанавливающие прокариоты
	Органический субстрат	O ₂		Хемоорганонаэрогетеротрофный	Большинство бактерий
	Органический субстрат	Органический субстрат		Хемоорганонаэрогетеротрофный	Бродильщики

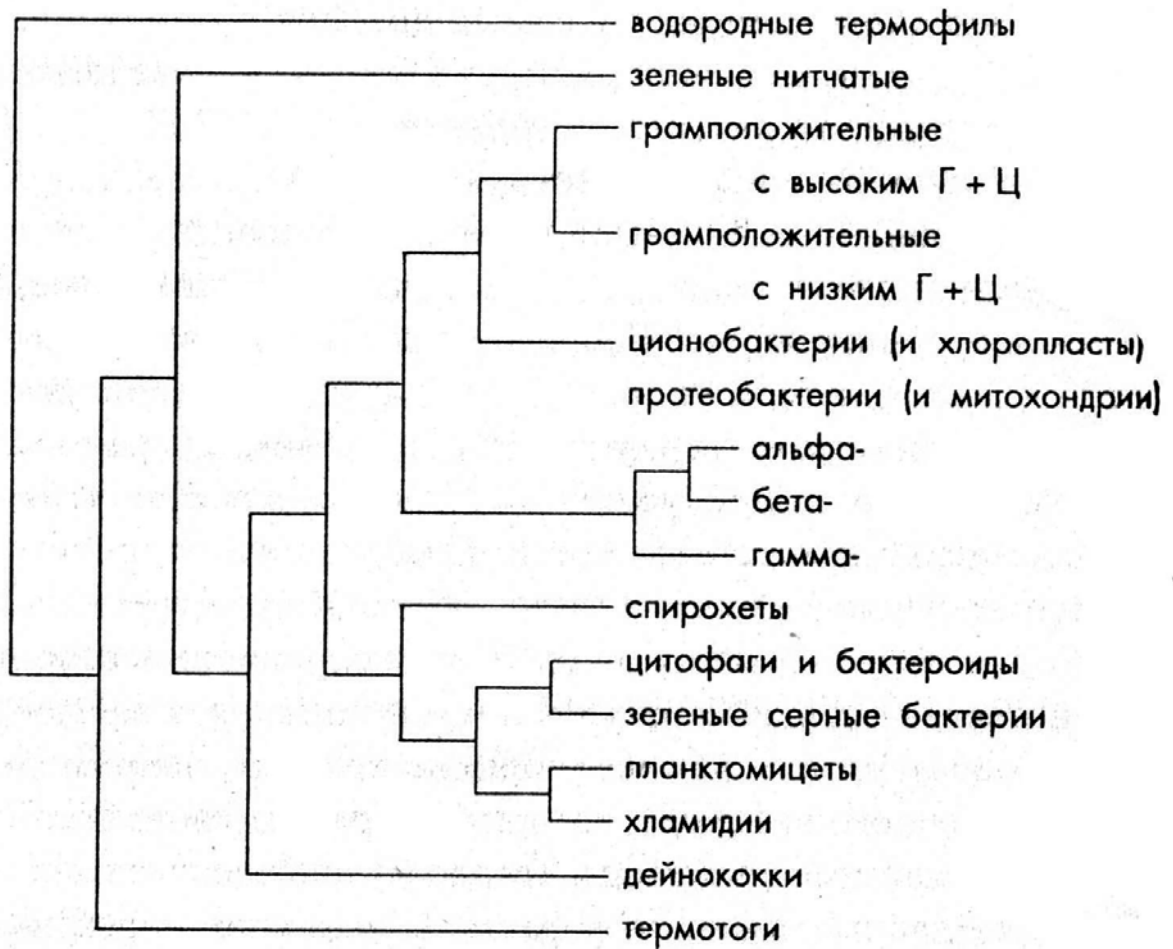


Рис. 3. Основные ветви филогенетического древа бактерий [11]

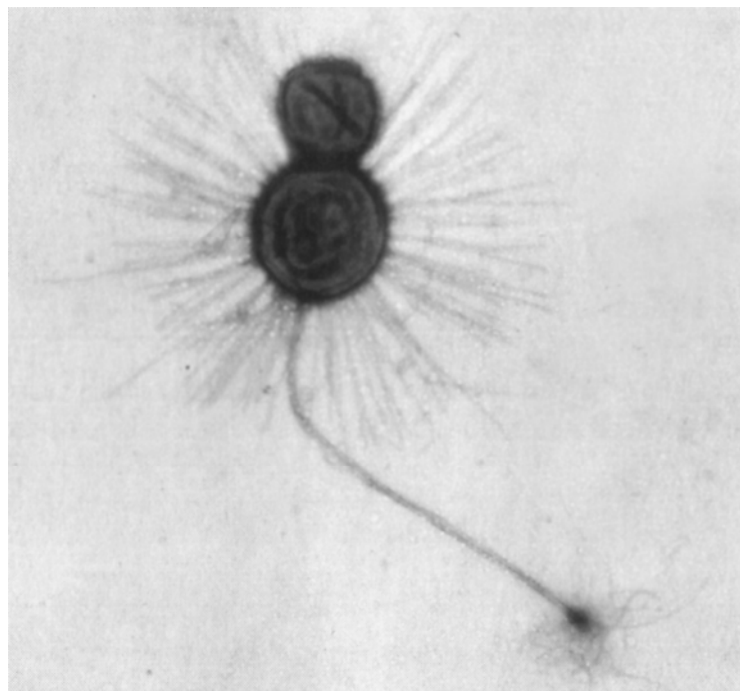


Рис. 4. *Planctomyces* sp. из подземных вод ($\times 13\ 000$) [24]

видов, которые ассоциированы с “морским снегом” и разлагающимися остатками водорослей. В этих агрегатах планктомицеты обнаруживаются по флюоресцентным олигонуклеотидным пробам в виде обычных палочек.

Среди основных филумов (цианобактерий, протеобактерий и грамположительных бактерий) прослеживается четкая тенденция к преобладанию в водных экосистемах протеобактерий. Они имеют клеточную стенку (КС) грамотрицательного типа, обладают огромным морфотипическим и таксономическим разнообразием. В процессе эволюции у них выработались адаптивные признаки для обитания в водной среде: жгутики, простеки, прикрепительные диски, газовые вакуоли, чехлы и пр. [10].

Большинство культивируемых морских бактерий относится к γ -ветви Proteobacteria. Для таксономии морских псевдомонад использовали род *Alteromonas*, в котором выделили pp. *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Shewanella*, *Glaciacola* и реклассифицировали в сем. Alteromonadaceae. Морских спирилл относили к р. *Oceanospirillum*, среди которых есть представители как гамма-, так и альфа-протеобактерий. Филогенетически родственная группа *Vibrio* близка по обмену энтеробактериям и способна к брожению, что позволяет ей быть совместимой с пребыванием в животных. Среди выделенных культур барофилов преобладает *Shewanella*.

α -протеобактерии более специализированы и выделяются значительно реже, но по данным прямых определений они многочисленны в море. К числу культивируемых относятся группировки *Roseobacter* и *Sphingomonas*. Род *Roseobacter* включает фенотипически разные организмы с исключительно морским местообитанием. Первые представители этого рода были выделены с поверхности водорослей и отнесены к эритробактериям, поскольку синтезировали фотосинтетически активный бхл *a* и могли использовать его для синтеза в анаэробных условиях, но не для роста. Другие виды *Roseobacter* не синтезируют бактериохлорофилл. Многие из них метаболизируют серные соединения, в частности диметилсульфопропионат, предшественник диметилсульфида (ДМС). *Erythrobacter*, переименованный в *Sphingomonas*, в отличие от других пресноводных эритробактерий, обитает

в море. Это аэробные подвижные палочки с полярным жгутиком, образующие желтые колонии, из-за чего они часто попадали в число флавобактерий. Один из штаммов *Sphingomonas* оказался “ультрамикробом” из-за очень маленьких размеров и способности к олиготрофному росту [12].

Среди протеобактерий нитрифицирующие бактерии представлены в природе в основном галофильными видами. Генетическое разнообразие хемоавтотрофных аммонийокисляющих бактерий в почве оказалось очень низким и ограничивалось бактериями, подобными р. *Nitrosospira*.

Вторую крупную филогенетическую группу в море составляет не получившая таксономического названия ветвь Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (“CFB”-ветвь бактерий). В целом CFB-группа очень разнообразна и морфологически, и филогенетически. Культуры их представлены аэробными или факультативно анаэробными хемоорганотрофами. Многие обладают скользящим движением и приурочены к разложению таких макромолекул, как хитин, агар, ДНК, целлюлоза. Большинство культур морских CFB-бактерий отнесено к семейству Flavobacteriaceae. Флавобактерии в море ассоциированы с поверхностями “морского снега”, микро- и макроводорослей, широко распространены и в пресных водах.

Морские метанотрофы и метилотрофы разделены между альфа- и гамма-подклассами протеобактерий. Для моря они представляют функционально важную группу, предотвращая возможность выноса метана из осадков, в том числе из метанокристаллогидратов.

Анализ практической систематики, описанной в девятом издании. Определителя Берджи (1997), показывает, что представители 18 групп выделены из воды и/или осадков пресноводных и/или морских водоемов.

Вся группа аноксигенных фотобактерий (28 родов) – типично водные формы, образующие маты в лагунах и выходах термальных источников или окрашенные стратифицированные зоны в озерах и морях. Только единичные формы этих бактерий обнаруживаются в почвах, залитых водой, например в рисовых чеках.

Среди прокариот типичными обитателями пресноводных и морских экосистем является большинство хемо- и фотолитотрофных бактерий, участвующих в основном в превращениях серы и ее соединений. Среди них много экстремофилов: термофилов, галофилов, ацидофилов. Это либо обитатели кипящих сульфатных вод, для которых температурный диапазон составляет 70–100°C, либо кислых вод подземных шахт с рН 1–3, либо галофильные археобактерии.

Особую группу типично водных форм составляют сероокисляющие и плоские нитчатые скользкие бактерии, пелонемы, а также бактерии, образующие чехлы. Это обитатели озер, ручьев, источников. Морфологически серобактерии, бесцветные нитчатые бактерии и цианобактерии составляют параллельные ряды форм.

К микроорганизмам – космополитам следует отнести цианобактерий, а также почкующихся и простекобактерий. Цианобактерии – специфические кислородные фототрофные бактерии – широко распространены в природе: от соленых водоемов и горячих источников, где они образуют многослойные маты, до коры деревьев, поверхности скал и почв. Диссипотрофные почкующиеся либо простекобактерии рр. *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Gallionella* и др. не только широко распространены в водоемах, но являются типичными обитателями переувлажненных почв, в водной фазе которых они способны существовать [10].

Грамположительные бактерии не являются типично водными, для их развития необходима твердая фаза, поэтому они концентрируются в осадках водоемов. Тем не менее, из водных сред выделяются представители родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Brevibacterium*. Молочнокислые бактерии обнаруживаются в иловых отложениях пресноводных водоемов и в пищеварительном тракте рыб. В донных осадках озер много целлюлозоразлагающих бактерий, среди которых известна ассоциация *Clostridium cellobioparum* и *Bacillus polymyxa*.

Особую группу среди грамположительных бактерий составляют “водные актиномицеты” – актинопланы. Они имеют развитый мицелий. Споры образуются в мешковидном спорангии и в нем переживают высыхание. Однако при увлажнении споры выходят наружу в виде подвижных жгутиковых клеток. Актино-

планы часто развиваются на пыльце растений, плавающей на поверхности воды в нейстоне, и способны разлагать воскоподобные соединения кутикулы. Впрочем, все известные представители обнаруживаются и в насыщенных влагой почвах.

Что касается архей (рис. 5), то их как экстремофилов безусловно следует отнести к типично водным организмам. Культуральными методами показано, что даже строго анаэробные археи, образующие метан, – это обитатели бескислородных зон морских осадков и иловых отложений, соленых маршей; 61% метаногенов являются галофилами. В почвах обнаруживаются лишь представители одного-двух родов. Молекулярными методами установлено, что археи гораздо шире распространены в планктоне рек и морей, чем представлялось ранее. Пелагические кренархеоты составляют до 39% пикопланктона на глубинах более 1000 м. Археи Мирового океана численностью $1,3 \cdot 10^{28}$ клеток не уступают бактериям $3,1 \cdot 10^{28}$. Однако функция планктонных кренархеот не известна.

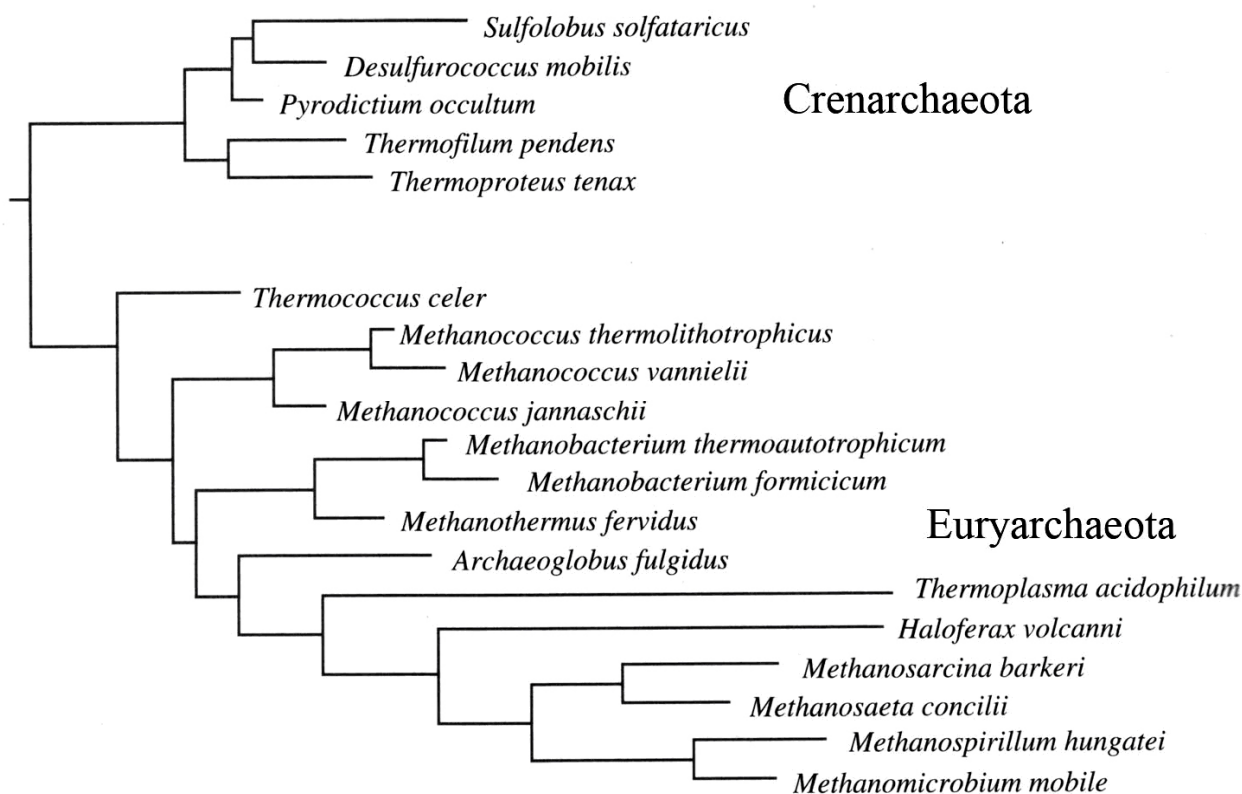


Рис. 5. Филогенетическое древо архей [23]

2.3. Физико-химические условия и пространственная организация микробиоты в водоемах

Основными факторами, которые определяют распространенность бактерий в водной среде, являются

- количество доступных пищевых субстратов, прежде всего органического вещества, и режимы их поступления,
- температура,
- содержание кислорода,
- наличие анаэробных газов: сероводорода, метана и т.п.
- окислительно-восстановительный потенциал,
- свет,
- соленость (для морских видов) [4].

Сочетание этих факторов позволяет выделить в водоеме такие зоны, как

- верхний эпилимнион – прогреваемый и освещенный слой;
- нижний эпилимнион – термоклин (зона температурного скачка);
- освещенные хемоклин (металимнион) и гиполимнион;
- темновая зона гиполимниона,
- иловые отложения.

О влиянии каждого отдельно взятого фактора можно прочитать в общих руководствах [16,17]. Здесь мы хотим обратить внимание на различия в сочетании этих факторов для водоемов различной трофности (рис. 6).

В эвтрофном озере вода перенасыщена кислородом в подповерхностном слое, но не содержит его в металимнионе (показан серым). Градиенты CH_4 и NH_3 достигают глубины исчезновения O_2 . H_2S может использоваться фототрофными бактериями в верхней части анаэробной зоны. Нитрат обнаруживается только в эпилимнионе. В олиготрофном озере содержание кислорода возрастает в более глубоких слоях воды вследствие его большей растворимости при низкой температуре и может убывать непосредственно над поверхностью осадков. Нитрат представляет здесь единственную растворимую форму азота над поверхностью осадков. В верхних слоях воды он потребляется фитопланктоном.

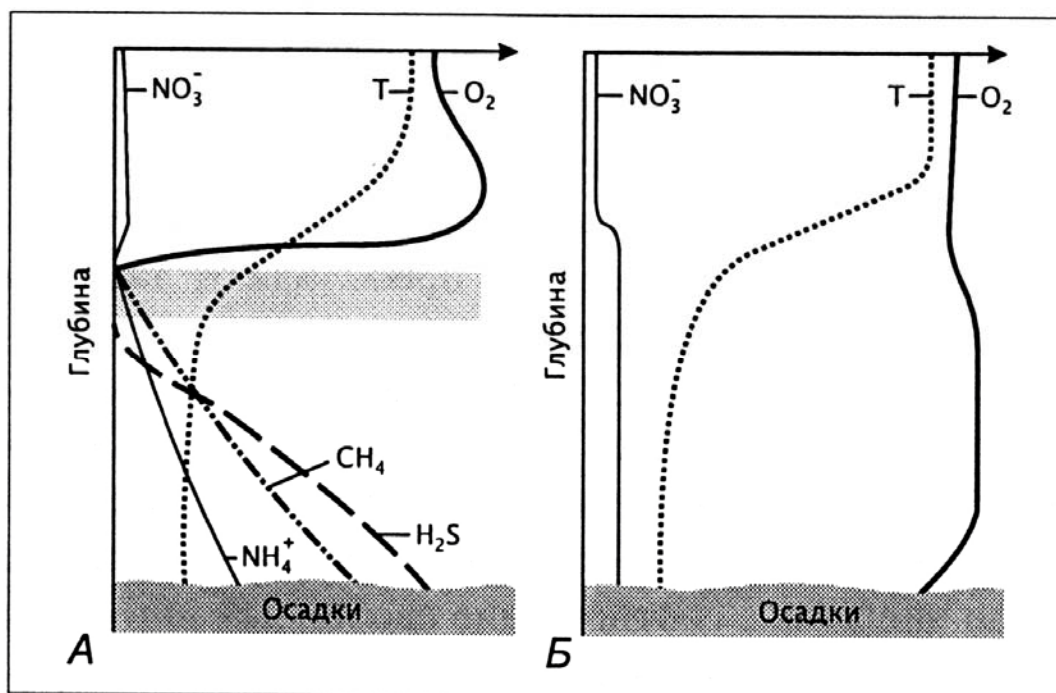
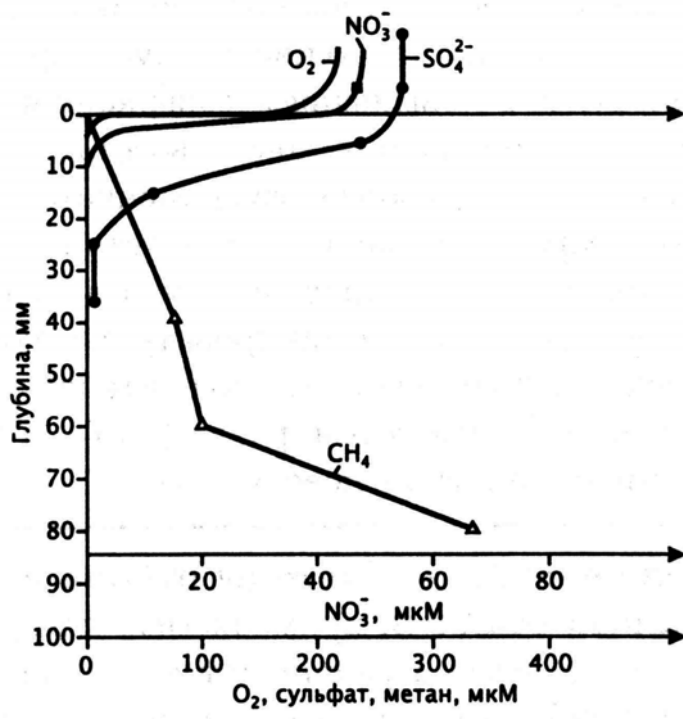


Рис. 6. Распределение температуры и растворенных соединений в эвтрофном (А) и олиготрофном (Б) озерах в зоне умеренных широт при летней стратификации [20]:

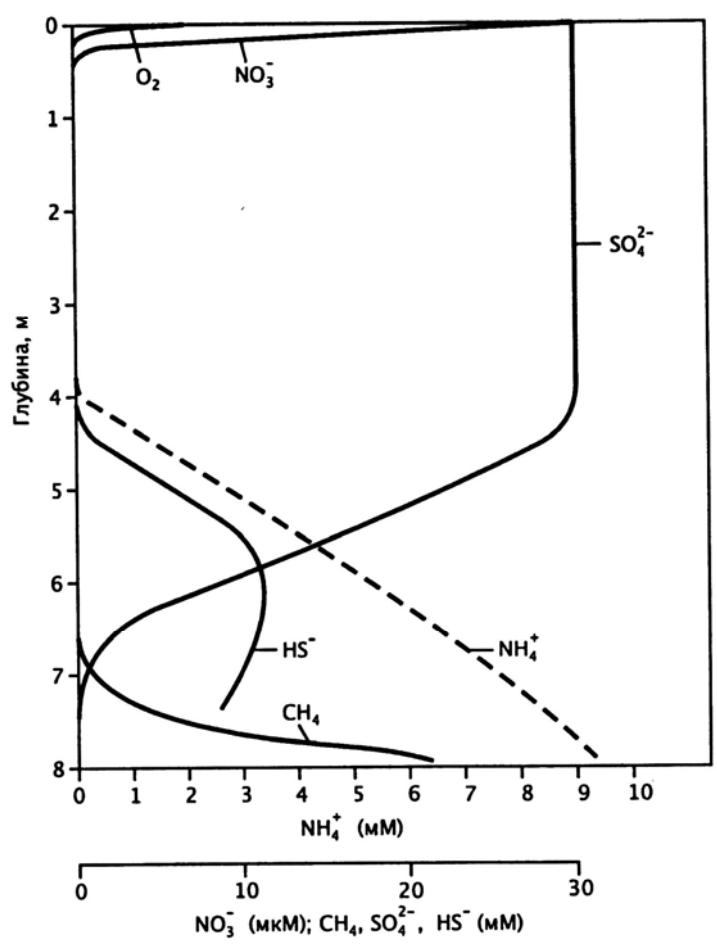
Т – температура, ось абсцисс – содержание веществ и температура

Аммиак, метан и H_2S не присутствуют в регистрируемых концентрациях. Кроме того, химические градиенты имеют место в донных отложениях, причем весьма различаются по масштабам для пресноводных и морских экосистем (рис. 7).

Для каждого отдельно взятого микроорганизма важно сочетание экологических факторов в ближайшем от него окружении, поэтому экологические ниши водных бактерий могут ограничиваться миллиметрами, что определяет отчасти и трудности их выделения. Кроме того, воздействие двух лимитирующих факторов может сильно изменить экологические предпочтения вида. Примером из опыта нашей лаборатории может служить выделенная Г.В. Кондаковой *Bacillus sp.* П-3, которая по отношению к минерализации и температуре является аборигенным представителем пластовых вод Медягинской скважины. Она растет при 45–75°C с оптимумом 60° и выдерживает минерализацию более 250 г/л при природной рН = 5,42. Однако в лабораторных условиях при нейтральных рН *Bacillus sp.* П-3 признаков галофилии не обнаруживала [13].



А



Б

Рис. 7. Распределение метаболитов в осадках пресноводного озера (А), в морских осадках на глубине 1000 м высокопродуктивной зоны апвеллинга (Б) [18]

Таким образом, обычно выделяемые в общей гидробиологии бактерионейстон, бактериопланктон и бактериобентос представляют собой сложные микробные сообщества, населенные микроорганизмами специфических эколого-физиологических и таксономических групп.

Бактерионейстон – сообщество поверхностной пленки. Оно состоит из бактерий с нетрадиционной морфологией. Здесь доминируют почкующиеся – *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Planctomyces*, и стебельковые – *Caulobacter*, *Asticcaulis*, *Prosthecomicrobium*. Например, *Nevskia ramosa*, выделенная в 1892 г. А.С. Фаминциным из аквариума с водой р. Нева, прикрепляется к поверхностной пленке воды при помощи стебельков, образуемых слизью, которая выделяется боковой стороной клетки. При делении бактерии клетки расходятся, а стебельки нет. В результате образуются слизистые древоподобные колонии из дихотомически ветвящихся стебельков (рис. 8).

Спектр источников углерода для микробного роста в поверхностной пленке ограничен мономерными органическими соединениями, куда входят моно- и дисахара, органические кислоты цикла Кребса, аминокислоты, летучие жирные кислоты, образующиеся на последних этапах минерализации ОВ.

Основным типом метаболизма бактерий нейстона является хемоорганогетеротрофия. Но по адаптированности к низким концентрациям субстрата и высокому сродству к субстрату они являются облигатными олиготрофами. Сложная морфология стебельковых, простековых и почкующихся бактерий в природных условиях – это тоже адаптация к олиготрофным условиям (увеличение удельной поверхности). В лабораторных условиях на богатых питательных средах эти бактерии округляются и теряют простеки.

Бактериопланктон – сообщество водной толщи, основная часть активного автохтонного микробоценоза, ответственная за гомеостаз аквасистемы, которая учитывается методом общего счета. Подавляющее большинство бактерий планктона выделяются на МПА и МПА_{разб.}, так как по основному типу метаболизма они являются хемоорганогетеротрофами. По спектру утилизируемых субстратов бактерий планктона относят к универсалам.

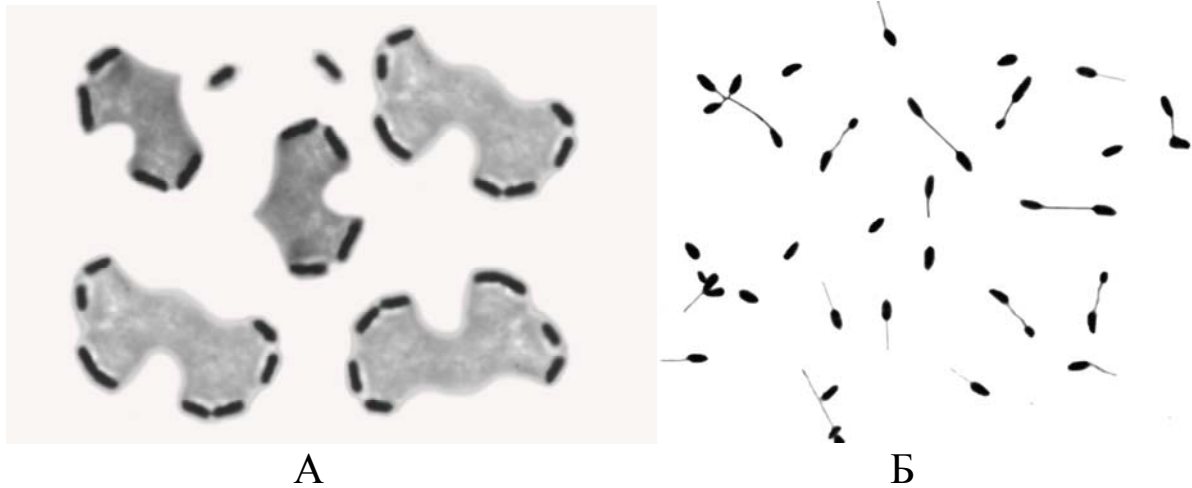


Рис. 8. Плавающие колонии А – *Nevskia ramosa* ($\times 850$)
и Б – *Nuphromicrobium vulgare* ($\times 900$) [24]

В аэробном бактериопланктоне эпилимниона выделяют несколько морфологических групп:

- грамотрицательные неспорообразующие палочки – сем. *Pseudomonadaceae*, *Achromobacteriaceae*;
- грамположительные неспорообразующие палочки сем. *Corynebacteriaceae*;
- грамположительные спорообразующие сем. *Bacillaceae*;
- кокки;
- спирали и вибрионы (особенно многочисленные в морях).

Адаптивной особенностью планктонных микроорганизмов является факультативная олиготрофия, следствием которой является отсутствие активной каталазы – фермента, ускоряющего разложение пероксида водорода:



При низкой концентрации доступного органического вещества количество образованного пероксида водорода и скорость его выделения невелики, поэтому H_2O_2 рассеивается в окружающей среде без ущерба для бактерий. На богатых питательных средах большие количества образованного пероксида водорода отравляют бактерии, и у водных псевдомонад появляется каталазная активность.

Псевдомонады обладают мощным ферментативным аппаратом, доминируют в бактериопланктоне пресноводных водоемов и морей. Подвижность, способность к хемотаксису, высокие удельные скорости роста способствуют этому. И на питательных средах в накопительных культурах они появляются первыми (г-стратегия).

В противоположность им коринеформные бактерии неподвижны, имеют относительно низкие удельные скорости роста, высокие константы насыщения субстратом (K_s), таким образом обладают врожденной олиготрофией (К-стратегия). Доминируют при отсутствии поступления свежего органического вещества в экосистему.

Присутствие в планктоне спорообразующих бактерий р. *Bacillus* имеет индикаторное значение. По Кузнецову их содержание в морских водах приближается к 5%, менее 10% их содержится в олиготрофных водоемах, содержание спорообразующих прокариот 20–25% характеризует мезотрофные, более 50% – эвтрофные и около 85% – дистрофные водоемы.

В зоне термоклина увеличивается плотность воды, за счет чего образуется так называемое "жидкое дно". На его поверхности скапливается большое количество органических веществ (отмершие водоросли, зоопланктон, экскременты). Эти ОВ усваиваются своеобразным микробоценозом, в котором доминируют гидролитики, способные к скольжению. Среди них миксобактерии и спороцитозоаги разлагают клетчатку, крахмал, альгиновую кислоту, глюкозиды. Хитин разрушают *Lysobacter* и *Beneckia*, агар – *Alginomonas*, *Vibrio*, *Agrobacterium*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*.

В микроаэрофильной зоне, где присутствуют одновременно кислород, водород, метан, сероводород, закисные формы железа и марганца, функционируют водородокисляющие, метанокисляющие, тионовые, железобактерии, магнитотаксические бактерии, некоторые формы фотосинтезирующих бактерий.

В анаэробном гипolimнионе бактериопланктон представлен формами, обладающими газовыми вакуолями (рис. 9). Газовые вакуоли свойственны только водным бактериям. Изменение их наполнения газом позволяет бактериям двигаться по вертикали в

поиске подходящих условий. Среди обладателей газовых вакуолей находятся представители многих систематических групп:

- фототрофные бактерии сем. Chloroflexaceae, Chromatiaceae;
- зеленые нитчатые *Cloronema giganteum*,
- почкующиеся *Prostecomicrobium*;
- хемоорганотрофные железоокисляющие *Ochrobium tectum*;
- метанобразующие,
- анаэробные бродильщики р. *Clostridium*.

В каждой зоне микроорганизмы могут реализовывать различные экологические стратегии. С помощью детекции двух типичных популяций бактерий в эвтрофном озере методами эпифлюоресцентной микроскопии и моноклональных антител было показано, что *Comamonas acidovorans* сосредоточен в оксиэпилемноне и является устойчивым к атаке простейших К-стратегом, а быстрорастущий *Aeromonas hydrophila* населяет высокопродуктивный аноксигенный термоклин и осуществляет r-стратегию [10].

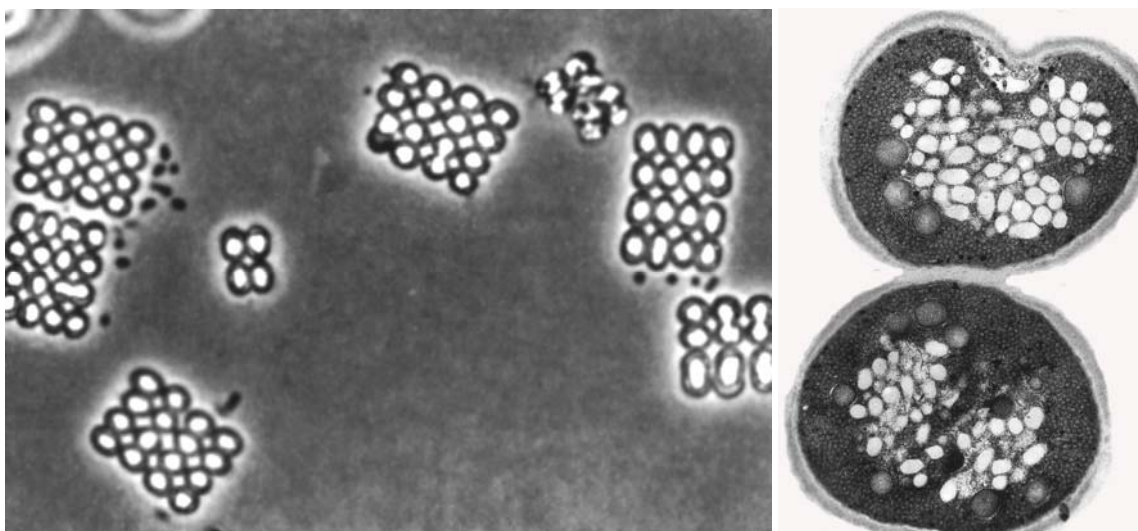


Рис. 9. Колонии и клетки с газовыми вакуолями *Thiopedia sp.* [24]

В поверхностном слое анаэробного ила обитают скользящие либо прикрепленные к субстрату организмы: флексибактерии, нитчатые серные *Beggiatoa* и *Thiothrix*, зеленые скользящие фототрофные нитчатые бактерии, факультативно анаэробные *Cytophaga succinicans* и *C. fermentas*, строго анаэробные виды р. *Fusobacterium*, нитчатые бактерии pp. *Pelonema*, *Peloploca*, *Leucothrix*, железобактерии *Metallogenium*, *Hyphomicrobium*, *Seliberia*. Здесь же обнаружены факультативно анаэробные виды *Bacillus polymyxa* и

B. circulans, строго анаэробные сульфатредукторы. Анаэробный распад ОВ в поверхностном слое ила осуществляют клостридии, сульфатредукторы и энтеробактерии. В качестве конечных продуктов образуются ЖК, H_2 , CO_2 , спирты, ацетат, лактат.

Глубже расположена ниша сульфатредуцирующих и метанобразующих прокариот. Здесь идет анаэробный распад опустившегося на дно ОВ с образованием H_2 , CO_2 и уксусной кислоты, которые служат источником для образования метана археями разных видов с доминированием *Methanosarcina barkerii*, постоянными спутниками которых являются сульфатредукторы. Они обеспечивают как анаэробные условия, так и снабжение восстановленными соединениями серы.

Б.В. Перфильев с помощью капиллярной микроскопии обнаружил в озерном иле 8 микрозон на протяжении двух миллиметров по вертикали. В верхней зоне преобладали диатомовые водоросли, во второй – шло окисление Fe благодаря развитию *Gallionella ferruginea* и *Ochrobium tectum*. В третьей зоне находились подвижные колонии хищной бактерии *Dictyobacter rapax*, похожие на сетчатые мешочки, которые нападали на клетки микроорганизмов, убивали их и переваривали. Четвертую очень узкую микрозону населяли бактерии, внешне похожие на азотобактер, пятую – преимущественно бесцветные нитчатые бактерии. В шестой микрозоне обнаружили нитчатые, сложно перекрученные колонии, по-видимому, хищного организма, в седьмой – переплетающиеся цепочки клеток нитчатой бактерии *Lieskeella bifida*. Восьмая микрозона находилась на границе с восстановительной зоной, содержащей сульфиды, и была населена подвижной серобактерией *Thiospira* [5].

В глубинных слоях донных отложений – много осажденных жизнеспособных бактериальных клеток, ассоциированных с органоминеральными частицами. Эти бактерии исключены из круговорота вещества и энергии до тех пор, пока не произойдет глобальное перемешивание водных масс (например, апвеллинг в морях). Тогда, попав в соответствующую зону водоема, они смогут снова возвратиться к активной жизни. Эти захороненные в донных отложениях микроорганизмы рассматриваются как генофонд водной экосистемы [4].

Особое значение в водоемах как олиготрофной среде обитания имеет формирование микроорганизмами биопленок на поверхности водорослей, гидробионтов, органоминеральных частиц детрита и минералов. Каждая из них представляет собой уникальное микробное сообщество, иногда с очень сложной собственной пространственной структурой. Наиболее изученными в этом отношении являются циано-бактериальные маты, рассматриваемые как реликтовые сообщества. Однако и не видимые невооруженным глазом биопленки перифитона достаточно густо населены различными бактериями. Среди них легко различаются простековые и почкующиеся организмы (рис. 10) и обнаруживаются культуральными методами углеводородокисляющие бактерии. Биопленки, как правило, развиваются в местах концентрации или потока ОВ.

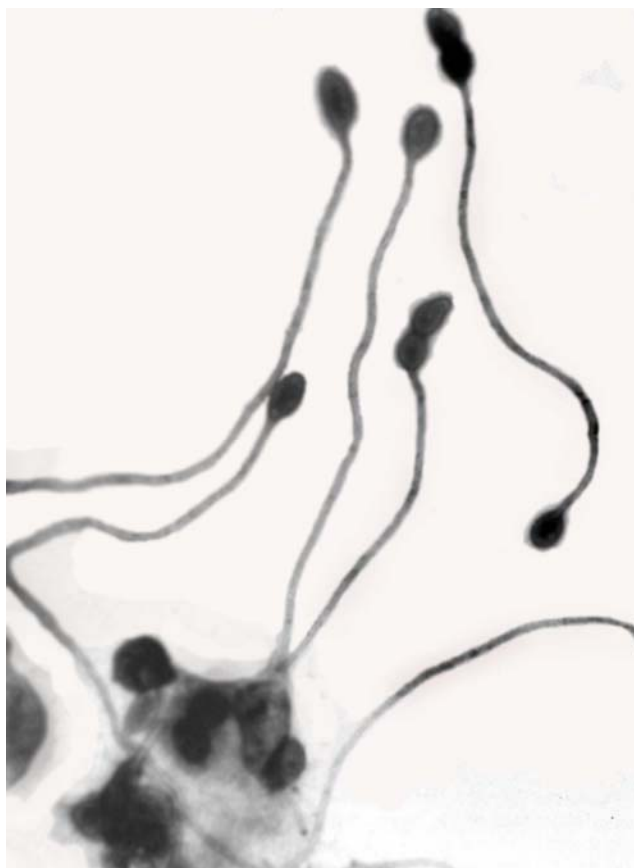


Рис. 10. Прикрепленная форма простекобактерий р. *Caulobacter* [24]

В связи с рассмотрением сообществ обрастаний представляют интерес кренофильные микроорганизмы водотоков. Они находятся под механическим воздействием потока и поэтому имеют ряд приспособлений, обеспечивающих плотную связь с субстратом. В

одном случае микроорганизмы прикрепляются ко дну слизью или даже минеральными осадками, как *Toxothrix* охристым осадком Fe или осаждающие известняк цианобактерии. В медленнее текущих водах к твердой поверхности прикрепляются нити, развевающиеся в потоке в виде косм. Эту стратегию осуществляют *Sphaerotilus*, *Thiothrix*, *Crenothrix*, а в термальных источниках *Thermothrix thiopara*, изогнутые клетки которого цепляются друг за друга. Для нитчатых кренофильных бактерий характерно наличие влагалища, в которое заключены клетки или трихомы. Кренофилы водотоков находятся в особых трофических условиях. Высокая скорость потока сужает пограничный диффузионный слой, вследствие чего питание растворенными веществами (прежде всего кислородом) должно облегчаться. Тем не менее, кренофилы не были предметом физиолого-биохимических исследований [12].

В целом структура микробоценозов любой части водоема определяется трофическими условиями. Ниже мы приводим пример определения биоразнообразия в осадках олиготрофного озера и мезотрофной р. Улеймы, определенного методом анализа липидных биомаркеров (табл. 3).

Во-первых, в осадках мезотрофной реки общая микробная масса в 9,5 раза превышает таковую олиготрофного озера, а бактериальная – в 7,8 раза. Обилие грибов свидетельствует о кислой рН воды в р. Улейме. Свидетелем подтока болотных вод служит развитие *Leptothrix*. Индикаторами загрязнения аллохтонным ОВ служат энтеробактерии, хламидии и *Sphaerotilus*, неопределяемые в олиготрофном озере. Количество хищной бактерии *Bdellovibrio* соответствует величине микробного населения в осадках. Таким образом, анализ липидных биомаркеров позволяет реконструировать структуру микробоценозов, которая вполне соответствует трофическому статусу водоема. Пространственная структура водной микробиоты во многом определяется условиями, в которых осуществляется цикл углерода и других биогенных элементов.

Таблица 3

Структура микробных сообществ ила из озера Давос
и реки Улеймы, сформировавшихся
у стенки сосуда с магнитом [21]

№	Организм	Количество, мкг/г сух массы	
		оз. Давос	р. Улейма
1	<i>Aquaspirillum</i>	0,17	0,00
2	<i>Bdellovibrio</i>	51,32	545,03
3	<i>Flavobacterium</i>	2,68	40,71
4	<i>Pseudomonas putida</i>	411,34	91,62
5	<i>Pseudomonas multophila</i>	0,00	308,57
6	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	0,00	781,33
7	<i>Pseudomonas cepacea</i>	26,67	612,87
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,41	80,95
9	<i>Geobacter (P. diazotrophicus)</i>	70,34	1200,57
10	<i>Bacteroides</i>	32,43	314,13
11	<i>Bacteroides ruminicola</i>	36,50	549,42
12	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,00	40,48
13	<i>Desulfobacter</i>	31,67	155,73
14	<i>Chlamidia</i>	0,00	33,25
15	<i>Caulobacter vibrioides</i>	5,79	4,00
16	<i>Sphaerotilus</i>	0,00	164,1
17	<i>Capnocytophaga</i>	2,30	153,35
18	<i>Cytophaga</i>	12,14	80,54
19	<i>Flexibacter</i>	0,00	1,24
20	<i>Leptothrix</i>	0,00	175,08
21	<i>Eubacterium</i>	0,00	1,03
22	<i>Bacillus cereus</i>	8,50	194,33
23	<i>Bacillus subtilis</i>	4,97	8,57
24	<i>Clostridium perfringens</i>	0,37	2,49
25	<i>Nocardiopsis</i>	0,00	157,14
	Бактерии	703,81	5524,53
26	Algae	45,52	377,71
27	Candida	5,79	12,57
28	Fungi	48,39	1679,87
	Микроорганизмы	803,53	7594,68

3. ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ВОДНЫХ ПРОКАРИОТ

3.1. Цикл углерода и микроорганизмы, его осуществляющие

Углерод, составляющий основу всего органического вещества, постоянно циркулирует в природе. CO_2 – находится в центре этого круговорота. Земная атмосфера содержит около 0,032% CO_2 , по объему примерно $2,3 \cdot 10^{12}$ т. В море содержится углекислоты примерно в 50 раз больше, в основном в виде бикарбонатов. Газообмен между атмосферой и водной поверхностью невелик – $0,1 \cdot 10^{12}$ т/год. Наличие CO_2 – предпосылка возникновения жизни на Земле, включая водные экосистемы. Он является гарантией функционирования цикла азота. Доля микроорганизмов, участвующих в цикле углерода, в водных экосистемах больше, чем в наземных местообитаниях.

Основную роль в круговороте углерода играют процессы продукции и деструкции ОВ. Продукция ОВ в озерах и морях осуществляется, прежде всего, одноклеточными водорослями и цианобактериями фитопланктона. Деградация ОВ – главным образом бактериями. На суше напротив, продукцию ОВ обеспечивают высшие растения, а деструкцию – грибы и низшие беспозвоночные. Через эти процессы осуществляется связь цикла углерода со многими циклами других элементов, таких как сера, азот, железо, которые включаются в ОВ при участии отдельных видов и сообществ микроорганизмов.

Общая схема процессов круговорота углерода с учетом степени насыщенности кислородом отдельных слоев озера в период летней стратификации приведена на рис. 11. Пополнение водоема ОВ идет за счет поверхностного стока с водосборной площади (12) и за счет ассимиляции автохтонных микроорганизмов.

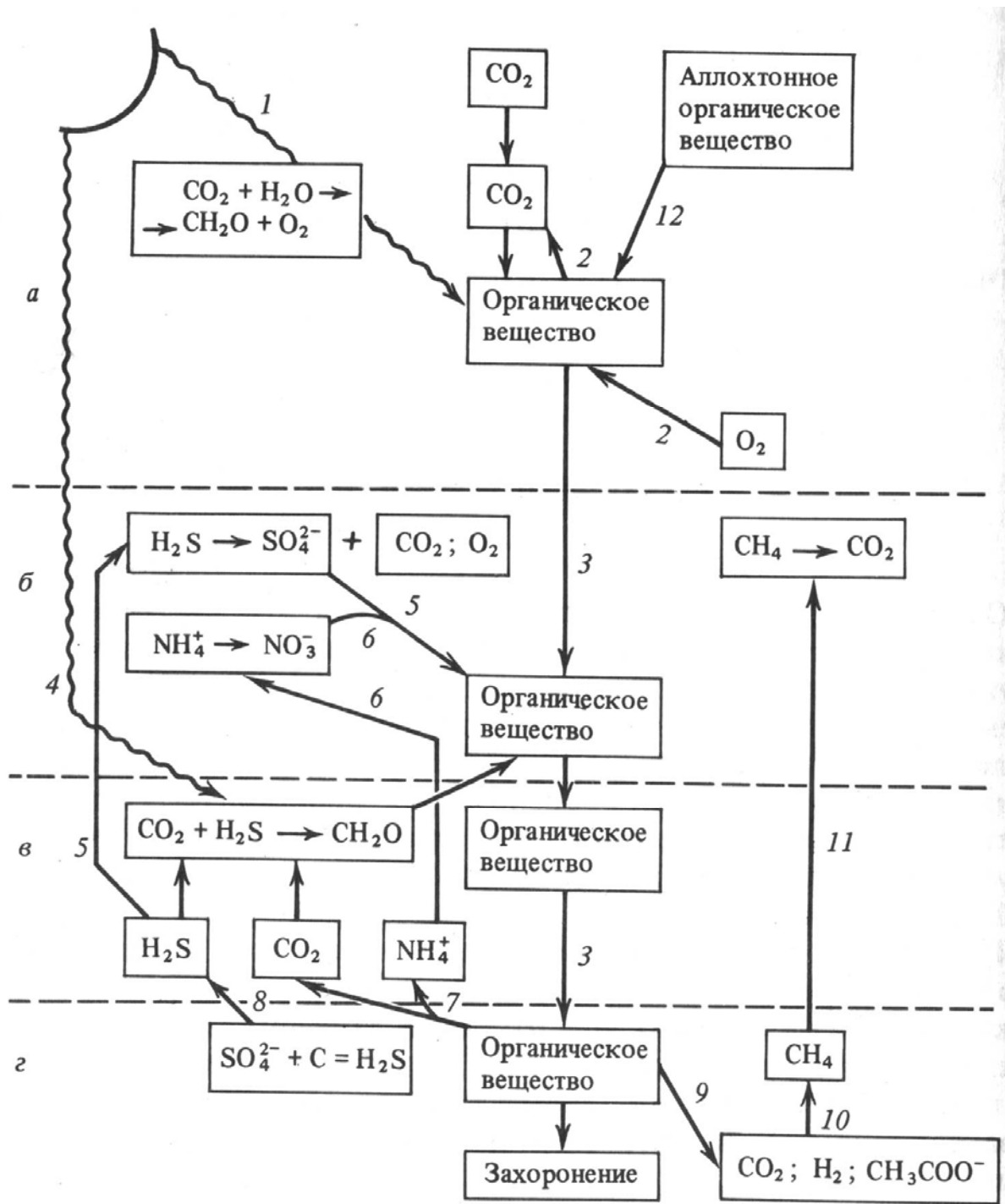


Рис. 11. Круговорот углерода в водоемах [14]:

- 1 – фотосинтез фитопланктона и высшей водной растительности,
 2 – аэробная деструкция ОВ, 3 – осаждение ОВ, 4 – аноксигенный фотосинтез,
 5 – хемосинтез тионовых бактерий, 6 – хемосинтез нитрификаторов,
 7 – анаэробный распад ОВ, 8 – восстановление сульфатов,
 9 – брожения, 10 – метаногенез, 11 – окисление метана, 12 – поступление в водоем аллохтонного ОВ; а – аэробная зона; б – микроаэрофильная зона, в – анаэробная зона, г – донные отложения

Ассимиляция (создание первичной продукции) происходит в процессах фотосинтеза и хемосинтеза. Прокариоты способны осуществлять разные виды фотосинтеза (1,4): аэробный (кислородный) и анаэробный (аноксигенный). Кислородный фотосинтез осуществляют цианобактерии наряду с водорослями и сосудистыми гидрофитами. Аноксигенный (бескислородный) – зеленые и пурпурные бактерии. Последние являются облигатными анаэробами или микроаэрофилами. Для фотосинтеза им нужен свет и подходящие доноры электронов (сероводород, органические кислоты или другие органические соединения). Эти условия встречаются нечасто, но там, где они есть (эвтрофные пруды и мелкие озера, лагуны и лужи прибрежных районов океанов), можно наблюдать массовое развитие фотосинтетических бактерий, сопровождающееся продукцией значительных количеств органического вещества, сравнимое с продукцией фитопланктона в соответствующих условиях.

В 70–80-х гг. XX в. обнаружено, что первичная продукция фитопланктона в оз. Вадолек (Польша) в эпилимнионе составляла около 22 мгС/м³/сут, а в гиполимнионе за счет *Clorobium* – 8,5–17,3 мгС/м³/сут. В озере Вечтен (Нидерланды) вклад фототрофных серных бактерий в первичную продукцию пелагиали в среднем составлял 4%, а в период массового развития в сентябре увеличивался до 18% [24].

Вклад хемоавтотрофных прокариот в продукцию ОВ, по видимому, невелик, что объясняется малой эффективностью процесса хемосинтеза. По расчетам Старкея (1945), железобактерии для синтеза 1 г ОВ должны окислить 280 г Fe(II). Однако хемосинтетики широко распространены в водных экосистемах: нитрифицирующие – в аэробных осадках (6), сероокисляющие – в водах, содержащих кислород и сероводород (5), железо- и марганцеокисляющие бактерии также дают массовые вспышки роста. С другой стороны, возможно, истинный вклад хемоавтотрофов еще не оценен по достоинству, так как в афотической зоне, составляющей большую часть океана, достаточно источников энергии, образующихся при реминерализации ОВ (NH₃, NO₂, H₂S, H₂, CH₄). По крайней мере, в зонах глубоководных гидротерм сероокисляющие бактерии за счет энергии вулканизма дают вспышки

массового развития, особенно *Thiospira pelophila*, *T. crunogena*, а также виды рода *Thiobacillus*.

Диссимиляция – ступенчатое разложение ОВ гетеротрофами. Растения и животные выделяют прижизненные экссудаты и секреты в окружающую воду, а умершие организмы лизируются. Частицы мертвого ОВ могут быть превращены в растворимое органическое вещество и в подходящих условиях переводиться снова во взвешенные частицы.

Деструкция ОВ протекает наиболее быстро в присутствии O_2 (2). Полное окисление ОВ до исходных CO_2 и H_2O (минерализация) возможно только в аэробных условиях (аэрируемые водоемы). В анаэробных условиях деградация ОВ часто остается неполной (7). При отсутствии кислорода разложение углеродсодержащих соединений, по крайней мере, замедляется

Вещества (белки, сахара), которые легко разлагаются, окисляются в процессе эндогенного дыхания. Более устойчивые к окислению (жирные кислоты, целлюлоза, лигнин и продукты их разложения) накапливаются и участвуют в образовании так называемого водного гумуса. Этот процесс может усиливаться отсутствием косубстратов, поскольку некоторые из них разлагаются только в процессе кометаболизма, когда есть небольшие количества легко ассимилируемых веществ, например, аминокислот или простых углеводов. Процессы кометаболизма (соокисления) имеют значение в бедных ОВ водах.

Поскольку связанный кислород доступен в форме нитритов, нитратов и сульфатов, окончательно он может использоваться в нитратном и сульфатном дыхании. В принципе возможно и дыхание с помощью промежуточных продуктов метаболизма. Однако в бродильных процессах, как правило, промежуточные продукты накапливаются, и только часть ОВ разлагается до CO_2 . При брожениях, вдобавок к другим соединениям, накапливаются органические кислоты, и в подходящих условиях возможно метановое брожение (образование CH_4). В этом процессе также образуется малое количество CO . Если кислород доступен, то угарный газ превращается в CO_2 . Конечно, цикл углерода в водоемах зависит и от других факторов, например, от рН, наличия соединений азота и фосфора.

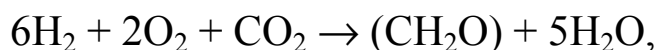
При неподходящих условиях цикл углерода нарушается, промежуточные продукты концентрируются, осаждаются и накапливаются в осадках. В шкале геологического времени эти осадки могут достигать огромных размеров и подвергаться дальнейшим превращениям, которые в свое время привели к образованию нефти, газа, угля и торфа.

Большинство природных органических соединений состоит только из 3-х элементов: С, Н и О. Их количественное соотношение больше в наземном органическом веществе, чем в образовавшемся в водоемах. Однако в почвах наблюдается обогащение гумуса азотом, в результате чего соотношение С:Н изменяется от 40:1 до 10:1 [11].

Большинство ОВ может сбраживаться в анаэробной среде. Однако существует ряд органических соединений, которые стабильны в анаэробных условиях и не могут подвергаться микробной деградациии, поскольку дыхание за счет промежуточных продуктов (фосфорилирование) невозможно. Это справедливо для углеводородов, не содержащих атомов кислорода, а также для высших жирных кислот (с длиной цепи более пяти атомов углерода), стероидов, каротиноидов, порфиринов и терпенов. Далее рассматриваются группы микроорганизмов, наиболее значимые для протекания цикла углерода в водоемах [4, 11, 24].

3.1.1. Водородные бактерии

Аэробные хемолитоавтотрофные водородные бактерии (“гидрогеномонады”) осуществляют реакцию:



в которой 5 молей водорода используется на дыхание и только 1 моль – в биосинтезе. При этом осуществляется фиксация CO_2 , а кислород выступает как акцептор электронов.

Ключевым ферментом водородного метаболизма является “потребляющая” гидрогеназа, которая может быть представлена двумя формами: связанной с ЦПМ или цитоплазматической. Большинство бактерий содержит одну связанную форму фермента, имеющую отношение только к энергетическим процессам, по-

сколько передает электроны непосредственно в дыхательную цепь на уровне флавопротеинов, хинонов или цитохрома *b*. В этом случае проблема получения восстановителя для биосинтеза решается за счет обратного потока электронов. При наличии только цитоплазматической гидрогеназы она выполняет обе функции: часть восстановительных эквивалентов с НАД·Н₂ поступает в дыхательную цепь, другая расходуется по каналам конструктивного метаболизма. Если водородные бактерии содержат обе формы гидрогеназы, то функции между ними четко разделены.

Электронтранспортная цепь водородных бактерий по составу аналогична митохондриальной, большинство из них относится к облигатным аэробам. Гидрогеназа чувствительна к кислороду, поэтому водородные бактерии чаще являются микроаэрофилами. Примером факультативно анаэробных водородных бактерий является *Paracoccus denitrificans*, у которого в отсутствие О₂ электроны с помощью соответствующих редуктаз переносятся на NO₃⁻ и NO₂⁻, восстанавливая их до N₂. Однако большая часть факультативно анаэробных водородных бактерий (например, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas*) способна восстанавливать нитраты только до нитритов.

Большинство водородных бактерий фиксирует СО₂ в цикле Кальвина (рибулозобифосфатном цикле), но автотрофия носит факультативный характер. В гетеротрофных условиях они предпочитают органические кислоты и другие продукты первичных анаэробов, например, формиат.

Группа гидрогеномонад физиологически однородна, но таксономически разнообразна. Большинство водородных бактерий относится к грамотрицательным псевдомонадам родов *Acidovorax*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Paracoccus*. Среди других форм – грамотрицательные *Aquaspirillum*, *Ancyclobacter*, *Flavobacterium* и грамположительные *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*.

Водородные бактерии способны существовать в широком диапазоне физико-химических условий. Большинство описанных организмов являются мезофильными нейтрофилами. Найден ряд форм от умеренно термофильных до бацилл, растущих при 70°C.

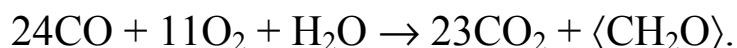
Психроактивные гидрогеомонады тундровой зоны принадлежат к *Arthrobacter* и *Acidovorax*.

Экстремально термофильные водородные бактерии гидротерм составили самостоятельную группу. *Calderobacterium* – длинная палочка, выделенная на Камчатке из цианобактериального мата, окрашена цитохромом *c* в красный цвет, растет при 80°C и является строгим хемолитоавтотрофом с высоким сродством транспортных систем к кислороду. *Hydrogenobacter* – сходный организм, выделенный в Японии, фиксирует CO₂ в восстановительном ЦТК в отличие от факультативных хемолитоавтотрофов. *Aqifex* принадлежит самой древней ветви филогенетического древа бактерий по структуре 16S рДНК.

Способность к окислению H₂ имеется у ацидофильных термофильных архей из *Sulfolobaceae*, а у протеобактерий группы *Acidiphilium* пока не установлена. Алкалофильные водородные протеобактерии недавно выделены из высокоминерализованных содовых озер с рН 10 [6, 14, 16].

3.1.2. Карбоксидобактерии

Карбоксидобактериями являются аэробные бактерии, способные к росту за счет использования СО в качестве единственного источника углерода и энергии в соответствии с реакцией:



Из уравнения видно, что окисление СО – неэффективный способ получения энергии. Для синтеза клеточного вещества карбоксидобактерии вынуждены окислять большое количество СО: 2 – 16% углерода СО в разных условиях роста. Ассимиляция СО в конструктивном обмене происходит после окисления до СО₂ с участием особой оксидоредуктазы, флавопротеина, в молекуле которого содержатся две молекулы ФАД, две – молибдена и 8 FeS-групп. Фермент активируется селенитом, локализован на внутренней стороне ЦПМ. Он окисляет СО до СО₂, передает электроны в дыхательную цепь и участвует в синтезе НАД·Н₂ путем обратного переноса электронов.

Далее CO_2 включается в цикл Кальвина (автотрофия). Почти все карбоксиобактерии могут расти автотрофно, используя водород в качестве донора электронов, т.е. представляют особую группу водородных бактерий. При гетеротрофном росте источником углерода могут являться разнообразные органические вещества, главным образом спирты, органические кислоты, метанол, формиат.

Состав дыхательных цепей карбоксиобактерий аналогичен таковому водородных бактерий. Однако у карбоксиобактерий дыхательная цепь разветвлена на уровне терминальных оксидаз, что обеспечивает их устойчивость к CO , который является дыхательным ядом. Например: у *Pseudomonas carboxidovorans* дыхательная цепь раздваивается на уровне убихинона и цитохрома *b*. Одна ветвь (органотрофная) содержит цитохромы *b*₅₅₈, *c* и *a*₁, вторая (литотрофная) – цитохромы *b*₅₆₁ и *o*. При окислении O_2 электроны поступают преимущественно в органотрофную ветвь цепи, при окислении H_2 и CO – в обе.

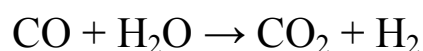
В группу карбоксиобактерий входят представители разных родов грамотрицательных бактерий, в основном псевдомонады: *Pseudomonas carboxidovorans*, *P. gazotropha*, *P. carboxidoflava*. Типичными представителями этой медленно растущей группы также являются *Achromobacter*, *Carboxydomonas*, *Comamonas*, *Zavarzinia*.

Специфическое свойство карбоксиобактерий – устойчивость к CO в газовой фазе (разные виды при выращивании толерантны к концентрациям CO от 20 до 95%). Выявлено высокое сродство водных карбоксиобактерий к угарному газу ($K_s=7-9$ нмоль CO). Для других микроорганизмов угарный газ высокотоксичен, поскольку специфически ингибирует терминальные оксидазы.

В поверхностных слоях океана и озерах концентрация угарного газа составляет 0,2 нмоль/л вследствие его низкой растворимости, нижние же слои атмосферы содержат 5 нмоль CO /л. Однако, когда было показано, что и следовые концентрации CO (1 нмоль/л) быстро утилизируются олиготрофами из природной популяции водных бактерий, стало понятным, что роль карбоксиобактерий в водных экосистемах явно недооценивали. Угар-

ный газ в водоемы поступает как естественный продукт метаболизма водорослей и грибов (СО, в частности, образуется при биораспаде порфиринов, серина, флавоноидов и др. ОВ), а также с техногенными загрязнениями из атмосферы и со сточными водами, где СО может содержаться до 500 нмоль/л. Тем не менее биологическое окисление СО атмосферы приписывается неспецифическому окислению, поскольку K_s для известных аэробных карбоксиобактерий выше естественного содержания СО в атмосфере. Неспецифическое окисление СО может идти, например, под действием метанмонооксигеназы метилотрофов *Methylococcus capsulatus*, *Methylosinus trichosporium*. У этих организмов окисление требует НАДН, генерируемого в обмене.

В 1990 г. сотрудниками лаборатории Г.А. Заварзина в гидротермах Курильских островов была открыта группа анаэробных карбоксидотрофов с типичным представителем *Carboxidothermus hydrogenoformans*, который при 70°C проводит реакцию

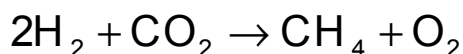


с очень низким выходом энергии $-19,93$ кДж/моль. Особенностью этих медленно растущих организмов является использование в качестве субстрата только СО [6, 14, 16].

3.1.3. Метанобразующие археи (метаногены)

Метаногены являются высокоспециализированной физиологической группой облигатно анаэробных микроорганизмов, для которых реакция метаногенеза служит единственным источником энергии. Окислителем в реакциях метаногенеза является СО₂. Соответственно по донорам электронов метаногены разделяются на три группы: 1) водородных (гидрогенотрофных); 2) ацетокластических; 3) метилотрофных, окисляющих метилированные соединения с группой О, N, S; а также политрофную метаносарцину, которая способна осуществлять все три пути.

Внутриклеточный путь образования метана:



оказался совершенно своеобразным и проходит в виде ступенчатого восстановления CO_2 с участием специфических ферментов, переносчиков группы C_1 -, переносчиков электронов. Основным переносчиком служит фактор F_{420} , который является производным 5-деазофлавиаина с очень низким Eh (-380 мВ) и получил свое название по максимуму поглощения. В окисленном состоянии он обладает сильной зеленой флуоресценцией и по этому признаку метанообразующие археи, кроме ацетокластических, легко опознаются в люминесцентном микроскопе.

Метаногены не нуждаются в экзогенном ОВ 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 относятся к архебактериям. Широкое применение анализа 16S рРНК привело к дробной систематике на уровне крупных таксонов с созданием порядков гидрогенотрофных *Methanobacteriales* и *Methanococcales*, морских *Methanomicrobiales*, ацетокластических и метилотрофных *Methanosarcinales*. Экстремально термофильные метаногены выделены в порядок *Methanopyrales*. Морфологически метаногены очень разнообразны. Систематика метаногенов основана на таких основных признаках, как строение клеточной стенки (с псевдомуреином или без псевдомуреина), а также по субстратам (продуктам) – триметиламину или ацетату.

Метанообразующие археи развиваются при очень низком Eh , в термодинамическом поле устойчивости метана, что совпадает с областью бикарбонат иона, соответственно они являются нейтрофилами. Исключение составляет метилотрофный алкалофил *Methanosalsus* из содовых водоемов. Ацидофильные метаногены пока не идентифицированы.

Большинство метаногенов является мезофилами с нижней границей около 15°C . Поиски психроактивных форм затруднены из-за крайне медленного роста. Примером психрофильного мета-

ногена является *Methanococcoides burtonii*, рост которого наблюдают в диапазоне от $-2,5$ до 28°C . Среди метаногенов много термофилов, в том числе и экстремальных, развивающихся в гидротермах при температуре до 98°C , как *Methanopyrus* и др.

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

Обычным местообитанием метаногенов являются донные отложения водоемов, пищеварительный тракт растительноядных животных (особенно рубец жвачных), гидротермы с H_2 . За исключением последнего случая метаногены зависят от анаэробного микробного сообщества, продуцирующего те немногие субстраты, которые они способны использовать, в особенности ацетат. В анаэробном микробном сообществе метаногены замыкают трофическую цепь, потребляя ацетат и H_2 . В морских анаэробных местообитаниях ацетат также используют сульфатредукторы. Особый случай составляет симбиоз метаногенов, в том числе внутриклеточный, с анаэробными протистами, для которых они составляют терминальный сток водорода. Биогаз (CH_4 : $\text{CO}_2 = 60\text{--}70:40\text{--}30\%$) образуется на дне озер и болот, поднимаясь вверх, в аэробной зоне окисляется метилотрофами, которые замыкают цикл метана.

Метаногены считаются древнейшими организмами, которые существовали в условиях восстановленной атмосферы, состоящей из CO_2 , H_2 и CO . Они чрезвычайно важны для биогеохимии, потому что служат главным источником метана на Земле [6, 14, 16].

3.1.4. Метилотрофные организмы

Метилотрофные микроорганизмы – уникальная физиологическая группа, способная расти на одноуглеродных соединениях. C_1 -соединения в составе молекул содержат либо один атом углерода и более восстановлены, чем CO_2 , либо несколько, но при отсутствии $\text{C}\text{--}\text{C}$ -связей. К веществам первого типа относят окись углерода (CO), метан (CH_4), метанол (CH_3OH), формальдегид

(СНОН), муравьиную кислоту (СНООН), метиламин (СН₃NH₂), хлорметан (СН₃Сl), цианистый калий (КСN) и др. Примером С₁-соединений второго типа служат ди- и триметиламины [(СН₃)₂NH, (СН₃)₃N], диметилсульфид [(СН₃)₂S], метилформиат (СН₃СООН) и др. В большинстве из них углерод представлен в виде метильной группы, поэтому микроорганизмы, использующие эти соединения, получили название метилотрофов.

Процесс образования метана был рассмотрен выше. Метанол в природе образуется при разложении пектина и лигнина. Формальдегид в силу его реакционной способности в свободном виде в природе не встречается. Формиат образуется в результате брожений, но в больших количествах не накапливается. N-оксид триметилamina (СН₃)₃NO – осморегулятор у морских растений и животных, является универсальным акцептором электронов (+730 мВ). После гибели морских организмов восстанавливается в триметилamin, который обуславливает запах тухлой рыбы.

Использовать С₁-соединения может множество аэробных и анаэробных прокариот. Среди анаэробов такой способностью обладают, например, серо- и сульфатвосстанавливающие бактерии, метанобразующие археи, многие типичные фото- и хемотрoфные бактерии. Кроме того, метилотрофия свойственна некоторым видам дрожжей и мицелиальных грибов.

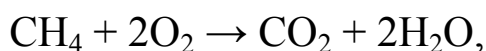
К метилотрофам относят облигатно аэробных бактерий, обладающих способностью использовать в качестве единственного источника углерода и энергии С₁-соединения. Круг таких организмов широк. Это различные грамположительные и грамотрицательные бактерии родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Hyphomicrobium* и др.

В отношении способа питания метилотрофов делят на две основные группы. Факультативные – наряду с одноуглеродными могут использовать и некоторые полиуглеродные соединения: С₂-, С₄- кислоты, этанол и глюкозу. Для облигатных метилотрофов источниками углерода и энергии являются только одноуглеродные соединения. Внутри этой группы различают облигатных, использующих только метан, и факультативных метанотрофов. Поскольку в последнее время появились новые сведения о метаболизме метилотрофов, то на сегодняшний день специалисты бо-

лее или менее определенно выделяют две группы метилотрофов: облигатные метанотрофы, способные использовать в качестве источника углерода и энергии только метан и некоторые его производные, не содержащие С–С-связи, и факультативные метилотрофы.

3.1.4.1. Метаноокисляющие бактерии

Метанотрофы осуществляют реакцию:

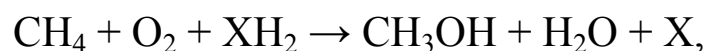


которая, несмотря на свою кажущуюся простоту, требует высокой энергии активации и поэтому доступна лишь специализированной группе организмов.

Окисление метана в присутствии кислорода идет в соответствии со схемой:



Ключевым ферментом служит медьсодержащая метанмонооксигеназа (ММО), которая окисляет CH_4 в метанол по реакции



где X – клеточный донор электронов. Обычно у изученных метанотрофов ММО связана с ЦПМ, растворимая железосодержащая форма встречается реже. У недавно выделенного рода *Methylocella*, наоборот, обнаружена только растворимая ММО. Донором электронов для мембрансвязанного фермента предположительно может быть восстановленный цитохром c или НАД \cdot Н $_2$, образующийся в результате обратного транспорта электронов, для растворимого – только НАД(Ф) \cdot Н $_2$ или соединения, которые окисляются с его образованием.

От образования метанола пути обмена оказываются сходными для метилотрофов, использующих метилированные соединения. Метанол окисляется метанолдегидрогеназой 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 под фазовым контрастом из-за пачек внутриклеточных мембран. Метанотрофы – строго специализированные микроорганизмы, использующие только метан (реже и хуже метанол) и кислород, факультативные формы среди них не известны.

К общим свойствам метанотрофов можно отнести высокое сродство к метану ($K_s=0,1-30,0$ мкМ для чистых культур и $K_s=0,1-2,2$ мкМ для смешанных), невысокую скорость роста ($\mu=0,02-0,07$ ч⁻¹), высокую скорость окисления метана ($v_{max}=10-31$ мМ СН₄/г/ч) и высокое сродство к кислороду ($K_s=0,14-0,18$ мкМ). Метанотрофы могут соокислять и другие ОВ, но как источник углерода и энергии используют только метан.

Все метанотрофы входят в филум B12 Proteobacteria. Первичная классификация метанотрофов основана на строении хорошо развитых у них внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ). Система ВЦМ I типа представляет собой стопки “тарелочек” или плотноупакованных везикулярных дисков, распределенных по всей цитоплазме. Система II типа имеет вид ламелл, сформированных мембранами, которые располагаются параллельно ЦПМ и никогда не пересекают центр клетки. Исключение составляет система ВЦМ нового рода *Methylocella*, имеющая вид мембранных везикул.

Известные облигатные метанотрофы представлены нейтрофильными и мезофильными микроорганизмами. Они разделяются на две группы:

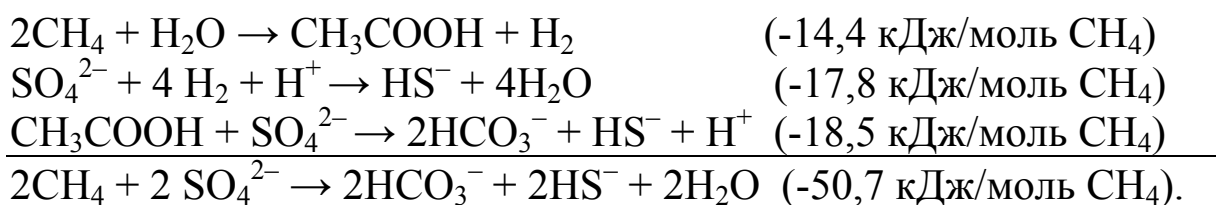
1) гамма-протеобактерии сем. Methylococcaceae: *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylococcus* – аэробные палочки и кокки с РМФ-путем анаболизма, образующие цисты, система ВЦМ I типа;

2) альфа-протеобактерии сем. Methylosinaceae: *Methylocystis*, *Methylosinus* – почкующиеся или изогнутые палочки с сериновым путем анаболизма, склонные к микроаэрофилии. Один вид *Methylosinus* может образовывать экзоспоры, система ВЦМ II типа.

Метанотрофы, способные развиваться в экстремальных условиях, стали известны в конце XX века. Все они относятся к Alpha-Proteobacteria. Среди них психрофилы – *Methylosphaera hansonii*, выделенная из соленого меромектического озера Антарктиды, и обитатель заболоченной тундровой почвы Полярного Урала *Methylobacter psychrophilus* с ростовым диапазоном 3,5–20°C. Термофилами являются *Methylocaldum* и *Methylococcus thermophilus*, который хорошо растет при 50–55°C.

Различные штаммы галотолерантного алкалофильного метанотрофа *Methylobacter alcaliphilus* с оптимумом pH 9 – 9,5 и концентрацией NaCl 1–4% выделены из содовых озер Тувы и Кении. Самостоятельными филогенетическими ветвями в пределах класса Alpha-Proteobacteria являются ацидофильные метанотрофные бактерии новых родов *Methylocella* и *Methylocapsa*, растущие при pH 4–5, а также метанотрофы – симбионты двустворчатых моллюсков метиллид.

Анаэробно метан, как показано методами радиоуглеродного анализа и рДНК-зондов, окисляется ассоциацией двух микроорганизмов: метаногенного архея и сульфатредуцирующей бактерии, согласно гипотетическому механизму:



В лаборатории Г. Виделя получены накопительные культуры, растущие при давлении 10 атм и выше за счет анаэробного окисления метана. Показано, что в анаэробных осадках потребление метана количественно связано с восстановлением сульфата. В такой системе метан – единственный источник углерода для обоих организмов, а сульфат – единственный акцептор электронов в системе [3, 6, 7,16,].

3.1.4.2. Факультативные метилотрофные бактерии

Ключевым метаболитом у метилотрофов является формальдегид, на уровне которого расходятся конструктивные и энерге-

тические пути. Часть формальдегида превращается в вещества клетки по специфическим для этих бактерий ассимиляционным циклическим путям, большая часть окисляется до CO_2 в линейной последовательности реакций через формиат.

Дыхательные цепи метилотрофов по составу переносчиков и их локализации на мембране похожи на таковые большинства аэробных бактерий, что предполагает у них три пункта сопряжения. Однако экспериментальные данные указывают на меньшие выходы АТФ. В окислительном метаболизме C_1 -соединений участвуют НАД, флавины, хиноны, цитохромы *b*, *c*, *a* и *o*.

К облигатным метилотрофам, использующим C_1 -соединения (метанол и метилированные амины), но не CH_4 , относятся некоторые виды родов *Methylobacillus*, *Methylophaga* и др.

Среди факультативных метилотрофов виды рр. *Methylobacterium*, *Methylophilus*, *Methylovorus*. Факультативно метилотрофные бактерии отличаются от облигатных метанотрофов отсутствием развитых систем внутриклеточных мембран и потребностью в витаминах и других факторах роста.

В последнее время оказалось, что многие “факультативные метанотрофы” представляют собой весьма стабильные синтрофные ассоциации, которые трудно разделить на составляющие их организмы. Хорошо изученным примером подобного рода является ассоциация облигатного метанотрофа *Methylocystis* и метанолиспользующей бактерии *Xanthobacter*. Метанооксиляющие аэробы *Methylosinus trichosporium* и *Methylococcus* часто ассоциированы с видами *Hyphomicrobium*, эффективно окисляющими метанол. Смешанная культура бактерий этих двух типов в среде с метанолом растет значительно лучше, чем чистая культура метанооксиляющей бактерии. Причиной тому служит удаление факультативными метилотрофами токсичного в определенных концентрациях метанола (и/или формальдегида), который метанооксиляющие бактерии выделяют в значительном количестве.

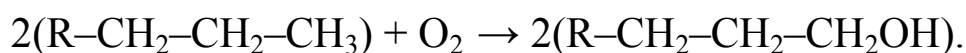
Метанол в анаэробной зоне используется сульфатредукторами или метаногенами, формиат (кроме метилотрофов) – энтеробактериями, образующими его в брожении смешанного типа.

Интерес к изучению метилотрофов связан не только с особенностями их метаболизма, но и с перспективами их практиче-

ского использования: метилотрофы характеризуются активным ростом, высокими выходами биомассы, большим содержанием полноценного белка в клетке; являются продуцентами различных веществ [14].

3.1.5. Углеводородоокисляющие бактерии

Предельные углеводороды (алканы и парафины) образуют гомологичный ряд с общей формулой C_nH_{2n+2} , первым членом которого является метан CH_4 . Алканы с большим числом атомов углерода также могут использоваться микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии. Первый этап в цепи превращений алканов – реакция окисления молекулы углеводорода O_2 с помощью оксигеназы:

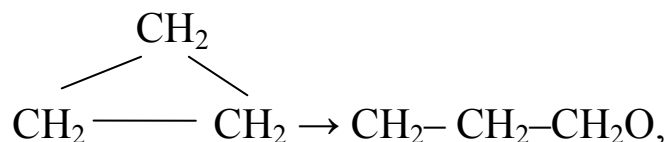


Предполагается, что эта реакция происходит в ЦПМ или на ее поверхности, а продукт окисления транспортируется затем в клетку. Последующие ферментативные реакции приводят к образованию высших ЖК, которые подвергаются β -окислению и на уровне ацетил-КоА вступают в ЦТК. Таким образом, алканы, являясь источником энергии, окисляются до CO_2 и H_2O .

Способность алканов к биохимическому окислению зависит от числа углеродных атомов в молекуле и введения заместителей, в частности, метильных групп. Наиболее трудно окисляются C_5 – C_{10} -алканы, легче – начиная с гексадекана (C_{16}). С удлинением цепи углеродных атомов расширяется число видов микроорганизмов, способных использовать алканы. Окисление алканов с разветвленной цепью, как правило, начинается с наименее разветвленного конца субстрата.

Алканы окисляются многими видами бактерий родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Bacillus* и грибами р. *Candida*. Отдельные виды бактерий способны использовать ненасыщенные алифатические углеводороды (алкены). Одни из них окисляют алкены по месту двойных связей, другие с насыщенного конца молекулы алкена, не затрагивая двойных связей.

Алициклические углеводороды с общей формулой C_nH_{2n} называют также циклопарафинами, так как, имея циклическое строение, они в большинстве случаев обладают свойствами, близкими к парафинам. Некоторые бактерии способны окислять циклопропан до пропионового альдегида:



а циклопентан, циклогексан, циклопентан и циклооктан – до соответствующих кетонов. В превращении циклопарафинов могут участвовать *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*. В то же время известно, что углеводороды этого ряда достаточно успешно окисляются смешанными культурами микроорганизмов. В целом в разрушении алифатических углеводородов принимают участие многие грамотрицательные и грамположительные бактерии родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*.

Ароматические углеводороды (АУ) представляют собой производные бензола, у которого один или несколько атомов водорода замещены радикалами. Бензол и его гомологи окисляются некоторыми видами бактерий и дрожжей.

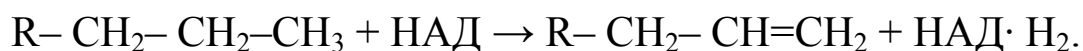
Из АУ в состав растительных тканей входят лигнины – высокомолекулярные полимерные соединения. Неоднородность состава лигнинов и прочность связей между отдельными мономерами делают их наиболее устойчивыми к биохимическому воздействию. Окисление лигнинов возможно только в аэробных условиях смешанными культурами микроорганизмов. Естественными продуктами обмена растительных и животных организмов являются фенолы – производные АУ, которые получают при замещении одного или нескольких атомов водорода бензольного кольца на гидроксильные группы. Наиболее активными деструкторами фенолов являются *Pseudomonas*, *Achromobacter* и *Bacillus*.

Виды родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, а также некоторые виды грибов (*Penicillium*, *Aspergillus* и др.) могут использовать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) с конденсированными бензольными ядрами, такие, как нафталин и антрацен.

Установлено, что при микробном окислении ароматических углеводородов главным промежуточным продуктом является пирокатехин, продукты расщепления которого включаются в ЦТК и окисляются в аэробных условиях полностью. Среди бактерий к окислению ароматических углеводородов способны представители родов *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus* и *Nocardia*.

В лабораторных условиях на ароматических соединениях вырастают в основном псевдомонады. Нерастворимые в воде углеводороды, в частности, алканы с длиной цепи C₁₀ и более, окисляют коринебактерии. Принципиальным отличием является то, что у псевдомонад гены деструкции углеводородов чаще находятся в плазмидах, а у актинобактерий р. *Rhodococcus* – в хромосомных, поэтому стабильных биодеструкторов ищут среди последних.

В анаэробных условиях углеводороды разлагаются значительно медленнее, чем в аэробных. Тем не менее процесс этот возможен. Осуществляют его смешанные культуры микроорганизмов. Наиболее вероятным вариантом начального окисления считается дегидрирование углеводородов:



В качестве промежуточных продуктов анаэробного окисления алициклических и алифатических углеводородов образуются кислоты жирного ряда. Один из компонентов смешанной культуры – метанообразующие бактерии, сбразивающие летучие ЖК. Анаэробное разложение АУ протекает значительно медленнее сбразивания алканов. В искусственных условиях оно осуществляется термофилами. Другим неотъемлемым компонентом смешанных культур являются азотфиксирующие микроорганизмы,

поскольку азот и фосфор являются главными лимитирующими элементами при окислении углеводов.

Эмульгирование биосурфактантами способствует проникновению углеводов внутрь клетки, где происходит их окисление. Псевдомонады выделяют ПАВ во внешнюю среду. У других бактерий биосурфактанты находятся в клеточной стенке или в капсуле.

Различные углеводороды могут окисляться в процессе кометаболизма бактериями, которые не способны использовать их для роста. Для роста им необходимы другие ОВ, которые также могут быть углеводородами. Соокисление подобного рода известно для алканов и хлорированных углеводов. Однако ведущая роль в разложении нефти принадлежит микроорганизмам, использующим её в качестве источника углерода и энергии. Углеродородокисляющие бактерии (УОБ) могут составлять до 80% всего микробного сообщества, участвующего в этих процессах.

Углеводороды как гидрофобные субстраты тяготеют к поверхностям раздела фаз, где и сосредотачиваются УОБ. Некоторые олигокарбофилы способны жить на поверхности воды только за счет паров бензина. Достаточно много УОБ содержится в перифитоне макрофитов: $10^4 - 10^5$ кл/г сырой массы растения при ОЧБ 10^8 . В грунтах, где сбрасываются сточные воды, обнаруживается НОБ до 10^6 кл/см³. Методами молекулярного анализа показано, что видовое разнообразие микроорганизмов в местах большего нефтяного загрязнения увеличивается за счет многообразия близкородственных видов, что предполагает более узкую экологическую нишу при токсических воздействиях на микроорганизмы. Действительно для донных отложений, содержащих большое количество нефтепродуктов, характерно присутствие узкоспециализированных групп микроорганизмов: окисляющих газообразные углеводороды; термофилов, усваивающих твёрдые парафины; бактерий, использующих ароматические углеводороды. В загрязнённых нефтепродуктами водных экосистемах обнаруживаются новые виды деструкторов, например, продуцент биосурфактанта, эмульгирующего нефть, *Alcanivorax borkumensis*, изолированный из Северного моря [1, 6].

3.1.6. Целлюлозоразлагающие бактерии

Целлюлоза – полисахарид, который является главным компонентом клеточных стенок растений и водорослей. Ее синтез по своим масштабам превосходит синтез всех остальных природных соединений, так что (наряду с крахмалом) целлюлоза – самое распространенное на Земле органическое соединение, но инертное ко многим воздействиям.

Целлюлоза – полимер, состоящий из цепочек молекул β -D-глюкозы, соединенных β -1,4-гликозидными связями и объединенных в волокна. Волокна организованы таким образом, что гидрофильные группы целлюлозных цепочек защищены от внешних воздействий. Кроме того, они окружены оболочкой, включающей в себя воск и пектин. Все это придает целлюлозным волокнам механическую прочность, делает их нерастворимыми в воде и устойчивыми к различным химическим воздействиям.

Ферментативное разложение целлюлозы осуществляется с помощью целлюлазного комплекса и состоит из нескольких этапов. Сначала эндо- β -1,4-глюканаза разрывает гликозидные связи внутри целлюлозной цепочки, что приводит к образованию довольно крупных фрагментов со свободными концами. Затем экзо- β -1,4-глюканаза катализирует отщепление от конца цепочки дисахарида целлобиозы. И, наконец, последняя гидролизуется до глюкозы с помощью β -глюкозидазы.

Ферменты, входящие в состав целлюлазного комплекса, могут выделяться в окружающую среду или оставаться связанными с клеточной поверхностью. В первом случае целлюлоза с помощью экзогенных глюканиз может расщепляться до целлобиозы. Во втором случае никаких внеклеточных целлюлаз и промежуточных продуктов расщепления целлюлозы в окружающей среде не обнаруживается. На поверхности бактериальной клетки найдены сферические частицы – центры целлюлолитической активности, получившие название целлюлосом. Они состоят из полипептидных субъединиц (комплекс целлюлазных ферментов) и углеводных фибрилл. Целлюлосомы *Clostridium thermocellum* ответственны за прикрепление клеток к целлюлозе и выделение целлюлаз. Миксобактерии не имеют внеклеточных целлюлаз, что компенсируется очень тесным контактом клеток с волокнами

целлюлозы. Таким образом, все целлюлозоразлагающие микроорганизмы – мощные гидролитики.

Биодеструкция целлюлозы происходит при Eh от –300 до +580 мВ и рН 6 – 8. При более кислых значениях рН целлюлозу разлагают преимущественно грибы, при рН = 8 – 9 – *Herphetosiphon geysericolus*. Целлюлозоразлагающие бактерии относятся к разным температурным группам: аэробы относятся к мезофилам (28 – 37°C), анаэробы являются термофилами (58 – 75°C). По-видимому, есть и психрофилы, так как в водоемах при 2 – 4°C целлюлоза активно разлагается. Микроорганизм горячих источников *Acidothermus cellulolyticum* растет на целлюлозе в широком диапазоне температур 37 – 70°C. В соленых водоемах разложение целлюлозы идет медленнее, так как увеличение концентрации NaCl замедляет деградацию целлюлозы.

Аэробные целлюлозоразлагающие бактерии pp. *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Polyangium*, *Sporangium*, *Archangium*, *Herpetosiphon*, *Sporocytophaga*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*, *Acidothermus* разрушают целлюлозу до CO₂ и H₂O, а также <CH₂O> биомассы. Некоторые из них образуют дополнительно сахара и летучие жирные кислоты.

Факультативные анаэробы pp. *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Serratia* утилизируют целлюлозу до низкомолекулярных веществ, CO₂ и H₂.

Все облигатные анаэробы, мезо- и термофилы pp. *Acetovibrio*, *Anaerocellum*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Micromonospora* разлагают целлюлозу с образованием ацетата, углекислого газа, водорода, а также формиата, этанола, лактата, бутирата, пропионата, сукцината и/или пирувата.

Содержание целлюлозы в водной толще определяется на 50% терригенным смывом. Дополнительным источником являются отходы ЦБК, которые на 20 – 50% состоят из целлюлозы. От 11 до 84% ее может содержаться в водных макрофитах и 11% в сухой массе водорослей. Источником целлюлозы могут быть и бактерии. Целлюлозосинтезирующие прокариоты найдены среди представителей родов *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Vibrio*.

Растительный опад концентрируется в зоне прибоя, другая часть его плавает на поверхности. Целлюлоза концентрируется в зонах фотосинтеза, хемоклина и осадках. Она составляет в среднем 6 г/кг сырого ила пресных озер, 1,1 – 1,9 мг/кг ила прибрежных зон морей, в донных осадках центральной части океана ее на 2 – 3 порядка меньше.

Содержание целлюлозы в иле отражает трофность водоема. Так, в дистрофных озерах она составляет 95% сухой массы ила, 30 – 70% – в эвтрофных и 3 – 5% – в олиготрофных.

Максимально зарегистрированное количество аэробных и анаэробных целлюлозоразлагающих микроорганизмов составляет 10^4 кл/мл в пресных водоемах и 10^3 кл/мл в море. На поверхности макрофитов их плотность составляет 10^6 кл/г растения. В донных осадках аэробные целлюлозоразлагающие бактерии составляют 2 – 20 тыс. кл/мл, анаэробные (кlostридии, актиномицеты) – около 10 млн. кл/мл сырого ила. Скорость разложения целлюлозы в водоемах оценивают в мкг/л/сут.

Для выделения чистых культур и количественного анализа методом НВЧ для аэробов используют минеральные среды Гетчинсона или Тимаковой, для анаэробов – минеральные среды Омелянского или Пфеннига, внося в качестве источника углерода и энергии фильтровальную бумагу. Пробирки инкубируют при 30°C в течение 1–2-х месяцев. Рост бактерий оценивают визуально по разложению полосок фильтровальной бумаги [6, 16].

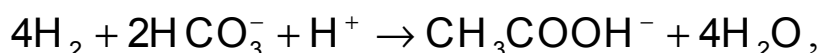
3.1.7. Ацетогенные бактерии

Одну из ключевых стадий анаэробной деградаци биополимеров в водоемах называют ацетогенной или водородной, поскольку образование ацетата сопровождается выделением большого количества водорода.

Ацетат может являться продуктом метаболизма гомоацетогенных бактерий, широко распространенных в озерных илах. Он образуется в результате анаэробного окисления ОВ сульфатредуцирующими бактериями группы А и как побочный продукт маслянокислого брожения. Продукты ацетогенной стадии деградаци ОВ далее используются метаногенами и сульфатредукторами.

Гомоацетатное брожение, единственным продуктом которого является ацетат, по существу является смешанным процессом, поскольку две молекулы ацетата дают брожение, а третья получается за счет анаэробного карбонатного дыхания, осуществляемого ферментным комплексом СО-дегидрогеназы-ацетил-КоА-синтазы, чувствительным к O₂.

Гомоацетогены могут расти автотрофно согласно реакции

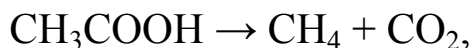


при этом водород служит донором, а углекислота – акцептором электронов, и субстратное фосфорилирование ограничено. При автотрофном росте АТФ генерируется в основном с помощью хемиосмотического механизма, сопряженного с восстановлением углекислоты до ацетил-КоА. Синтез АТФ у гомоацетогенов может осуществляться как за счет Δμ_{H⁺}, так и за счет Na⁺(Li⁺)/H⁺-антипорта.

Большинство гомоацетогенов способно к росту на одноуглеродных субстратах, в том числе СО и формальдегиде. К другим соединениям, используемым некоторыми гомоацетогенами, относятся галактозу, рибозу, глюкуроновую кислоту, глюконат, маннит, глицерин, многие спирты, органические кислоты и АК. *Acetobacterium woodii* и некоторые клостридии в присутствии СО₂ (СО) используют *o*-метильные группы большого количества метоксилированных ароматических кислот, включая ванильную, сириговую, 3,4,5-триметилбензойную, ферулиновую и другие для синтеза ацетата.

Гомоацетогенные микроорганизмы распространены во многих таксономических группах. Это представители рода *Clostridium*, например, *C. thermoaceticum*, *C. formicoaceticum*, *C. thermoautotrophicum* (растет при 70°C), а также родов *Sporomusa*, *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Acetitomaculum*, *Acetohalobium*, *Acetonema*, *Moorella*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Syntrophococcus*. Все они относятся к домену Bacteria. Среди архей и эукариот гомоацетогенов до настоящего времени не обнаружено.

Гомоацетатные бактерии широко распространены в анаэробной зоне. Это строгие анаэробы, способные перерабатывать богатый набор субстратов. Они связаны синтрофными связями с ацетокластическими метаногенами, которые проводят реакцию:



так как в пресных водоемах нет других возможностей для удаления ацетата в анаэробных условиях. Гомоацетогены также обнаружены в сточных водах и рубце жвачных животных [14, 16].

3.1.8. Маслянокислые бактерии

Маслянокислых бродильщиков относят к тем немногим группам анаэробов, которые наряду с метаногенами и сульфатредукторами имеют геохимическую значимость как деструкторы ОВ в осадках водоемов. Эту группу в основном составляют прокариоты рода *Clostridium* сем. Clostridiaceae (филум B13 Firmicutes): грамположительные бактерии с бродильным типом метаболизма, способные к образованию эндоспор. Одни виды рода строго анаэробны (*C. pasteurianum*, *C. kluyveri*), другие аэротолерантны (*C. histolyticum*, *C. acetobutylicum*). В целом клостридии могут использовать множество субстратов. Сахаролитические клостридии растут на сахаросодержащих и полисахаридных средах, протеолитические (или пептолитические) способны использовать белки и аминокислоты, пуринолитические гидролизуют нуклеиновые кислоты и сбраживают пурины и пиримидины.

В водоемах особое значение имеют сахаролитические клостридии. Среди них *Clostridium pasteurianum* сбраживает простые углеводы (глюкозу, фруктозу, сахарозу и др.). *C. butyricum* обладает амилолитической активностью, что позволяет ей использовать крахмал и другие сложные углеводы, за исключением пектина и клетчатки. *C. cellulovorans* и *C. thermocellum* сбраживают клетчатку (целлюлозу).

Типичными маслянокислыми бродильщиками являются *C. butyricum* и *C. pasteurianum*. Они сбраживают сахара с образованием масляной и уксусной кислот, CO_2 и H_2 . Превращение глюкозы до ПВК осуществляется по гликолитическому пути.

Следующая реакция – разложение пирувата до ацетил-КоА и CO_2 , сопровождается образованием восстановленного ферредоксина (Фд). Она катализируется ферментом пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой и является ключевой в маслянокислом брожении. Отличительной особенностью реакции является участие в ней FeS-белков, содержащих негемовое железо и кислотолабильную серу.

Далее восстановленный Фд поставляет электроны для восстановления N_2 , протонов (H^+), CO_2 и НАДФ^+ , а последующее превращение ацетил-КоА приводит к синтезу АТФ в реакции субстратного фосфорилирования с образованием ацетата.

Путь, завершающийся синтезом масляной кислоты, начинается в конденсации двух молекул ацетил-КоА. Он не связан с получением клеткой энергии, единственное его назначение – акцептирование электронов, переносимых на НАД^+ в процессе гликолиза.

Лабильность маслянокислого брожения, состоящего из двух основных ответвлений: окислительного, ведущего к образованию ацетата и АТФ, и восстановительного, функция которого – акцептирование водорода, образовавшегося в процессе гликолиза, затрудняет определение его энергетического выхода. Согласно расчетам, на 1 моль сброживаемой глюкозы в маслянокислом брожении образуется 3,3 моля АТФ, что больше, чем в других видах брожений.

Некоторые виды клостридий, в частности *C. acetobutylicum*, при сброживании сахаров наряду с кислотами накапливают в среде нейтральные продукты: спирты (бутиловый, изопропиловый, этиловый) и ацетон. У них маслянокислое брожение является первой фазой ацетоно-бутилового брожения. В течение второй фазы восстановительные эквиваленты переносятся на образовавшиеся кислые продукты и получают нейтральные вещества, вследствие чего рН возвращается к нормальному уровню и культура снова может развиваться. Синтез ацетоацетатдекарбоксилазы, одного из ключевых ферментов второй фазы, регулируется кислотностью среды и начинается при рН 5,0. Таким образом, смысл двухфазности ацетоно-бутилового брожения заключается в более полном использовании субстрата за счет поддержания комфортных для культуры условий.

Клостридии развиваются в нейтральной и щелочной средах, в основном являются мезофилами, но есть виды, которые растут при 75°C. Обнаружено, что *C. pasteurianum*, сбраживающие простые сахара, преобладают в илах евтрофных озер и водохранилищ (до 10⁶ кл/см³), а также в донных отложениях полисапробных зон с максимальным содержанием легкогидролизующих соединений. *C. butyricum* и *C. felsineum*, ферментирующие различные полисахариды, преобладают в мезотрофных водоемах, грунты которых формируются под влиянием аллохтонного стока и прибрежной растительности. *C. acetobutlicum*, способный усваивать не только углеводы и аминокислоты, но также лигниногумусовые соединения, достигает максимума в донных отложениях кислых хтониоэвтрофных озер [6, 8, 16].

3.2. Цикл азота

Круговорот азота в озерах представляет собой взаимную цепь реакций превращения различных форм азота [14]. Ведущая роль в осуществлении этих процессов принадлежит микроорганизмам (рис. 12). В годичном цикле сюда включаются следующие процессы: 1 – приток в водоем соединений азота с водосборной площади и с атмосферными осадками; 2 – фиксация молекулярного азота прокариотами; 3 – ассимиляция минеральных соединений азота фитопланктоном и бактериями; 4 – усвоение органического азота гидробионтами; 5 – разложение азотсодержащих органических веществ до аммиака аммонифицирующими бактериями (а) и до нитритов и нитратов при гетеротрофной нитрификации (б); 6 – окисление аммония нитрифицирующими бактериями до нитритов и нитратов; 7 – восстановление нитритов и нитратов до свободного азота денитрифицирующими (а) и нитратредуцирующими (б) бактериями; 8 – захоронение соединений азота в донных отложениях; 9 – вынос аммиачных солей и газообразных оксидов азота при щелочной реакции воды в атмосферу; 10 – деазотация, т.е. распад соединений азота иловых отложений до газообразного азота в анаэробных условиях: в отсутствие нитратов за счет деятельности анаэробных микроорганизмов.

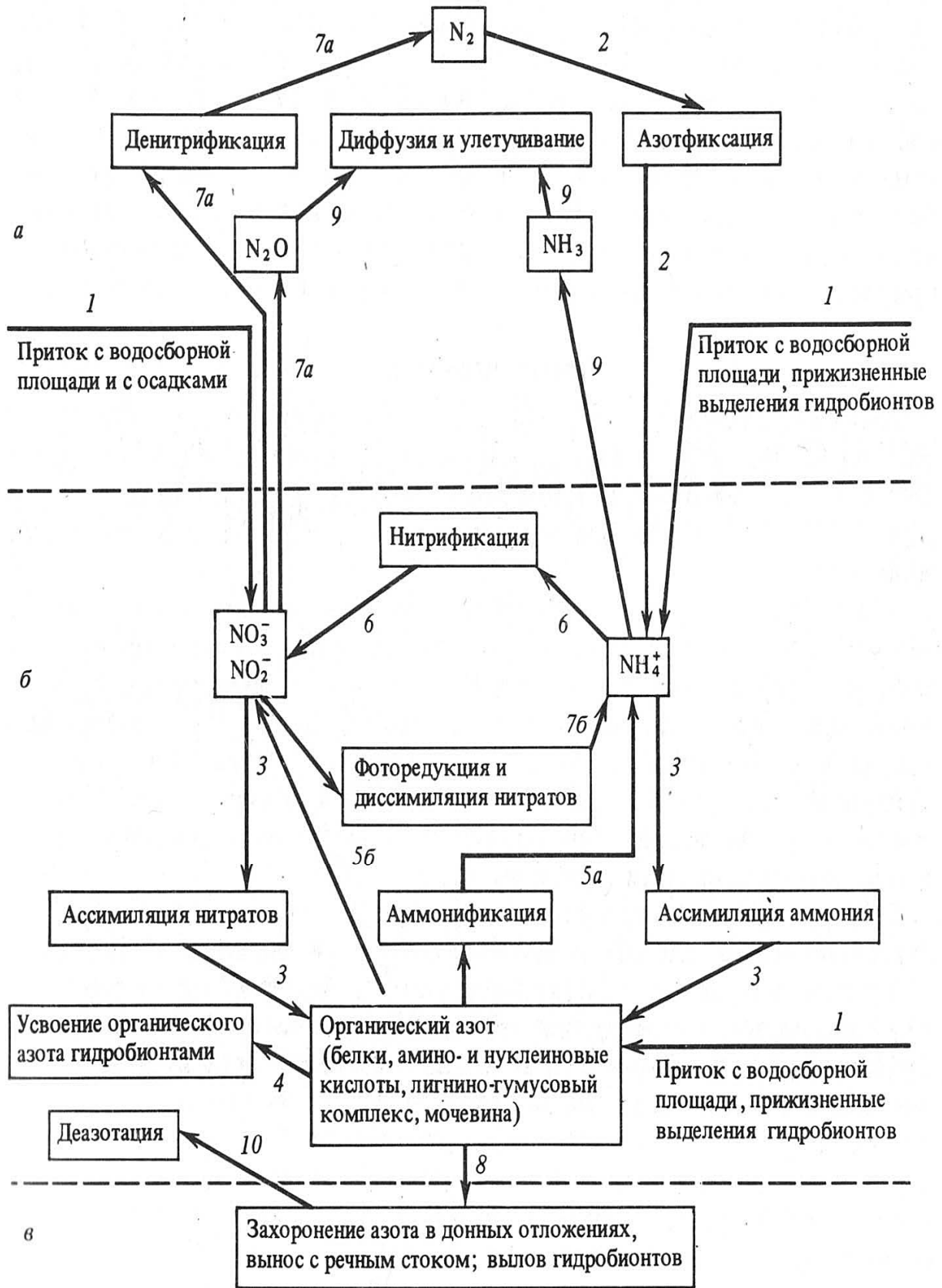
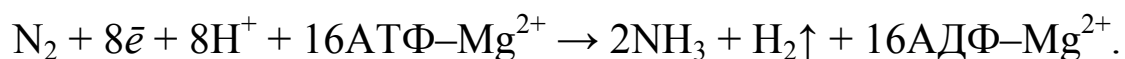


Рис. 12. Взаимосвязь процессов круговорота азота в водоемах [14]

Химические анализы газа, отобранного из различных анаэробных экосистем, где накапливается значительное количество органического вещества, показывают, что в результате анаэробного распада ОВ выделяется не только метан, но и свободный азот. Сюда относятся иловые отложения эвтрофных озер, метантенки, подземные воды месторождений и другие биотопы. Содержание свободного азота достигает 30% от общего количества выделившегося газа. Путь образования этого газа до сих пор неизвестен, но биологическая природа его несомненна и ждет своих исследователей.

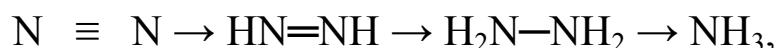
3.2.1. Азотфиксирующие микроорганизмы

Способность микроорганизмов к ассимиляции молекулярного азота обусловлена действием фермента нитрогеназы, катализирующего реакцию:



Газ азот – химически инертное и очень стабильное соединение. Чтобы разорвать тройную связь в его молекуле, требуется очень много энергии, по крайней мере, 8 электронов и 16 АТФ. На самом деле энергии затрачивается больше, поскольку часть АТФ идет на поддержание анаэробных условий. Нитрогеназы как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов чувствительны к наличию O_2 .

Нитрогеназа – мультиферментная система, в которую входят два компонента: Мо-Fe-белок и Fe-белок, одновременно необходимые для ее функционирования. У разных микроорганизмов они взаимозаменяемы. Ферредоксин всегда восстанавливается, у фототрофов в реакциях фотосинтеза, у аэробных diaзотрофов в процессе дыхания, у анаэробов в процессе брожения. Реакция фиксации азота проходит в несколько стадий:



но аммиак является первым свободным продуктом, поскольку все промежуточные метаболиты связаны с ферментом.

При фиксации азота всегда выделяется молекулярный водород. Нитрогеназа интенсивно выделяет H_2 и в отсутствие N_2 , сбрасывая электроны восстановителей. Несмотря на высокое сродство нитрогеназы к азоту, она не очень специфична и способна восстанавливать другие соединения, в частности ацетилен, что используется для определения активности фермента (рис. 13). Более чувствительным является изотопный анализ по включению в клетку нерадиоактивного стабильного N^{15} и короткоживущего радиоактивного N^{13} с $T_{1/2} \approx 0,5$ ч.

Присутствие аммония вызывает репрессию нитрогеназы, поэтому азотфиксирующие микроорганизмы выделяют на средах без связанных форм азота, при наличии микроэлементов Mo, B, Fe, Va и Mn.

В фиксации атмосферного азота в водоемах, как и в почве, принимает участие широкий круг прокариот. Представители 80 родов из 27 семейств бактерий и, по крайней мере, 3 термофильных рода архей обладают способностью к азотфиксации. Среди них в водоемах обнаруживают свободноживущих прокариот, ассоциативных азотфиксаторов бинарных синтрофных культур микроорганизмов и эпифитных бактерий.

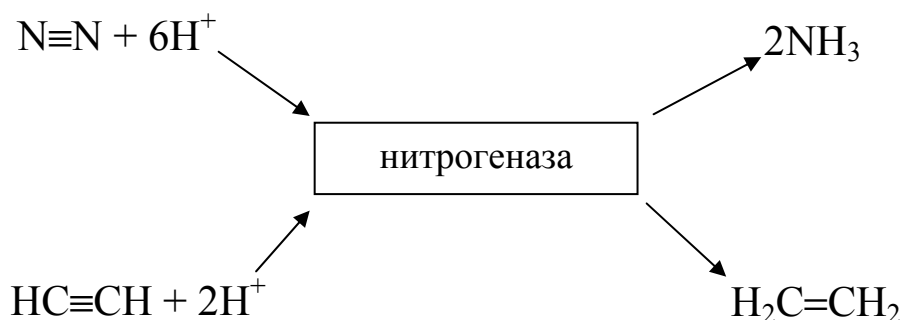


Рис. 13. Схема определения азотфиксации ацетиленовым методом

Аэробные азотфиксирующие бактерии представляют собой сборную группу свободноживущих гетеротрофных бактерий, которые способны усваивать атмосферный азот при росте на средах с органическими соединениями, лишенными азота. К ним относятся бактерии, ранее входившие в семейство *Azotobacteriaceae*: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, отличающиеся высокой скоростью азотфиксации: 10 мг N_2 /г потребленного ОВ. Спо-

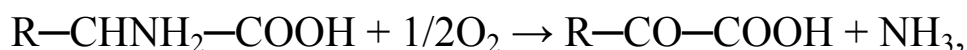
способностью к азотфиксации обладают также метилотрофы *Methylobionas*, *Methylococcus*, водородные бактерии *Xantobacter*, тионовые *Thiobacillus ferrooxidans*, бесцветные нитчатые серобактерии *Beggiatoa*, выделенные из морских местообитаний и некоторые виды рр. *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* и других. В качестве источников углерода им добавляют в среду глюкозу, крахмал, маннит, этанол или формиат в зависимости от выделяемого вида.

Анаэробную фиксацию азота в водоемах осуществляют различные виды р. *Clostridium* и факультативно анаэробные бактерии р. *Azospirillum*, некоторые сульфатредуцирующие прокариоты, энтеробактерии, пурпурные серные и несерные бактерии, некоторые виды зеленых серобактерий, очень многие цианобактерии. Для анаэробных азотфиксаторов применяют пептонно-дрожжевую среду с глюкозой. Перед посевом в среду вносят тигликолят для снижения Eh и нейтральрот. В присутствии этого окислительно-восстановительного индикатора ($rH_2=3,2$) колонии клостридий обладают золотисто-желтой флюоресценцией.

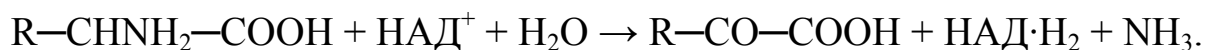
Примерно половина гетеротрофных бактерий из тех, которых удается выделить на питательных средах, способна осуществлять ассоциативную фиксацию азота. Среди них наиболее часто встречаются микобактерии и факультативные анаэробы типа *Bacillus polymyxa*. Роль стимуляторов в этом процессе выполняют бактерии *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* и др. На стандартных безазотистых средах эти микроорганизмы, как правило, не растут. Для их выделения рекомендуют минеральную среду Калининской с глюкозой, дрожжевым автолизатом и бромтимоловым синим, которую ежедневно нейтрализуют стерильным раствором NaOH. Наличие азотфиксации определяют через 2–3 недели инкубации методом Кьельдаля по приросту $N_{орг}$ в сравнении с контрольной средой [6, 12, 14, 16].

3.2.2. Аммонификаторы

Аммонификация – процесс распада белков, сопровождающийся образованием аммиака. NH_4^+ – продукт дезаминирования, т.е. отщепления аминогруппы от аминокислоты. Окислительное дезаминирование может происходить при участии молекулярного кислорода:



или с помощью НАД-зависимых дегидрогеназ:



В анаэробных условиях возможно гидролитическое дезаминирование:



Дезаминирование аминокислот в конечном итоге приводит к образованию ацетил-КоА реже других продуктов, которые могут поступать в процессы катаболизма.

Использование аминокислот в качестве источников углерода и энергии требует от организмов соответствующего набора ферментов, катализирующих гидролиз белков и пептидов и дезаминирующих весь набор аминокислот. Для аммонификаторов вообще характерно использование широкого круга ОВ, в том числе сахаров, органических кислот, которые, как правило, они предпочитают белкам. Видов, приспособленных к использованию только белков, немного.

Аммонификаторы представлены в основном грамположительными споровыми палочками р. *Bacillus*. Из бесспорных форм в эту группу входят представители рр. *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Proteus*.

В щелочной среде возможно гидролитическое дезаминирование мочевины. При участии конститутивных ферментов его осуществляют *Bacillus pasteurii*, *B. freudenreichii*, *Sporosarcina ureae*, *Proteus vulgaris* и некоторые другие. У большинства других бактерий образование уреазы подавляется аммонием и стимулируется наличием мочевины.

Учет и выделение аммонифицирующих бактерий проводят на МПБ. Выделение аммиака регистрируют с помощью индикаторов на щелочную реакцию среды.

Процесс аммонификации в быту известен как «гниение», поскольку при этом происходит накопление продуктов, обладаю-

щих неприятным запахом: сероводорода, метилмеркаптана, первичных аминов, известных под названием «трупных ядов». Роль гнилостных бактерий в природе огромна. Доля белка в тканях умерших животных и растений велика, а аммонификаторы осуществляют минерализацию белков, разлагая их в конечном итоге до CO_2 , NH_3 и H_2S [6, 14, 16].

3.2.3. Нитрифицирующие бактерии

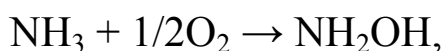
3.2.3.1. Хемолитоавтотрофы

Нитрификация – процесс образования нитратов из аммиака, происходит в две стадии:

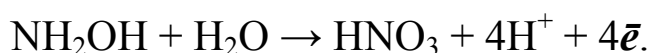


и осуществляется соответственно двумя группами организмов.

Нитрификаторы I фазы окисляют, а аммиак, который хорошо проникает в клетку, по монооксигеназному механизму:



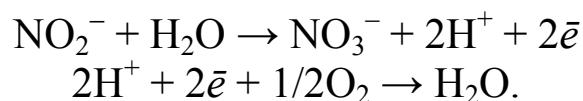
сначала с затратой энергии в виде восстановителя до гидроксидамина, затем до нитрита с получением энергии:



Образовавшиеся электроны переносятся на уровень цитохромов *b* и *c*. Клетка тратит большое количество субстрата на обратный перенос электронов для выработки НАДН, который используется при фиксации CO_2 . Именно поэтому нитрификаторы I фазы медленно растут ($g > 24$ ч), накапливают мало биомассы. Гидроксиламинооксиредуктаза находится в периплазме. С активностью этого фермента связаны активности монооксигеназы аммиака и цитохромоксидазы.

Нитрификаторы второй стадии чувствительны к повышенной концентрации NO_3^- и O_2 . При низком $\text{pH} < 5$ они диспропорционируют нитрит на нитрат и оксид азота. Если $\text{pH} \geq 7$, то микро-

организмы проводят реакции с помощью мембрансвязанной нитритоксидоредуктазы, которая содержит молибден и FeS-кластер:



Электроны переносятся на уровень цитохромоксидазы, в результате генерируется 1 молекула АТФ. Для получения 1 моля НАДН необходимо окислить 5 молей нитрита с обратным переносом электронов. Скорость второй фазы значительно выше первой, поэтому нитрит никогда в природе не накапливается.

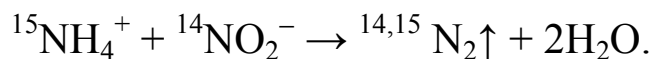
Микроорганизмы I и II фаз нитрификации – это граммотрицательные организмы, объединенные по функции, но не филогенетически. Они встречаются в разных классах *Proteobacteria* и филуме *Nitrospirae*. Для фиксации CO_2 нитрификаторы используют цикл Кальвина. Ферменты этого цикла могут быть заключены в карбоксисомы.

К нитрификаторам I фазы относятся *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, выделенные из пресных и соленых водоемов. Клетки имеют сеть развитых ВЦМ.

В группу нитрификаторов II фазы входят пресноводные бактерии р. *Nitrobacter* и морские формы рр. *Nitrospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*. Все фиксируют углекислоту в цикле Кальвина, но способны и к миксотрофному росту. Некоторые виды *Nitrobacter* могут расти гетеротрофно. Нитрификаторы II фазы обычно поселяются рядом с микроорганизмами первой стадии. В основном это неподвижные формы, образующие биопленки.

Часть нитрификаторов способна использовать ОВ (ацетат, казеин, пируват и т.д.), но преимуществ в росте не получает. Оптимальные условия для роста нитрификаторов создаются при концентрации субстрата (NH_4^+ или NO_2^-), равной 1 – 25 мМолей, рН = 8 – 8,5; температура 25 – 30°C.

Раньше считалось, что нитрификация – сугубо аэробный процесс. Однако было замечено, что в анаэробных реакторах, осуществляющих очистку стоков от соединений азота, аммоний окисляется, но лишь в присутствии нитрита:



Наличие такой реакции доказано с помощью меченых соединений и связано с работой специальной группы автотрофных бактерий, филогенетически близких к планктомицетам.

В природе нитрификаторы распространены в компостах аэротенков, в пресных водоемах, в море. В озерах нитрификаторы обнаруживаются преимущественно в поверхностном слое ила, если растворенный O_2 доходит до иловых отложений. В водной толще озер заметной величины их численность может достигать в слое металимниона, если из иловых отложений поступают заметные количества аммиака.

Для количественного учета нитрификаторов помимо культуральных методов применяют также иммунофлюоресцентный метод, который позволяет выявить нитрификаторов в 10–100 раз больше [6, 16].

3.2.3.2. Гетеротрофные нитрификаторы

Значительное число гетеротрофных микроорганизмов способно окислять азот органических и неорганических соединений. Процесс назвали гетеротрофной нитрификацией. Его осуществляют различные виды пр. *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, а также *Aerobacter aerogenes* и *Thiospira pantotropha*.

Одни представители ведут окисление аммония до промежуточных метаболитов – гидроксамовых кислот, накопление которых в среде имеет важное экологическое значение вследствие их высокой биологической активности. Другие окисляют азот аминокислот до гидроксамина и далее до нитрозо- и нитросоединений с накоплением в среде свободных нитритов и нитратов. Гетеротрофная нитрификация не приносит микроорганизмам полезной метаболической энергии. Предполагается, что она сопряжена со сбросом восстановительного эквивалента.

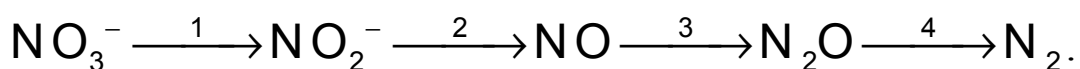
Для обнаружения гетеротрофных нитрификаторов в суспензии клеток определяют методом полярографии скорость потребления кислорода O_2 до и после введения предполагаемого субстрата гетеротрофной нитрификации. Увеличение расхода кисло-

рода указывает на способность к гетеротрофной нитрификации. Численность гетеротрофных бактерий, окисляющих аммиак, достигает в иловых отложениях 1 млн. кл/мл. Следует учитывать тот факт, что многие гетеротрофы одновременно с нитрификацией способны осуществлять и денитрификацию. В этом случае накопления нитратов в среде не происходит.

Для учета гетеротрофных нитрификаторов воду или иловые отложения высевают на агаризованный питательный агар с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. На появившиеся через 5–10 дней колонии наносят по капле реактива Грисса. Покраснение среды указывает на образование нитритов из аммония [14].

3.2.4. Денитрификаторы

Денитрификация – один из путей диссимиляционной нитрат-редукции, анаэробного дыхания с нитратом в качестве конечного акцептора электронов. В результате происходит восстановление нитратов до молекулярного азота или других газообразных продуктов по схеме:



По способности осуществлять некоторые процессы этой цепочки все денитрификаторы разделяют на пять групп. В первую группу входят микроорганизмы, осуществляющие первую реакцию, называемую нитратным дыханием. К ней относятся многие гетеротрофы и некоторые автотрофы, например *Thiobacillus thiooparus*.

Вторую группу денитрификаторов составляют микроорганизмы, осуществляющие первые три реакции: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$. В нее входят такие виды, как *Achromobacter nephrii*, *Aquaspirillum itersonii*, *Halobacterium sp.*, *Pseudomonas spp.*

Третья группа превращает нитрит в молекулярный азот, осуществляя реакции со второй по четвертую. Это виды рр. *Neisseria*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes odorans*. *Corynebacterium nephridii* восстанавливает азот нитритов либо до N_2O , либо до NO .

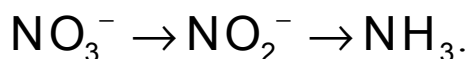
Представители четвертой группы денитрификаторов осуществляют последний этап. Ими являются *Vibrio succigenes* и *Campylobacter fetus*, причем последний способен образовывать молекулярный азот также из NO.

В пятую группу денитрификаторов, осуществляющих все этапы процесса, входят представители очень многих родов и физиологических групп.

Бактерии, способные к диссимиляционной нитратредукции, являются факультативными анаэробами и обладают полной дыхательной системой, причем синтез нитрат- и нитритредуктаз индуцируется только в анаэробных условиях, а у некоторых микроорганизмов – еще и в присутствии нитрата.

Денитрификация, как правило, протекает в анаэробных условиях, но некоторые виды способны к денитрификации в присутствии растворенного O₂. Чувствительность к кислороду у денитрифицирующих бактерий варьирует от 0% для *Paracoccus denitrificans* до 95% для *Thiospira pantotropha*. Последняя бактерия способна использовать в качестве акцепторов электронов и кислород, и нитраты одновременно за счет двух ветвей цитохромного участка дыхательной цепи.

У микроорганизмов, которые осуществляют только нитратное дыхание, нитрит может накапливаться в среде. В этом случае дальше может происходить ассимиляционная нитритредукция, не дающая энергии, но зато преобразующая NO₂⁻ в NH₄⁺, который идет на синтез азотсодержащих соединений, т.е. происходит аммонификация нитрата:



Этот процесс осуществляют микроорганизмы многих таксономических и физиологических групп. Процессы восстановления нитратов до молекулярного азота и аммиака могут происходить в водоемах одновременно. Аммонификация нитрата преобладает над денитрификацией в более глубоких слоях донных осадков, где имеется высокое соотношение NH₄⁺:NO₃⁻. При одновременном присутствии в среде нитратов и сульфатов происходит угне-

тение сульфатредукции за счет предпочтительного использования нитратов для дыхания [14, 16].

3.3. Цикл серы

Микробиологические процессы, связанные с круговоротом серы (рис. 14), можно подразделить на две основные группы:

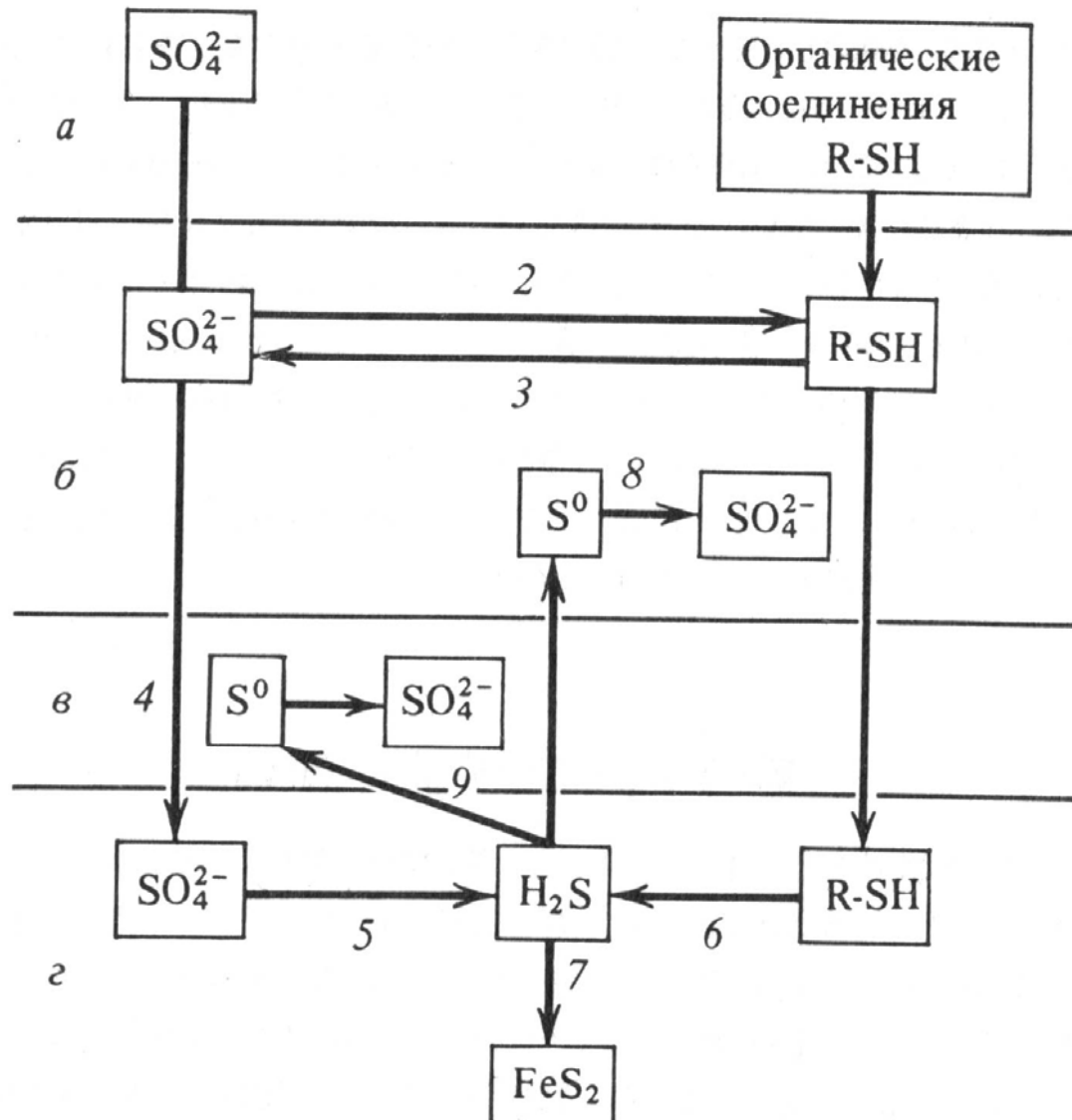


Рис. 14. Круговорот серы [14]:

- 1 – поступление в водоем, 2 – ассимиляция, 3 – минерализация,
- 4 – поступление в иловые отложения, 5 – редукция сульфатов,
- 6 – анаэробный распад органических соединений серы, 7 – захоронение,
- 8 – окисление тионовыми бактериями, 9 – фотосинтез серобактерий;

а – водосборная площадь, б – аэробная зона водоема, в – анаэробная зона,
г – иловые отложения

1) восстановление окисленных соединений серы до сероводорода,

2) окисление H_2S до S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ и SO_3^{2-} (элементарной серы, тиосульфатов и тиосульфитов) до сульфатов.

Обогащение водоема сульфатами происходит в основном за счет поверхностного стока и глубинных вод, если они проходят по пластам, содержащим отложения гипса или другие сульфатсодержащие породы.

В настоящее время известно 6 микробиологических процессов, при которых в анаэробных условиях образуется сероводород как конечный продукт биохимических реакций: сульфатное дыхание или диссимиляционная сульфатредукция; анаэробная деградация органических серосодержащих соединений гнилостными (аммонифицирующими) бактериями; диссимиляционная редукция элементарной серы; анаэробное диспропорционирование неорганических соединений серы; при анаэробном брожении фототрофных бактерий с использованием эндогенных запасных веществ; побочный продукт некоторых видов брожений.

Основными продуцентами H_2S в водоемах являются сульфатредуцирующие, сероредуцирующие и гнилостные бактерии.

3.3.1. Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ)

Сульфатвосстанавливающие бактерии – высокоспециализированная группа облигатно анаэробных бактерий различной морфологии (рис. 15), способных осуществлять диссимиляционное восстановление сульфатов до сероводорода:



Донорами электронов могут служить формиат, ацетат, H_2 , пропионат, бутират, лактат, высшие ЖК, этанол и т.д.

Сульфатредукторы группы А окисляют доноры электронов не полностью и выделяют ацетат из-за незамкнутого ЦТК обычно вследствие отсутствия 2-оксоглутаратдегидрогеназы. Сульфатредукторы группы Б окисляют ОВ до воды и CO_2 .

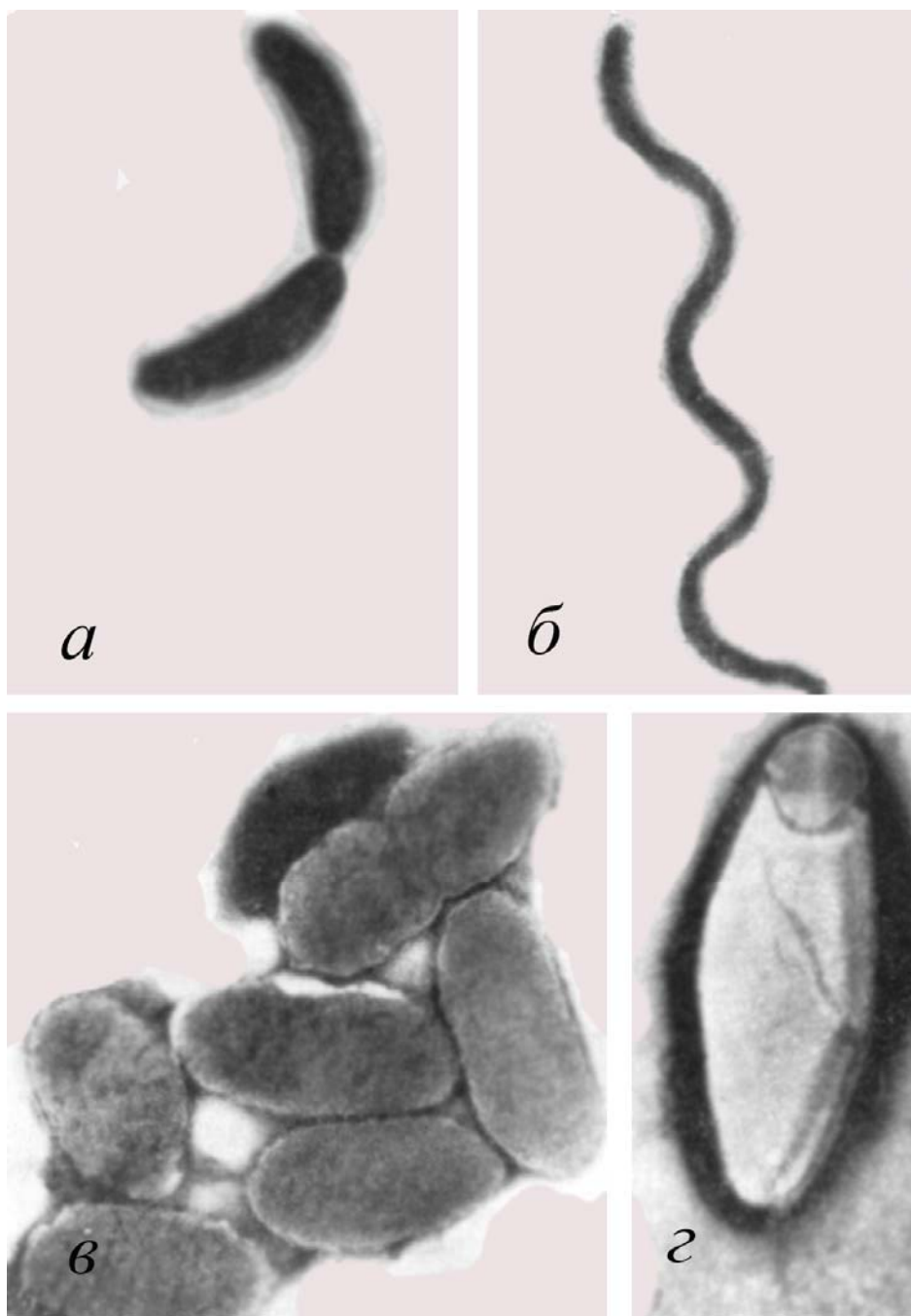


Рис. 15. Сульфатвосстанавливающие бактерии [4]:
 а – вибриоидные клетки *Desulfovibrio vulgaris* ($\times 12\ 000$),
 б – то же, спираллообразные ($\times 6\ 000$), в – *Desulfovibrio baculatus* ($\times 22\ 000$),
 г – *Desulfotomaculum* sp. ($\times 11\ 000$)

Большинство СРБ в качестве акцепторов электронов помимо сульфатов способны использовать $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} и S^0 . Незначительное число видов восстанавливают тетратионат и дитионит. Для немногих видов акцепторами электронов, кроме неорганических соединений серы, могут служить иные соединения: NO_3^- ,

NO_2^- , фумарат или CO_2 . В частности, диссимиляционная нитрат-редукция с образованием аммония в качестве конечного продукта обнаружена у *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfomonas pigra*, *Desulfovibrio desulfuricans*; а нитритредукция – у некоторых видов *Desulfovibrio*. Общее правило предпочтительного восстановления нитратов при одновременном наличии в среде SO_4^{2-} и NO_3^- справедливо и для СРБ. *Desulfovibrio gigas* способен использовать фумарат в качестве конечного акцептора электронов, а *Desulfotomaculum orientis* – CO_2 в отсутствие сульфатов. Рост последнего вида на минеральной среде со смесью водорода и углекислого газа сопровождается образованием ацетата по типу гомоацетатного брожения.

В отсутствие доступных акцепторов электронов СРБ бактерии могут сбразивать некоторые ОВ с образованием H_2 . К ним относятся пируват, малат, фумарат, реже спирты (этанол, глицерол), а также холин и серин. Известны СРБ, способные в отсутствие сульфатов сбразивать сахара.

Сульфатредуцирующие микроорганизмы являются строгими анаэробами. Однако некоторые из них аэротолерантны. Экспериментально показано, что один из штаммов *Desulfotomaculum* способен к образованию сероводорода при содержании в протоке около 1 мг O_2 /л.

СРБ обладают разнообразными метаболическими возможностями, что объясняет их широкое распространение в природе и важную роль в процессах анаэробного разложения ОВ в водоемах.

Сульфатредукторы широко распространены в таксономических группах. Среди них есть спорообразующие *Desulfotomaculum*, *Desulfonispora*, *Desulfosporosinus* и неспоровые бактерии, а также археи.

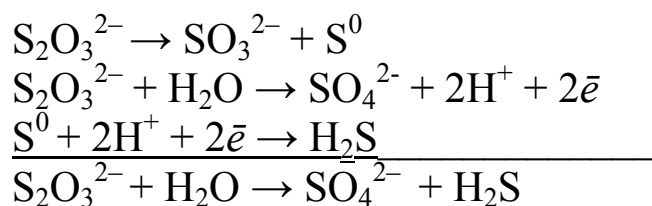
К бактериям группы А (ацетогенам) относятся рр. *Desulfobulbus*, *Desulfomonas*, *Thermodesulfobacterium* и некоторые виды рр. *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*. Их выделяют на минеральной среде с лактатом.

СРБ группы Б окисляют ОВ (ВЖК, лактат, ацетат, бензоат, сукцинат и др.) полностью, до CO_2 . Их выделяют на среде с ацетатом, иногда в сочетании с другими источниками углерода. В

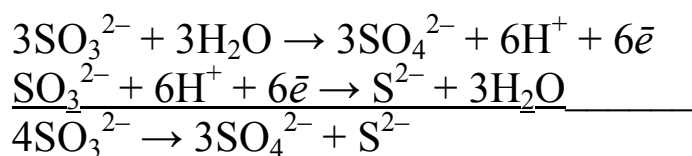
эту группу входят pp. *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* и некоторые виды pp. *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*. СРБ группы Б составляют самостоятельную филогенетическую ветвь, которая быстро пополняется новыми видами. Например, были открыты экстремально галофильный *Desulfomicobium*, экстремально алкалофильные гидрогенотрофные *Desulfonatronovibrio* и *Desulfonatronum*. Все перечисленные роды относятся к Proteobacteria.

Грамположительные споровые клостридии *Desulfotomaculum* представляют другую группу СРБ с далеко не таким жестким типом обмена. Среди них есть и умеренно термофильные виды. Экстремально термофильная сульфатредуцирующая *Thermodesulfobacterium*, в массовом количестве развивающаяся в гидротермах, не входит в те же филогенетические ветви, что перечисленные сульфатредукторы. В еще большей степени это относится к сульфатредуцирующей архее *Archaeoglobus*.

В 1987 г. было показано, что у *Desulfovibrio* и *Desulfobacter* может идти реакция диспропорционирования тиосульфата:



В том же году было установлено наличие и такой реакции:



Таким образом, сульфатредуцирующие прокариоты представляют важнейшую группу вторичных анаэробов, удаляющих 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 [6, 12, 16].

3.3.2. Сероредуцирующие бактерии

В группу сульфидогенов также входят организмы, восстанавливающие молекулярную серу. Серное дыхание может происходить в местообитаниях, связанных с вулканической деятельностью, где много абиогенной S^0 в анаэробных условиях. В отличие от диссимиляционной сульфатредукции сероредукция представляет довольно распространенное свойство среди разных групп анаэробов. К этой же группе принадлежат и многие из магнетитобразующих анаэробов с характерным родом *Geobacter*.

Типичным примером сероредукторов считается *Desulfuromonas* – подвижная палочка с латерально расположенным жгутиком. Окисляет ацетат или этанол до CO_2 , содержит низкопотенциальный цитохром c_7 , FeS-белки и ферменты ЦТК. Живет в синтрофных ассоциациях с фототрофными зелеными серобактериями, потребляющими сульфид.

Микроорганизмы, осуществляющие диссимиляционное восстановление серы, подразделяются на две большие группы. 1) Мезофильные бактерии широко распространены в донных отложениях озер и в морских лагунах. Исключением является термофильная *Desulfurella*, окисляющая ацетат, которая входит в отдельный подкласс филогенетической системы. 2) Термофильные и экстремально термофильные археи (оптимум роста $105^\circ C$), обитающие в зонах гидротермальной активности, реже в слабощелочных высокотемпературных источниках.

В группе сероредуцирующих бактерий преобладают факультативные формы, которые наряду с серным дыханием могут осуществлять нитратное, сульфатное или аэробное дыхание, как, например, *Campylobacter*, *Micrococcus lactoliticus* и *Pseudomonas mendocina*, или брожение, что свойственно сахаролитическим СРБ. К облигатным формам относят *Desulfuromonas* шт. NZ 27.

Среди архей к облигатным сероредукторам относят pp. *Thermoproteus*, *Thermophilum*, *Pyrodictium*. Облигатные формы наряду с серным дыханием могут осуществлять брожение аминокислот (*Desulfurococcus mucosus*, *D. mobilis*, *Thermococcus celler*), полисахаридов (*Desulfurococcus amylophilicus*) или с образованием метана. Ряд видов: *Desulfurolobus ambivalens*, *Acidianus brierley*, *Acidotherma infernus* – является факультативными анаэробами, ко-

торые могут окислять водород, серу или органические кислоты кислородом воздуха.

Количественный учет сероредуцирующих микроорганизмов осуществляют на стерильной жидкой среде без сульфатов с S^0 или полисульфидом в качестве источника серы [12, 14].

3.3.3. Гнилостные бактерии, образующие сероводород

Образование H_2S при минерализации ОВ в анаэробных условиях происходит за счет распада сульфгидрильных групп белка. Эти процессы осуществляются при участии неспецифических гетеротрофных бактерий – аммонификаторов (п. 3.2.2). Их выделяют на МПА с ацетатом свинца в анаэроостате. Рост бактерий улучшается, если свинец заменяют окисью висмута. Вокруг колоний, выделяющих сероводород, образуется бурое или черное кольцо сульфида металла. Под действием аммонифицирующих микроорганизмов H_2S образуется везде. В аэробной зоне он попадает в сферу действия микроорганизмов, окисляющих серосодержащие соединения [14].

Традиционно организмы, окисляющие восстановленные соединения серы, подразделяют на две группы: 1) окисляют сероводород и откладывают элементарную серу в виде капель внутри клеток; 2) никогда серу внутри клеток не откладывают.

3.3.4. Бесцветные собственно серобактерии

К первой группе относятся морфологически своеобразные микроорганизмы: представители родов *Beggiatoa**, *Thiothrix**, *Thioploca*, *Thiospirillopsis*, *Achromatium*, *Thiobacterium*, *Macromonas**, *Thiospira*, *Thiovulvum*, *Bilophococcus**. Это грамотрицательные бесцветные бактерии, растущие на средах с H_2S , откладывающие серу в клетках, которая затем может использоваться для окисления после исчерпания сероводорода. Некоторые микроорганизмы движутся с помощью скольжения или жгутиков. Представители рр. *Achromatium* и *Thiobacterium* – неподвижны, многие образуют нити и чехлы. Клетки *Macromonas* достигают длины 100 мкм.

Бесцветные собственно серобактерии тяготеют к микроаэрофилии, растут на границе аэробной и анаэробной зон. Обладают отрицательным свето- и аэротаксисом, некоторые имеют магнитосомы. Только для отдельных представителей четко установлен тип метаболизма, поскольку лишь в четырех из десяти родов (отмечены *) получены чистые культуры. Выделение затруднено из-за того, что в слизистых чехлах часто растут микробы-спутники, от которых трудно избавиться. Считается, что они – гетеротрофы или миксотрофы, склонные к олиготрофии. Предельная концентрация органических кислот для роста бесцветных нитчатых серных бактерий – 20 мМ (для ацетата это 1,2 г/л). Растут в зоне хемоклина стратифицированных озер, образуют налет на донных осадках. Оптимальная концентрация кислорода для роста 0,6 – 6,0%. Формируют бактериальный фильтр на поверхности раздела фаз, не пропуская H_2S в атмосферу. В зоне “черных курильщиков” иногда формируются монокультуры *Beggiatoa*, а первичная продукция ОВ в этом случае обеспечивается за счет хемолитоавтотрофии. Также серные бактерии участвуют в образовании матов толщиной до 60 см и диаметром до 32 м, где толстые и длинные клетки *Beggiatoa* служат структурообразующим элементом [6].

3.3.5. Хемолитотрофные сероокисляющие (тионовые бактерии)

Вторая группа (тиобациллы) представлена наиболее изученными родами *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, окисляющими сероводород до образования сульфата. В основном это аэробы. В анаэробных условиях они проводят серозависимую нитратредукцию, но существовать без кислорода могут короткий период, активно покидая такие местообитания. Микроорганизмы первых двух родов отличаются по отношению к рН: тиобациллы растут при слабокислых значениях рН, а ацидитиобациллы – при $pH < 4,0$ (до 1,5). Большинство представителей этой группы – мезофилы, имеющие широкое распространение. Обитают они в почвах, соленых болотах, в зоне термоклина стратифицированных озер, в сольфатарах, там, где на выходе горячих серных источников на поверхности образуются желтые осадки элементарной серы, в сточных водах, в кислых шахтных водах ($pH 2,5-1,5$).

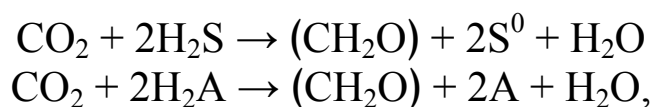
При температуре выше 50°C серу окисляют археи (*Sulfolobus*, *Acidianus*) или представители рода *Sulfobacillus*.

В настоящее время установлен факт развития *Acidithiobacillus ferrooxidans* на Fe³⁺ и S⁰ за счет анаэробного дыхания [12, 16].

3.3.6. Фотосинтезирующие бактерии

Анаэробное окисление восстановленных соединений серы, наконец, осуществляют фотосинтезирующие бактерии в процессе аноксигенного фотосинтеза. В основном к ним относятся пурпурные бактерии, а также зеленые серные и зеленые несерные бактерии. Прокариоты, осуществляющие фотосинтез, сгруппированы в отдельные кластеры на филогенетическом древе. Систематическое и филогенетическое положение фототрофных прокариот более подробно рассмотрено.

Для включения CO₂ в клеточный материал фототрофным бактериям необходима энергия АТФ и восстановленные эквиваленты. У них нет компонентов фотосистемы II, как у зеленых растений и цианобактерий, поэтому они не могут использовать H₂O в качестве экзогенного донора электронов. Фототрофные бактерии в качестве экзогенных доноров электронов используют H₂S, S₂O₃²⁻, S⁰, молекулярный H₂ и некоторые ОВ. Суммарные уравнения аноксигенного фотосинтеза соответственно при фотолитотрофном и фотогетеротрофном метаболизме выглядят следующим образом:



где CO₂ выполняет функцию акцептора водорода, H₂S или ОВ является донором водорода, углевод биомассы – восстановленный акцептор, а элементарная сера или органическое вещество А – окисленный донор водорода.

3.3.6.1. Пурпурные бактерии

Пурпурные бактерии относятся к классам Alpha-, Beta- и Gammaproteobacteria. Это достаточно разнородная группа.

Сем. Chromatiaceae включает микроорганизмы, способные к автотрофии и откладывающие элементарную серу внутри клеток. В качестве доноров электронов для фотосинтеза они используют H_2S и S^0 и могут расти автотрофно. Фотосинтетические пигменты – Бхл *a*, *b* и каротиноиды четырех типов.

Сем. Ectothiorhodospiraceae также используют H_2S и S^0 и могут расти автотрофно, но элементарную серу откладывают вне клеток. Среди них много морских и алкалофильных видов.

Порядки Rhodospirillales, Rhodobacteriales, Rhodocyclales объединяют так называемые пурпурные несерные бактерии, которые не накапливают серу внутри клеток и растут преимущественно фотогетеротрофно. В микроаэрофильных и аэробных условиях они способны расти в темноте.

Все пурпурные бактерии являются одноклеточными, но могут образовывать устойчивые агрегаты в виде диплококков, тетрад, сеточек, табличек и т.п. Клетки разной формы и размеров. Есть неподвижные и имеющие жгутики. Ряд водных форм содержат газовые вакуоли. Подвижные виды обладают активным фототаксисом. Размножаются бинарным делением или почкованием. Некоторые могут образовывать цисты или экзоспоры. Клеточная стенка грамотрицательного типа, покрыта слизистым слоем или капсулой, у некоторых представителей имеется S-слой из гексагонально расположенных белков. В качестве запасных веществ у них обнаружены поли- β -гидроксиалканоаты и гликоген. Синтез бактериохлорофиллов подавляется кислородом, но может идти в темноте. Из переносчиков у пурпурных бактерий обнаружены цитохромы, FeS-белки и тиоредоксины, убихиноны и менахиноны.

Предпочитают расти на свету в анаэробных условиях, к росту в темноте способны в основном пурпурные несерные бактерии. Для большинства представителей необходима высокая интенсивность света (~500 лк), только р. *Amoebobacter* требует низкой освещенности (50–100 лк) при пониженных температурах роста. Большинство видов мезофилы, психроактивные организмы включают *Amoebobacter* и *Lamprocystis*, а термофильные виды относятся к родам *Halorhodospira*, *Rhodocista*, *Thermochromatium*. Экстремальных термофилов среди пурпурных бактерий не обна-

ружено. В основном это нейтрофильные микроорганизмы (рН 6 – 8), но есть кислото- (*Rhodobacter acidiphila*) и щелочелюбивые (*Ectothiorhodospira*, *Halospira*). Эти же роды содержат экстремально галофильных представителей, синтезирующих осмопротекторы (глицин-бетаин, эктоин, трегалозу).

Пурпурные несерные бактерии нуждаются в витаминах, пурпурные серные – прототрофы. Используют широкий спектр соединений азота, многие способны к азотфиксации. Источниками углерода могут быть углекислый газ и ОВ (в том числе C₁-соединения). Для *Thiocapsa* и *Chromatium* показан хемолитоавтотрофный рост с молекулярным водородом и сульфидом в качестве доноров электронов. При автотрофном росте СО₂ фиксируется в цикле Кальвина, активность которого подавляется добавлением органики. В темноте роль ОВ как источника энергии увеличивается, происходят брожения разного типа. Энергия может также получаться путем анаэробного дыхания с сульфатом, нитратом, серой, Fe³⁺, СО и органическими соединениями в качестве акцепторов электронов. Сахара используют через гликолиз или КДФГ-путь. Имеют полный или незамкнутый ЦТК и глиоксилатный шунт. У ряда пурпурных несерных бактерий (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*) без глиоксилатного шунта обнаружен цитрамалатный цикл.

Пурпурные бактерии – это в основном водные микроорганизмы. Развиваются обычно в бескислородных водах с Н₂S, куда проникает свет, в редких случаях обнаруживаются на больших глубинах. Пурпурные несерные бактерии предпочитают богатые органикой воды и болотистые почвы, при этом редко образуют скопления, придающие воде окраску. Иногда развиваются в прибрежных морских водах.

Пурпурные серные бактерии, наоборот, создают видимые скопления в прозрачных водоемах на границе анаэробной зоны. Такие слои лучше формируются в меромектических (с более высокой придонной соленостью) или в голомиктических (с сезонной стратификацией) водоемах и по берегам морей в лиманных областях. В прибрежных зонах морей могут образовывать «красные приливы». Представители *Ectothiorhodospira* тяготеют к соленым и щелочным местообитаниям, морским эстуариям. В гло-

бальном круговороте серы функционально тесно связаны с сульфатредукторами.

Для пурпурных бактерий отмечено сосуществование аналогичных видов в одном и том же слое водоема за счет разобщения их активностей во времени. Например, *Chromatium okenii* и *C. vinosum* различаются по константе сродства и скорости окисления сульфида. В периодической культуре второй организм вытесняет первый, а в природе они сменяют друг друга в течение суток: утром, когда сульфида много, *C. okenii* быстро окисляет сероводород, концентрация которого снижается, вечером *C. vinosum* начинает медленно окислять малые количества H_2S , а первый микроорганизм рост прекращает [4, 16].

3.3.6.2. Зеленые бактерии

Зеленые серные бактерии – это филогенетически однородная группа строго анаэробных микроорганизмов, осуществляющих аноксигенный фотосинтез. Филум Chlorobi включает рода *Chlorobium*, *Ancalochloris*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon* и *Prosthecochloris*.

Большинство – фотоавтотрофы, использующие H_2S и S^0 в качестве доноров для фотосинтеза. Содержат Бхл *a*, *c*, *d*, или *e* и каротиноиды циклического типа. Светособирающие пигменты находятся в хлоросомах (хлоробиум-везикулах). Хлоросомы покрыты белковой оболочкой и прикреплены к внутренней стороне ЦПМ базальной пластинкой.

Это грамотрицательные организмы, неподвижные или скользящие палочки, вибрионы или нити, не содержащие внутрицитоплазматических мембран. Многие имеют простеки, которые увеличивают всасывающую и светособирающую поверхности. Некоторые содержат газовые вакуоли. Накапливают в клетках гликоген, а элементарную серу откладывают снаружи. Из переносчиков электронов обнаружены цитохромы *c* и *b*, а также менахиноны. облигатные анаэробы и фототрофы. Основное число видов – мезофилы и нейтрофилы, ряд форм относится к галотолерантным. По отношению к интенсивности света делятся на две группы: первая требует высокой освещенности, а вторая существует на глубинах до 80 м при очень слабом освещении. Некото-

рым необходим витамин В₁₂. Микроорганизмы предпочитают соли аммония, так как лишь у немногих есть способность к ассимиляционной нитратредукции. Нуждаются в восстановленных соединениях серы, так как ассимиляционная сульфатредукция у них отсутствует. Имеют незамкнутый ЦТК, глиоксилатного шунта нет. ОВ используют ограниченно. Анаэробные функции в этих случаях выполняют многочисленные реакции карбоксилирования. Ассимиляция СО₂ происходит через цикл Арнона, или восстановительный ЦТК. Он считается анаэробным циклом, поскольку включает много ферментов и восстановителей (ферредоксинов), которые чувствительны к О₂ (из аэробных бактерий таковой обнаружен только у *Hydrogenobacter*). Общая формула ассимиляции имеет вид



Ассимиляция углекислоты в этом цикле идет с большой затратой АТФ и восстановительных эквивалентов.

Зеленые нитчатые (несерные) бактерии филогенетически далеко отстоят от зеленых серных бактерий и имеют следующее таксономическое положение: филум Chloroflexi, пор. Chloroflexales, сем. Chloroflexaceae, которое включает pp. *Chloroflexus*, *Chloronema* и *Heliothrix*, и сем. Oscillochloridaceae с единственным родом *Oscillochloris*.

Зеленые несерные бактерии имеют палочковидные клетки, собранные в нити с чехлами или без них, передвигаются скольжением и обладают рядом таксисов. Некоторые имеют газовые вакуоли. Запасают поли-β-гидроксиалконоаты и полиглюканы. КС содержат значительные количества ненасыщенных и неразветвленных ЖК. Вспомогательные пигменты представлены β-, γ-каротином или миксобактином. Фотосинтетический аппарат локализован в хлоросомах и ЦПМ. Из переносчиков найдены цитохромы *b*, *c*, менахиноны 8 и 9, FeS-белки. Бхл синтезируют на свету и в темноте, но в отсутствие О₂. Представители этой группы требуют для фотосинтеза высокой интенсивности света, донорами при фотосинтезе могут быть Н₂S и Н₂. Способны к фотоавтотрофии, но предпочитают фотогетеротрофный образ жизни.

Имеют полный ЦТК и глиоксилатный шунт и могут использовать широкий набор ОВ. Среди зеленых несерных бактерий есть мезо- и термофильные формы. Растут при pH 7,0–9,0; некоторые требуют повышенной концентрации NaCl (5–12% по массе). Отдельные представители нуждаются в наборе витаминов. Азот потребляют в виде солей аммония и органических соединений. Все зеленые несерные бактерии обладают значительной толерантностью к H₂S. *Chloroflexus* способны к ассимиляционной сульфат-редукции. У зеленых несерных бактерий обнаружен необычный цикл фиксации CO₂ – гидроксипропионатный путь с суммарным уравнением:



У отдельных штаммов *Chloroflexus* имеется и более простой цикл – восстановительный цикл дикарбоновых кислот. У ряда организмов, не имеющих гликсилатного шунта, при росте на органических субстратах эти пути могут играть роль анаэробных реакций.

У представителей рода *Oscillochloris* показана фиксация CO₂ в цикле Кальвина и азотфиксация.

Следует отметить, что для многих представителей этого филума вопрос о способе питания и метаболических путях остается открытым, поскольку выделение нитчатых организмов в чистые культуры представляет значительную трудность из-за существования в их слизистых чехлах микроорганизмов-спутников.

Фототрофные микроорганизмы часто образуют настолько устойчивые симбиозы, что им присваивают латинское название как индивидуальному организму. Например, “*Chlorobium aggregatum*” состоит из одной большой нефототрофной клетки и 12–20 мелких палочек зеленых серных бактерий *Chlorobium limicola*. Симбионты синхронно делятся. Зеленые бактерии могут быть выделены в чистую культуру, а большой микроорганизм – нет.

Зеленые серные бактерии редко образуют скопления. Они растут в илах в зоне хемоклина под слоем пурпурных бактерий. С глубиной зеленые виды замещаются коричневыми. Для них характерно образование консорциумов на основании синтрофии по

сероводороду. Зеленые несерные бактерии предпочитают горячие серные и пресные воды.

Интересным макрообразованием является циано-бактериальный мат. В его состав входят цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии, а также сульфатредукторы. Такие ассоциации обычно развиваются в горячих кислых источниках и достигают толщины 4–5 см. Типичная структура циано-бактериального мата толщиной около 1 см слоистая: первый (верхний) слой – это цианобактерии (обычно ярко-зеленого цвета), второй слой – пурпурные бактерии, третий слой – зеленые бактерии (между вторым и третьим слоями могут находиться бесцветные слои из *Beggiatoa* и *Flexibacter*). Это зона хемоклина с отложениями элементарной серы. Четвертый слой составляют СРБ, а ниже могут обитать метаногены. В качестве спутников во всех слоях могут существовать тионовые бактерии и метилотрофы. Нижележащие слои, как правило, мертвые, литифицированные. Маты, в составе которых не обнаружены эукариотные организмы, считают реликтовыми. Возможно, эти сообщества сформировали современную атмосферу, так как газы, поднимаясь со дна и проходя через мат, существенно изменяли свой состав. В гиперсоленых сообществах образуются строматолиты, литифицированные ассоциации, сформировавшиеся за счет отложения нерастворимых веществ и дошедшие до наших дней в виде окаменелостей [4, 16].

3.4. Цикл фосфора

Особенностью цикла фосфора является то, что он принадлежит к осадочному типу, поскольку летучих соединений фосфора в природе не существует (рис. 16).

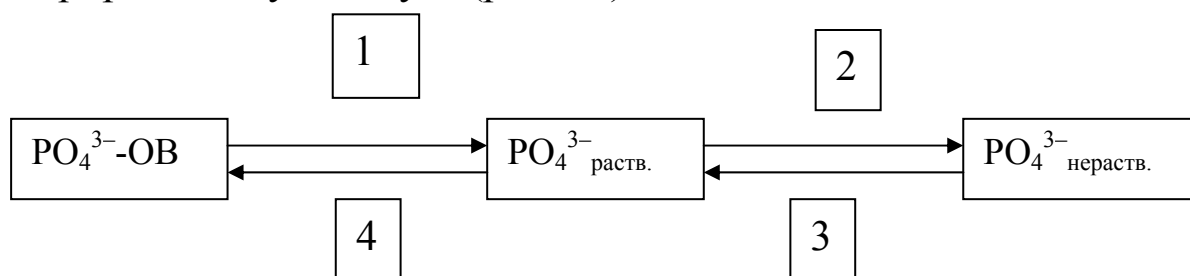
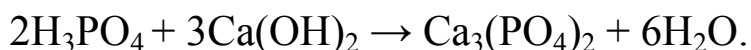


Рис. 16. Цикл фосфора, управляемый реакциями микробной трансформации

Фосфор находится в связанном (иммобилизованном) состоянии либо в виде органических веществ, либо в виде нерастворимых фосфатов. Перевод его в подвижную минеральную форму осуществляется, таким образом, двумя путями: при минерализации ОВ (1) или растворении пород (3). 2 – химический процесс связывания ортофосфорной кислоты с основаниями, в результате чего образуются трудно растворимые соли Ca, Mg, Fe, например:

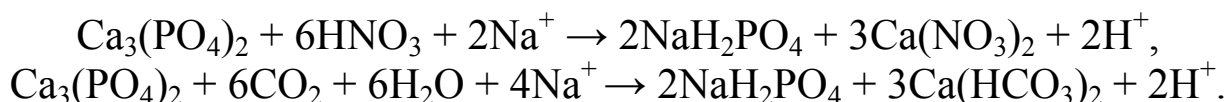


4 – процесс ассимиляционного поглощения минерального фосфора растениями.

Основная часть запасов фосфора в водной среде находится в органическом виде, в котором он может передаваться по трофическим цепям.

Отмершие ткани животных и растительных организмов, физиологические выделения человека и животных содержат фосфор, связанный с белками и липидами. Минерализация фосфора «фосформобилизующими» микроорганизмами из этих соединений происходит под действием фосфатаз, которыми обладают многие сапротрофы, например, псевдомонады. Активность фосфатаз регулируется концентрацией фосфора в среде. В экосистемах с избыточным поступлением фосфора количество микроорганизмов, способных мобилизовать фосфаты, снижается.

Растворение фосфора, т.е. перевод его нерастворимой формы в форму, доступную растениям, происходит в результате биохимических процессов, осуществляемых бактериями, метаболизм которых приводит к образованию кислот. В кислой среде трудно-растворимые фосфорнокислые соли переводятся в растворимые соединения, легко усвояемые растениями.



К числу «фосфатрастворяющих» бактерий относятся тионовые, нитрифицирующие, серобактерии, аммонификаторы, которые образуют большие количества CO_2 . Кислые продукты мета-

болизма микроорганизмов (органические кислоты, азотная и серная кислоты) растворяют фосфат Са, а образованный ими сероводород растворяет фосфаты Fe.

Известно, что в озерах различной трофности динамика численности фосформобилизующих и фосфатрастворяющих микроорганизмов идентична. Их развитие определяется динамикой численности фитопланктона, интенсивностью продуцирования и распределения органических и неорганических соединений фосфора. Поскольку содержание фосфора велико, мобилизующая способность гетеротрофов ярко выражена. Численность фосформобилизующих примерно равна гетеротрофам. В озерах с высоким содержанием минерального фосфора конкуренцию выигрывает фитопланктон.

В конечном итоге фосфорсодержащее живое вещество отмирает и подвергается минерализации в процессе биологической деградации ОВ (см. рис. 16). При этом образуется минеральный фосфор, биологически подвижная форма, с помощью которой происходит обмен между различными компонентами водной среды. Микроорганизмы, в этом участвующие, называют фосформобилизующими [2, 15].

3.5. Цикл железа и марганца

Железо и марганец относятся к металлам с переменной валентностью, что во многом определяет их огромную роль в геохимических процессах в водоемах.

Марганец более устойчив к химическому окислению O_2 и более подвижен геохимически. Он относится к первой группе подвижных элементов наряду с К, Na, Са и Mg, а Fe – к четвертой группе наряду с Al и Ti. Окисление Mn^{2+} с заметной скоростью возможно лишь при $pH > 8,5$. Железо в ионной форме неустойчиво в окислительной обстановке при $pH > 4,5$. Вследствие этого в аэробной зоне оно находится в виде комплексоорганических соединений, чаще с гуминовыми кислотами.

Fe и Mn поступают в водоемы с водосборной площади в виде взвесей и в растворенной форме. В результате процессов химического и биологического окисления нерастворимые оксиды металлов в виде взвеси поступают в донные отложения. Здесь при уча-

стии микроорганизмов происходит их восстановление с образованием подвижных форм в виде карбонатов. Последние мигрируют к поверхности грунта или выше в водную толщу, подвергаются вторичному окислению при участии микроорганизмов, переходя во взвесь.

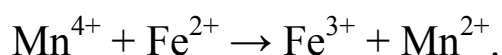
В зависимости от кислородного режима водоема окисление Fe^{2+} и Mn^{2+} происходит в поверхностном слое грунта в олиготрофных водоемах или в зоне хемоклина. Обобщенная картина круговорота железа в континентальных водоемах приведена на схеме (рис. 17).

3.5.1. Микроорганизмы, восстанавливающие металлы

Восстановление Fe и Mn осуществляется факультативно анаэробными и аэробными микроорганизмами. Биохимические механизмы восстановительных реакций могут быть различными.

1) Для многих организмов восстановление Fe и Mn обусловлено взаимодействием оксидов металлов с восстановленными продуктами метаболизма (H_2S ; вещества, содержащие тиоловые группы; некоторые аминокислоты; щавелевая кислота; гидроксилламин; слизи и др.).

Кроме того, Mn^{4+} легко восстанавливается до Mn^{2+} с участием H_2O_2 и в результате окислительно-восстановительных реакций типа



Неспецифические процессы восстановления Fe и Mn легко протекают в аэробных условиях за счет органических продуктов аэробного метаболизма при участии очень многих гетеротрофных микроорганизмов: актиномицетов, микроскопических грибов, различных бактерий.

2) Редукция марганца у железобактерий рр. *Leptothrix*, *Metallogenium*, *Arthrobacter* обусловлена действием H_2O_2 , выделяющейся при окислении ОВ.

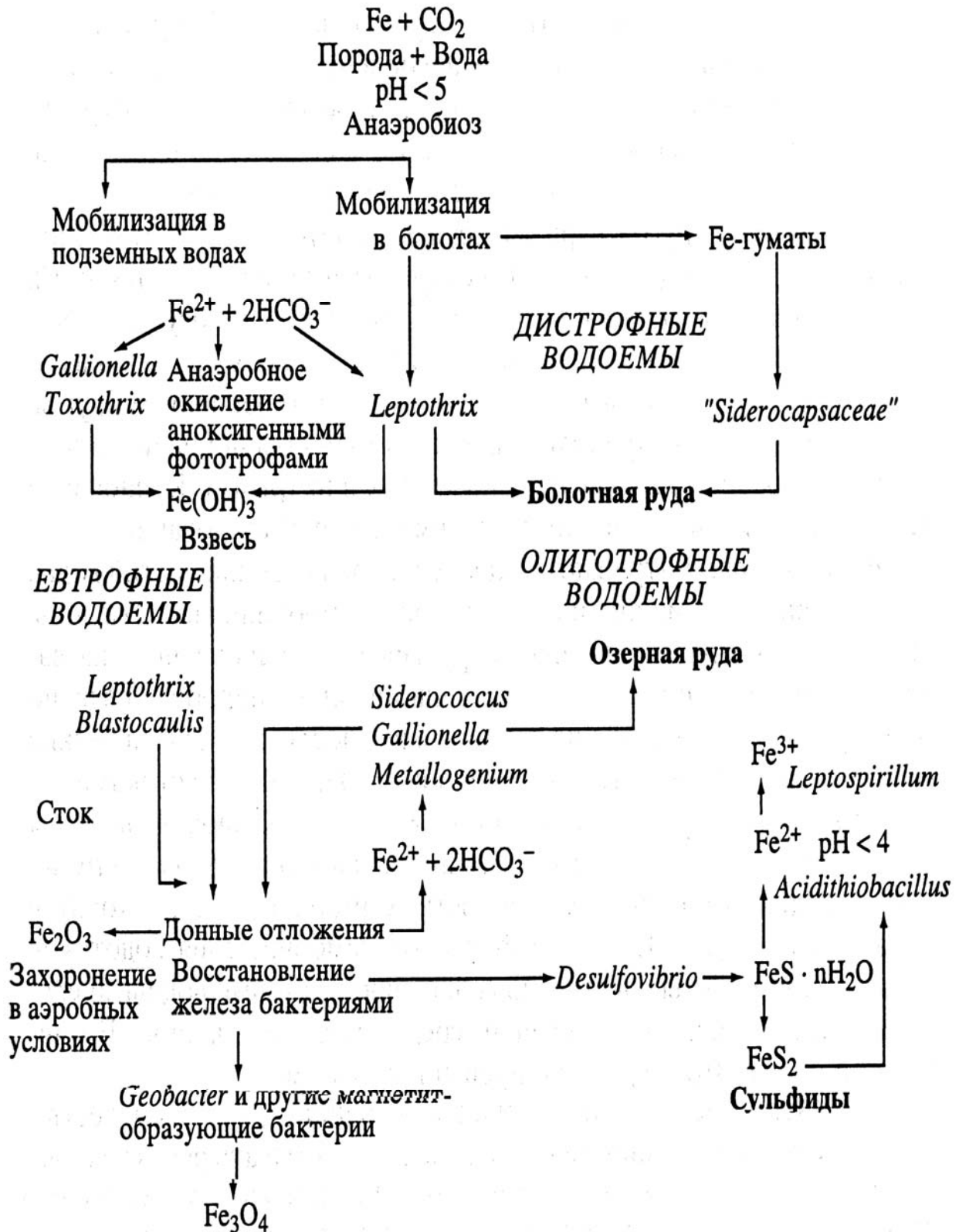


Рис. 17. Обобщенная схема круговорота железа в континентальных водоемах [12]

3) Ферментативные процессы редукции оксидов Fe и Mn связаны с использованием акцепторов электронов при анаэробном дыхании литотрофных *Thiobacillus thiooxidans* и *T. ferrooxidans*, водородных *Paracoccus denitrificans*, гетеротрофных *Bacillus cereus*, *B. polymixa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas denitrificans*, сульфатредуцирующих *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfotomaculum denitrificans*. При использовании Fe^{3+} в качестве акцепторов электронов накопление биомассы бактерий происходит пропорционально количеству восстановленного железа.

Следует отметить, что многие бактерии в анаэробных условиях наряду с Fe^{3+} способны восстанавливать оксиды высшей валентности целого ряда металлов: Cu^{2+} , Mn^{4+} , Pb^{4+} , Sn^{4+} , As^{4+} , U^{6+} , V^{3+} , Mo^{6+} , Cr^{6+} и Se^{6+} . Подобная способность обнаружена не только у гетеротрофных бактерий, но и у *Veilonella* при автотрофном окислении H_2 .

Культура *Alteromonas putrifaciens*, выделенная из озерного ила, помимо MnO_2 в качестве акцепторов электронов в анаэробных условиях может использовать Fe^{3+} , NO_3^- , $S_2O_3^{2-}$, фумарат. Высокая численность *A. putrifaciens* установлена в верхней части бескислородной зоны Черного моря. Предполагается, что способность к восстановлению марганца широко распространена среди гетеротрофных бактерий.

4) У бродильщиков *Clostridium sticklandii*, *Bacteroides hypermegas*, *Vibrio* sp. восстановление железа происходит в результате сброса избытка электронов. В этом случае восстановление Fe^{3+} не сопровождается увеличением биомассы относительно контроля [14].

3.5.2. Окисление железа и марганца микроорганизмами

Способность окислять соединения Fe^{2+} и Mn^{2+} присуща многим прокариотным организмам, принадлежащим к различным таксономическим группам и обладающим различными типами обмена веществ.

1) С.Н. Виноградский впервые применил термин “железобактерии” для обозначения организмов, использующих окисление Fe для ассимиляции CO_2 , т.е. способных существовать хемолитоав-

тотрофно. Сейчас эту группу относят к “истинным” железобактериям, в которую включены облигатно ацидофильные виды, использующие Fe^{2+} в качестве энергетического материала. Наряду с облигатно хемолитоавтотрофными в нее входят и многие гетеротрофные бактерии.

2) Другую группу составляют микроорганизмы, окисляющие Fe и Mn при нейтральной и слабощелочной реакции среды. Представители этой группы широко распространены в водоемах и с их деятельностью связано образование железо-марганцевых конкреций в пресноводных и морских водоемах.

3.5.2.1. Облигатно ацидофильные железобактерии

Облигатно ацидофильные железобактерии участвуют в окислении Fe^{2+} в кислых железистых источниках, кислых озерах, в зонах активного вулканизма, но в наибольших масштабах их деятельность проявляется в рудных месторождениях. Их рост происходит при $pH < 4,5$; оптимальным, как правило, является интервал pH 2–3. Интересно подчеркнуть, что виды р. *Sulfolobus* могут развиваться в широких пределах pH (1–7) при окислении серы. Но за счет окисления Fe^{2+} их рост возможен только при $pH < 3,5$. Это связано с особенностями функционирования дыхательной цепи видов р. *Sulfolobus* при окислении железа.

Окисление Fe^{2+} культурой *Thiobacillus ferrooxidans* также сопровождается определенными физиологическими особенностями: отсутствием переноса протонов через мембрану, транспортируются только электроны; градиент протонов по обе стороны мембраны создается за счет поглощения H^+ из цитоплазмы, что возможно только при низкой pH среды; синтез АТФ происходит за счет движения протонов из внешней среды в цитоплазму через АТФ-синтазный комплекс за счет pH как движущей силы. Для синтеза 1 моля АТФ необходимо окисление не менее двух молей Fe^{2+} .

Образование восстановителя происходит за счет энергозависимого обратного переноса электронов. Активность участка дыхательной цепи, обеспечивающего обратный перенос электронов, на порядок ниже активности цитохромного участка, функционирование которого приводит к получению энергии. Это и опреде-

ляет низкие биосинтетические способности и низкий выход биомассы бактерий при окислении Fe^{2+} . Для фиксации 1 моля CO_2 в цикле Кальвина окисляется более 22 молей Fe^{2+} .

Большинство хемолитоавтотрофных и хемолитогетеротрофных бактерий, получающих энергию при окислении железа, обладают способностью к окислению соединений серы. В эту группу входят виды *Thiobacillus ferrooxidans*, *Sulfolobus solfatarius*, *S. brierleyi*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, “*Metallogenium*”. Исключение составляет лишь *Leptospirillum ferrooxidans*, узкоспециализированная облигатно хемолитотрофная ацидофильная железобактерия и неидентифицированные термотолерантные штаммы. Для обнаружения железоокисляющих бактерий в природных образцах воды и ила используют иммунофлюоресцентный анализ [12, 14].

3.5.2.2. Бактерии, окисляющие железо в нейтральной и щелочной средах

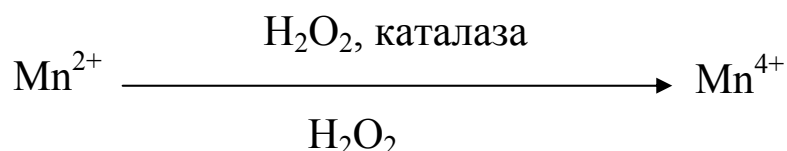
Способность к окислению железа и марганца с отложениями оксидов этих металлов на поверхности клеток широко распространена среди многих групп прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Ею обладают как классические железобактерии pp. *Leptothrix*, *Sphaerotilus*, *Gallionella*, *Metallogenium*, *Ochrobium*, *Siderocapsa*, так и другие грамположительные и грамотрицательные бактерии (более 20 родов): *Seliberia*, *Hyphomicrobium*, *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Aquaspirillum*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Streptomyces*. Способность к образованию ожелезненных чехлов наподобие *Leptothrix* обнаружена при росте в микроаэробных условиях у нитчатых фототрофных бактерий pp. *Chloronema*, *Chloroflexus*. Обильное накопление оксидов железа наблюдают у одноклеточных фототрофов *Amoebobacter* и *Thiocystis*. Окисление Fe и Mn осуществляется многими видами цианобактерий и микроскопических водорослей, многими микроскопическими грибами.

При исследовании типичных железобактерий установлено, что окисление металлов при нейтральных и щелочных значениях pH у них не связано с получением энергии. Механизм накопления оксидов металлов клеткой включает процессы как биологической

природы (окисление), так и небиологические (сорбционные), которые локализованы в чехлах или капсулах полисахаридной природы. Например, у мутантов *Leptothrix* и *Sphaerotilus*, лишенных чехлов, накопления оксидов Mn не происходило. В нейтральной и щелочной средах проявляются сорбционные свойства полианионных компонентов полисахаридного матрикса чехлов и капсул. Сама способность к биосинтезу внеклеточных капсул полисахаридной природы может стимулироваться двухвалентными ионами тяжелых металлов, в том числе Fe^{2+} и Mn^{2+} . Экзополимеры играют важную роль в образовании бактериальных пленок обрастания твердых субстратов в донных отложениях. Формирование подобных обрастаний лежит в основе нарастания слоев оксидов металлов при образовании конкреций.

Нижний предел концентраций Fe^{2+} и Mn^{2+} в природных водах, при котором возможна их сорбция на поверхности бактериальных клеток составляет доли мкг/л, а коэффициент накопления достигает значений 10^6 – 10^7 , что на 2–4 порядка выше значений, известных для активных химических сорбентов.

В основе биологических процессов окисления сорбированных металлов лежит перекисный механизм:



В культурах *Leptothrix* и *Siderocapsa* наряду с окислением Mn^{2+} пероксидом при участии каталазы может протекать противоположная реакция – восстановления MnO_2 , т.е. избыток пероксида водорода приводит к растворению образующихся оксидов металла. Направленность процессов взаимодействия H_2O_2 с соединениями Mn в конечном итоге определяется скоростью образования пероксида и активностью каталазы. Эти факторы контролируются концентрацией РОВ в водоеме, а также физиологическим состоянием микроорганизма.

Согласно имеющимся данным, численность этих организмов в водоемах может достигать 70–90% общего содержания бактериопланктона.

Выделение неспецифической группы железо- и марганецокисляющих бактерий, которые накапливают оксиды металлов на поверхности, проводят на элективных средах, которые должны содержать небольшое количество ОВ, небольшие концентрации ионных форм Fe и Mn в виде малорастворимых комплексоорганических соединений. Колонии накапливают либо желто-оранжевые оксиды Fe или бурые оксиды Mn. Для определения локализации процесса в природных образцах осадков применяют рентгеноструктурный анализ [12, 14].

4. ПРОДУКЦИОННО-ТРОФИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ БАКТЕРИЙ В ВОДОЕМАХ

Оценка роли бактерий в продуктивности водных экосистем включает определение общей численности, биомассы и продукции бактерий; их горизонтального и вертикального распределения, их сезонной динамики. Указанные показатели анализируют одновременно с оценкой элементов баланса ОВ в воде: его образования за счет фотосинтеза водорослей, поступления аллохтонного ОВ со стоком; принос ОВ течениями и т.п. Совокупность определяемых параметров позволяет решить вопросы о вкладе бактерий в продуктивность водной экосистемы, об источниках энергии для создания бактериальной продукции, об обеспеченности пищей животного населения водоема и получить ценную информацию о структуре и функции водной экосистемы [19].

4.1. Количественные характеристики бактериальной продукции

Общую численность бактерий в воде определяют путем прямого подсчета числа клеток под микроскопом на окрашенных препаратах, полученных либо на стеклах (по методу Виноградского-Брида), либо на мембранных фильтрах (по Разумову). Все другие подходы (методы максимальных разведений и разливок, метод счета колоний на плотных бактериальных средах) дают лишь относительные величины численности специализированных клеток гетеротрофных бактерий, способных расти на искусственных средах. Такие микроорганизмы составляют лишь проценты или доли процентов от общего числа бактериальных клеток в природной воде или донных осадках. Поэтому получающиеся величины при учете численности бактерий этими методами обычно в десятки и сотни раз ниже величин, получаемых методом прямого микроскопирования, чувствительность которого можно увеличить с применением эпифлюоресцентной микроскопии.

Биомассу бактериопланктона (B , г/мл) рассчитывают исходя из общего числа бактерий ($N_{\text{общ.}}$, КОЕ/мл), среднего объема их клеток (v , мкм³) и их плотности (ρ , г/см³) по формуле:

$$B = N \cdot v \cdot \rho.$$

Для расчета сухой биомассы имеют в виду, что она составляет 15% от сырой. Другой способ оценки биомассы бактерий в воде был разработан для морских условий и заключается в расчете биомассы по содержанию АТФ. Это соединение, являясь универсальным источником энергии в организмах, присутствует только в живых клетках. Его можно обнаружить методом билюминесценции и измерить с помощью фотоэлектронного умножителя в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} мг/л. Оказалось, что в водных бактериях АТФ составляет 0,4% от их сухого веса. Определив содержание АТФ в бактериях, сконцентрированных из проб воды на мембранных фильтрах, можно рассчитать биомассу.

Продукцию бактерий (P) определяют по удельной скорости их размножения (μ) в изолированных пробах с помощью формулы:

$$P = dB/dt = \mu B,$$

где μ – удельная скорость роста, определяемая по уравнениям:

$$\mu = (\ln B_t - \ln B_0)/t \text{ или } \mu = (\ln N_t - \ln N_0)/t,$$

в которых $B_0(N_0)$ и $B_t(N_t)$ – биомасса (общая численность) бактерий в начальный и конечный моменты времени соответственно.

Время, за которое происходит одно деление всех клеток в популяции, называют **временем генерации** (g). Если бактерии размножаются бинарным делением, то

$$g = \ln 2 / \mu = t \cdot \ln 2 / (\ln B_t - \ln B_0) = t \cdot \ln 2 / (\ln N_t - \ln N_0).$$

Для определения продукции время инкубации должно быть равно времени, в течение которого происходит достоверное увеличение биомассы бактерий. Оно примерно соответствует эмпирически определенному времени генерации для водоемов разной трофности.

По рекомендациям специалистов, летом для эвтрофных озер оно должно составлять 1–6 ч, для мезотрофных – 6–8 ч и для олиготрофных – 24–48 ч. Весной и осенью при низких температурах время инкубации изолированных проб удлинится в несколько раз.

P/B-коэффициент характеризует оборачиваемость бактериальной массы или удельную скорость синтеза ОВ единицей биомассы (ед. времени⁻¹) в течение длительного промежутка времени. *P/B*-коэффициент измеряется в тех же единицах, что и μ , но не тождественен ей, поскольку

$$P = \mu B_{жс}, \text{ где } B = B_{жс} + B_{м}, \text{ откуда } P/B = \mu B_{жс} / (B_{жс} + B_{м}).$$

Когда говорят о *P/B*-коэффициенте, имеют в виду средние скорости за существенный промежуток времени: не менее суток, вегетационный период (сезон), год, т.е. реально измеряют среднюю величину *P/B*, которая равна удельной скорости роста только при $\mu = const$. В целом *P/B*-коэффициент позволяет судить об интенсивности оборота ОВ в водоеме.

Пищевая ценность бактерий для водных беспозвоночных определяется как методом длительного содержания животных на бактериальном корме, так и в кратковременных опытах с учетом потребления и усвоения вещества бактериями животными. Для измерения величин потребления и усвоения бактериями животными широко используются изотопные методы.

Скорость выедания бактерий (G , мг/л) измеряют путем сопоставления продукции бактериопланктона в отсутствие зоопланктона и скорости размножения бактерий в параллельном опыте с зоопланктоном.

В пробе воды, освобожденной от зоопланктона путем фильтрации через планктонную сеть (газ № 76) или предварительный мембранный фильтр определяют $\mu_{ист.}$, т.е. ту удельную скорость, с какой бы могли размножаться бактерии в отсутствие консументов.

В пробе с зоопланктоном изменение биомассы (b) отражает разницу между продукцией бактериопланктона и его выеданием консументами, поэтому

$$(b_t - b_0)/t = P - G,$$

поскольку в этой пробе $P = \mu_{уст} \cdot b_0$, то в конечном итоге

$$G = \mu_{уст} \cdot b_0 - (b_t - b_0)/t.$$

В.И. Романенко предложил определять скорость выедания бактерий непосредственно после добавления в изолированную пробу воды антибиотика – ингибитора размножения бактерий (*). Тогда

$$P = 0, \text{ а } G = (b_0^* - b_t^*)/t.$$

Если параллельно поставить пробу без ингибитора роста бактерий, то можно определить P , исходя из того, что

$$P - G = (b_t - b_0)/t, \text{ а } P = (b_t - b_0)/t + (b_0^* - b_t^*)/t.$$

4.2. Место бактерий в трофической сети водоема

В фотической зоне водоема реализуется трофическая цепь пастбищного типа, когда энергия, заключенная в продукции фотосинтеза (первичная продукция), передается через растительно-ядных животных хищному зоопланктону, который в свою очередь служит источником пищи для рыб. Там, куда не проникает свет, возможно функционирование только пищевых цепей детритного типа. Они начинаются от мертвого ОВ и идут к микроорганизмам, которые ими питаются, а затем к детритофагам и их хищникам. В детритных цепях первичными консументами являются бактерии. Продукция, создаваемая консументами, называется вторичной. По уровню первичной продукции водоемы делят на олиготрофные, мезотрофные и эвтрофные. Эти термины отражают то, что продукция возрастает с увеличением содержания в воде питательных веществ (табл. 4).

Таблица 4

Показатели первичной и бактериальной продукции
в водоемах различного трофического статуса [19]

Показатели	Статус водоема		
	Эвтроф- ные	Мезотроф- ные	Олиготроф- ные
Продукция фотосинтеза, г/м ² /сут (г/м ³)	2 – 8	0,5 – 2	(0,1 – 0,5)
Численность бактериопланкто- на, кл/мл	2 – 6·10 ⁶	0,8 – 2,0·10 ⁶	0,1 – 0,5·10 ⁶
Масса бактериопланктона, г/м ³	2 – 5	0,5 – 1,5	
Продукция бактериопланктона, г/м ³ /сут	2 – 4	0,4 – 1,2	0,01 – 0,10
Численность бактерий бентоса, кл/мл (кл/г)	4 – 6·10 ⁹ (10·10 ⁹)	0,5 – 3·10 ⁹	
Биомасса бактерий, г/л при толщине слоя ила в 1 см	5 – 15	0,3 – 2,0	0,1 – 0,3
Продукция бактерий, г/м ² /сут	10	2	0,1 – 0,3
Биомасса бентоса, г/м ²	10 – 100	2 – 10	0,2 – 2,0

В природных условиях трофические цепи переплетаются друг с другом, образуя сложную сеть. Рассмотрим схему потоков энергии в экосистеме Рыбинского водохранилища (рис. 18), которая суммирует результаты 4-летних комплексных научных исследований ИБВВ РАН (п. Борок).

Если посмотреть на баланс классической пастбищной цепи, то окажется, что только 20% первичной продукции этого мезотрофного водоема выедается инфузориями и зоопланктоном. Остальная часть энергии, заключенная в продукции фотосинтеза, поступает в трофическую цепь через бактериальное звено. Каким образом происходит реализация этого процесса и почему первичная продукция не может полностью выедаться животным населением?

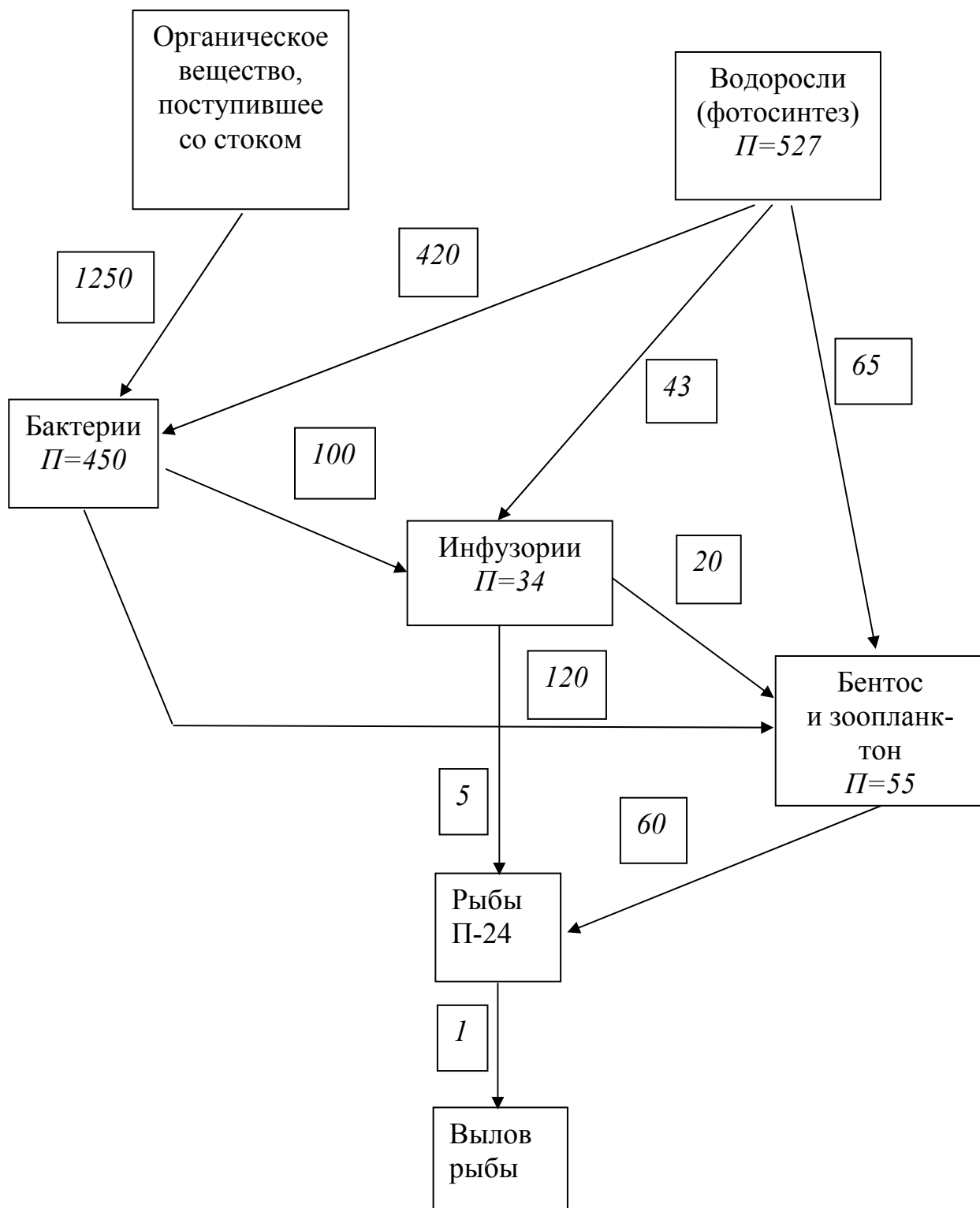


Рис. 18. Схема потоков энергии (ккал/м²) в экологической системе Рыбинского водохранилища: П – продукция; цифра в квадрате – потребляемая пища (рацион)

Дело в том, что 95% первичной продукции образуют виды прибрежных макрофитов, несъедобные для животных. Массовые виды фитопланктона водохранилища представлены диатомовыми (*Melosira*, *Asterionella*) и сине-зелеными водорослями (*Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Anabaena*). Эти виды водорослей ввиду их малой съедобности для сравнительно мелкого фильтрующего зоопланктона водохранилища дают массовые цветения. Все они растут в виде колючих колоний, размеры которых намного больше размеров самих рачков. Поэтому основная масса первичной продукции поступает в пищевую цепь детритного типа после отмирания фитомассы. Неслучайно первый пик массы бактерий ($2\text{--}3 \text{ г/м}^3$) в Рыбинском водохранилище связан с отмиранием диатомовых, а второй с отмиранием сине-зеленых водорослей. Однако расчет материального баланса все равно не сходится при учете образования бактериальной массы в результате деструкции растительного детрита [19].

Изотопными методами было показано, что прижизненные выделения фитопланктона и макрофитов составляют 20–30% общей продукции их фотосинтеза. Основным продуктом выделения – гликолевая кислота легко усваивается микроорганизмами. Оказалось, что в период массового развития фитопланктона в Рыбинском водохранилище для поддержания определенного уровня бактериальной продукции вполне достаточно одних прижизненных выделений водорослей. Более того, прямые опыты с зоопланктоном в водохранилище, выполненные с применением ^{14}C , показали, что тонкие фильтраторы (дафнии и босмины) используют РОВ водорослей через промежуточное бактериальное звено с высокой эффективностью: продукция животных составила около 10% от исходного количества выделенного при фотосинтезе РОВ.

Таким образом, был открыт дополнительный путь поступления продуктов фотосинтеза в пастбищную трофическую цепь, который назвали «микробной петлей». Учет аналогичных дополнительных путей поступления растворимых экзометаболитов в трофическую сеть водоема восполняет дефицит материального баланса, а схема переноса вещества и энергии в водоеме приобретает уточненный вид (рис. 19).

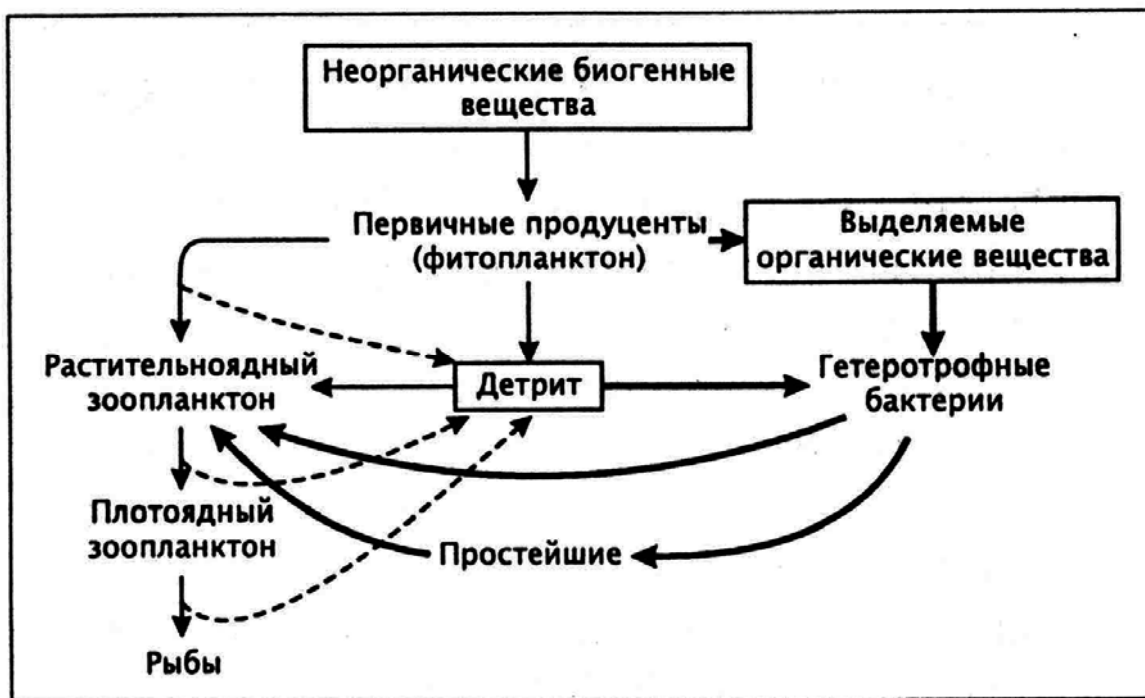


Рис. 19. Пищевая сеть в экосистеме пресноводного озера [18]:

Сплошные тонкие линии показывают классическую пищевую цепь от первичных продуцентов через вторичные продуценты до рыб. Штриховые линии отображают детритную пищевую цепь, сплошные жирные линии – “микробную петлю”. Органические выделения и детрит служат основными источниками питания гетеротрофных бактерий

Следует отметить, что эффект летования и внесения органических удобрений в рыбохозяйственные пруды основан на интенсификации бактериальной продукции как основного (наряду с растениями) источника питания кормовой фауны пруда. Основным потребителем бактериальной массы в прудах являются массовые виды прудового зоопланктона: дафнии (*Daphnia magna*, *D. pulex*), босмины (*Bosmina coregoni*), коловратки.

Результаты подсчета рационов животного населения Рыбинского водохранилища показали, что вся бактериальная продукция выедается в основном инфузориями, которые затем поедались хищным зоопланктоном [19].

4.3. Бактерии как пища водных животных

Пищевая ценность бактерий определяется их химическим составом, который по содержанию С, N, H, O и зольных элемен-

тов приближается к фито- и зоопланктону, а также мышцам рыб и человека. Бактериальная масса содержит все необходимые питательные вещества (% сухой массы): белки – 13–80, жиры – 2–30 и углеводы – 30. Кроме того, биомасса бактерий содержит витамины, ферменты и другие БАВ. Микроорганизмы – источники витаминов для беспозвоночных, которые передают их по пищевой цепи рыбам. Доказательством этому является обнаружение у ряда рыб (леща, сома, судака, трески, лосося, осетра и др.) витамина В₁₂, который синтезируется только микроорганизмами.

Пищевая ценность микроорганизмов неодинакова. Более питательными является азотобактер, дрожжи, некоторые энтеробактерии. Азотобактер синтезирует такой же комплекс витаминов В и в тех же количествах, что и дрожжи, а кроме того, витамин В₁₂. Не могли использоваться водными животными в качестве пищи лишь единичные виды непигментированных бактерий, например, *Serratia marcescens* и нитчатые железобактерии, обладающие грубыми чехлами.

Факторы, определяющие возможность потребления бактерий водными животными. Концентрацию бактериопланктона и степень его агрегированности изучал Ю.И. Сорокин с сотрудниками с использованием радиоуглеродного метода ¹⁴С [19]. Показано, что многие массовые виды пресноводного зоопланктона способны отфильтровывать единичные бактериальные клетки размером не выше 2 мкм.

К тонким фильтраторам относят большинство мирных кладоцер (дафнии, босмины, симоцефалы, сиды). В мезо- и эвтрофных водоемах, где ОЧБ составляет 1,3–3,0·10⁶ кл/мл, они полностью удовлетворяют свои пищевые потребности за счет бактерий. Суточный рацион дафний при питании бактериями составляет 50–100% от веса их тела и соответствует их рациону при питании фитопланктоном. Таким образом, в мезо- и эвтрофных водоемах бактерии могут служить основным видом пищи для тонких фильтраторов, в олиготрофных – дополнительным источником питания к фитопланктону.

В морях к тонким фильтраторам относятся кладоцеры (пенилии), аппендикулярии, личинки иглокожих и велигеры моллюсков, полихеты и губки. Бактериопланктон при концентрации

близкой к естественной $0,2-1,0 \text{ г/м}^3$ может полностью удовлетворять их пищевые потребности. Для многих тонких фильтраторов бактериопланктон является более важным источником питания, чем фитопланктон.

Грубые фильтраторы потребляют в основном крупные бактериальные клетки и бактериальные агрегаты. Естественный бактериопланктон содержит до 30% агрегированных бактериальных клеток в виде хлопьев размером 5–8 мкм. Наряду с этим значительная часть планктонных микроорганизмов, находящаяся на поверхности взвешенных частиц, легко поглощается грубыми фильтраторами.

Оптимальная концентрация бактериопланктона для грубых фильтраторов составляет в среднем $3-6 \text{ г/м}^3$, что встречается лишь в высокопродуктивных водоемах, поэтому в пресных водоемах бактериопланктон служит для грубых фильтраторов чаще дополнительным к фитопланктону источником питания. Усвояемость беспозвоночными вещества бактерий составляет 50–80%, что измеримо и даже выше усвояемости планктонных водорослей.

Большинство фильтрующих морских животных относится к грубым фильтраторам: растительноядные рачки (калянусы, эвфаузииды), пластинчатожаберные моллюски, асцидии, полипы кораллов, некоторые актинии. Для них бактериальная масса является важным резервом питания. В случае одинаковых концентраций бактерио- и фитопланктона бактериопланктон составляет 30–50% суточного рациона. Даже хищные рачки *Euchaeta marina* частично потребляют бактериопланктон.

Наиболее ценным в питательном отношении является взвешенное органическое вещество (ВОВ) – детрит, которое скапливается в прибрежной зоне и в придонных слоях воды. Детрит образуется в результате отмирания планктонных организмов и при распаде фекалий животных. Каждая частица детрита представляет собой сложное сообщество огромного количества бактерий разных физиологических групп (до $45 \cdot 10^9$ кл/г сырой массы детрита) с водорослями, простейшими и коловратками. Обитателями детрита, прежде всего, являются аммонификаторы и микроорганизмы, разрушающие целлюлозу и пектиновые вещества; кроме того, азотобактер, серобактерии, дрожжи, грибы. Бактерии, насе-

ляющие частицы детрита, питаются не только веществом самой частицы, но и РОВ окружающей среды. В детрите происходит непрерывное выделение пузырьков газа, поэтому частицы детрита находятся во взвешенном состоянии, прежде чем опуститься на дно («морской снег», «озерный снег»). Переваривая детрит, животные в основном усваивают находящиеся в нем бактерий и простейших. Установлено, что некоторые моллюски используют в пищу ОВ микроорганизмов, а мертвое вещество выбрасывается наружу с фекалиями.

Запасы детрита минимальны в малопродуктивных высокогорных озерах, максимальны в высокопродуктивных слабопроточных водоемах тропических и субтропических областей. В реках их также много: до нескольких мг детрита/л воды. Запасы детрита в Мировом океане составляют миллионы миллиардов тонн. Доля живого ОВ детрита в виде бактерий составляет около 47%.

Многие донные животные такие, как брюхоногие моллюски, черви, голотурии, амфиподы, и некоторые рыбы (личинки рыб, взрослые особи белого леща) питаются детритом, оседающим на поверхность грунта. Так, рацион личинок воблы и белого леща на 46% представлен бактериями. Как фильтрующие, так и детрито-ядные беспозвоночные имеют совершенные морфологические приспособления для улавливания и сортировки взвешенных и осажденных пищевых частиц до 1 мкм.

Интенсивность фильтрации у беспозвоночных чрезвычайно высока и составляет 0,4–0,8 м³/г биомассы. Подсчеты показывают, что весь объем Мирового океана морские фильтраторы пропускают за несколько лет. Таким образом, водные бактерии сами по себе и в составе детрита являются существенным компонентом кормовой базы гидробионтов, в том числе рыб (рис. 20).

Рис. 20 еще раз показывает, как развиваются события в пастбищной цепи экосистемы Рыбинского водохранилища. Первый пик массы бактерий (2–3 г/м³) связан с отмиранием диатомовых, второй с отмиранием сине-зеленых водорослей. Вслед за максимумами биомассы бактерий следуют пики биомассы инфузорий (9 г/м³). Последующее появление массы мелкого животного корма обеспечивает богатую кормовую базу для личиночных стадий веслоногих рачков. Вскоре вслед за вспышкой развития инфузо-

рий резко возрастает численность взрослых стадий циклопов, которые служат в свою очередь кормовой базой для подрастающей молоди рыб [19].

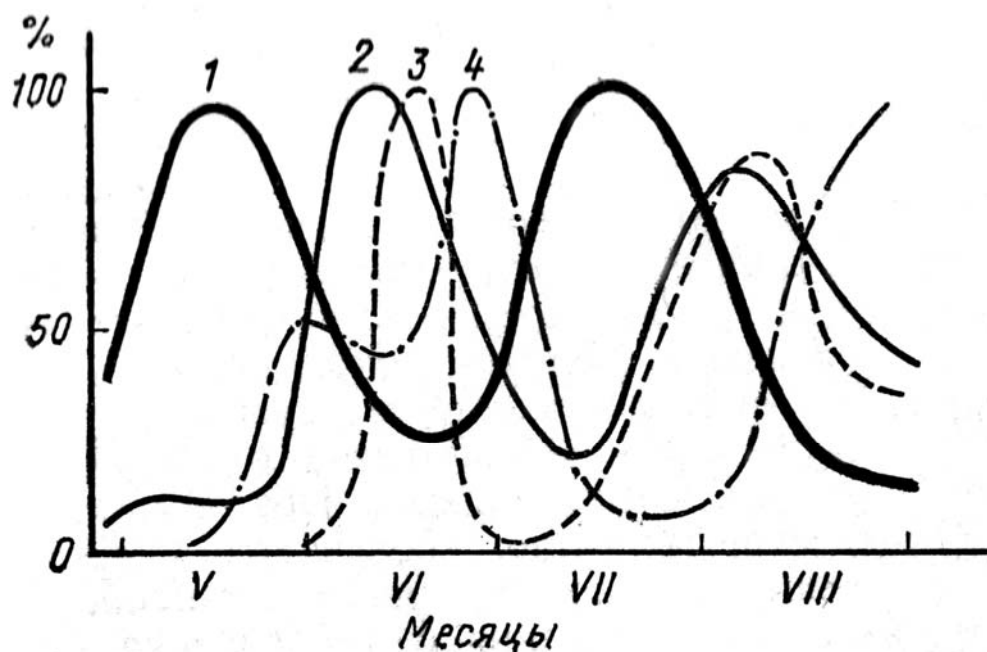


Рис. 20. Сезонные изменения продукции фитопланктона (1), биомассы бактерий (2), инфузорий (3) и сетного зоопланктона (4) в Волжском плесе Рыбинского водохранилища (% от максимальной величины)

Возвращаясь к схеме потоков вещества и энергии в Рыбинском водохранилище (рис. 18), следует обратить внимание на соизмеримость величин первичной и бактериальной продукции, что говорит о существовании дополнительного источника ОВ, которое поступает в водоем. Расчеты и прямые определения показали, что за период вегетации на 1 м^2 окисляется бактериями примерно 200 г внешнего (аллохтонного) ОВ, поступившего в водоем с водосборной площади. Окисление этого вещества создает дополнительную бактериальную продукцию. Поскольку количество аллохтонного ОВ превышает в 2,4 раза первичную продукцию водохранилища, то оно является существенным источником загрязнения водной экосистемы, а его окисление бактериями — одним из первых этапов самоочищения водоема.

5. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В САМООЧИЩЕНИИ ВОД

5.1. Краткая характеристика загрязнения водоемов

Поступление аллохтонного ОВ часто превышает собственную продукцию водоемов и поэтому определяет их **первичное загрязнение**. К естественной аллохтонной органике, которая поступает в водоемы с береговым смывом и пыльными бурями, добавились стоки предприятий и населенных пунктов.

Поверхностный сток с площади водосбора содержит вымываемые из почвы органические и минеральные вещества, микроорганизмы, в том числе физиологические выделения человека и животных. В период паводка часть прибрежной полосы вместе с растительным покровом затопляется. Процесс этот сопровождается интенсивным распадом остатков растений, в результате чего в водоем поступает значительное количество ОВ.

Вдобавок как пресные, так и морские водоемы испытывают огромную нагрузку **промышленными и бытовыми сточными водами**. С очищенными стоками городской канализации в водоем попадают недоокисленные органические соединения (в основном трудноокисляемые), взвешенные частицы активного ила и целый ряд неорганических соединений, к числу которых относятся соединения биогенных элементов (азота и фосфора), соли тяжелых металлов, сульфаты, хлориды и т.д.

Особую опасность для водоема представляют сточные воды промышленных предприятий. Характер загрязнений, вносимых в водоем с производственными стоками, крайне разнообразен. Одни из них, такие как цианиды, соединения мышьяка, фенолы, являются ядами для гидробионтов. Другие, например, клетчатка и лигнин (непременные компоненты стоков целлюлозных комбинатов), сами не токсичны, но разложение их в водоеме, особенно анаэробное, приводит к образованию монокарбоновых кислот, меркаптанов, H_2S , метиллированных производных ртути – ве-

ществ, токсичных для водных организмов. Со сточными водами промышленных предприятий в водоем попадают некоторые специфические микроорганизмы, например, активный ил или дрожжи – продукт молочной и бродильной промышленности.

Не меньшую опасность для водоема представляет его **вторичное загрязнение**, обусловленное возвратом в водную толщу накопившихся в донных осадках загрязняющих веществ или продуктов их деградации. Вторичное загрязнение сопутствует эвтрофированию водоемов, которое обусловлено разложением отмирающих водных организмов. Сезонность в развитии фитопланктона и последующее его отмирание приводят к обогащению воды O_2 , на минерализацию которых требуется большое количество O_2 . Будучи автотрофами, водоросли практически в любом водоеме находят источник углеродного питания, и лимитирующим фактором их развития является наличие в воде азота и фосфора. Таким образом, ограничить избыточное развитие водорослей можно, лишь предотвратив попадание в водоем биогенов.

5.2. Основные процессы самоочищения

Поступающие в водоем загрязнения вызывают в нем нарушение естественного равновесия между фотосинтезом и дыханием. Процессы, направленные на поддержание гомеостаза водных экосистем, определяют самоочищение вод. По ГОСТ 17403-72, **самоочищение** – это совокупность всех природных процессов в водоеме, направленных на восстановление первоначальных свойств воды.

Гидродинамические процессы во многом определяют интенсивность самоочищения, поскольку понижают концентрацию загрязнения смешением стоков с водой водоема. Осаждение нерастворимых примесей, поступающих в водоем со сточными водами, – физический фактор самоочищения, который тесно связан с жизнедеятельностью гидробионтов – фильтраторов и седиментаторов. Они извлекают из воды огромные количества взвешенных веществ и выбрасывают непереваренный материал в виде фекальных комочков или псевдофекалий, легко оседающих на дно. Таким образом, гидробионты ускоряют процессы осаждения, переводя взвешенные вещества в донные отложения.

В водоемах протекают **чисто химические** реакции нейтрализации, гидролиза, окисления. Например, при самоочищении от ионов железа, магния, алюминия преобладающим процессом является реакция образования гидроксидов этих металлов с последующим их осаждением.

Самоочищение от ионов тяжелых металлов происходит за счет нескольких процессов: соосаждения с гидроксидами перечисленных выше металлов, сорбции ионов органическими коллоидами, образования сложных металлоорганических комплексов с гуминовыми кислотами. Доля участия каждого из этих процессов зависит от рН, окислительно-восстановительных условий среды, концентрации металлов. В результате вода освобождается от ионов металлов, а в донных отложениях происходит их накопление. Изменение окислительно-восстановительных условий в донных осадках может привести к переходу ионов металлов в водный слой и вызвать вторичное загрязнение воды.

Минерализация органических загрязнений происходит главным образом за счет биохимических процессов, протекающих с участием разнообразных гидробионтов как в водной среде, так и в донных отложениях. Главенствующую роль в окислении загрязняющих веществ играют гетеротрофные бактерии, которые используют их в качестве источников углерода и энергии, вовлекая их в общий круговорот вещества и энергии в водоеме. Водные микроорганизмы выполняют функцию их первичного окисления или восстановления. Основная функция микробиоты в процессе самоочищения состоит в переработке трудноокисляемых **ОВ** природного происхождения и искусственно синтезированных ксенобиотиков.

Перегрузка водоемов стоками необратимо подрывает способность экосистемы к самоочищению и приводит к превращению водоема в сточную канаву. В XX веке это произошло со многими водоемами США, некоторых стран Западной Европы и Японии.

5.3. Экологические факторы, определяющие интенсивность самоочищения вод

Важнейшими факторами среды, которые определяют деятельность микробиоты водоемов как основного участника самоочищения, являются 1) температура воды, 2) кислородный режим, 3) наличие биогенов (N, P) и условий их регенерации, 4) целостность экологической системы водоема. Эти условия обычно строго контролируются в работе сооружений биохимической очистки.

Оптимальными для гетеротрофных бактерий являются мезофильные температуры, нейтральные рН, максимальное снабжение кислородом и лимитирующее рост количество биогенов.

Температурный фактор особенно сильно влияет на бактериальное окисление сложных органических веществ, которое происходит при участии сложных микробных сообществ и специфических микроорганизмов. Прямые определения скорости окисления клетчатки и нефтяных углеводородов в пробах воды из водоемов показали, что при температуре менее 10°C скорость деструкции резко снижается. При температуре, близкой к нулю, окисление трудноминерализуемой органики микрофлорой практически полностью прекращается. Эти факты увеличивают значение поиска психрофильных микроорганизмов-деструкторов в связи с загрязнением нефтью полярных морей, а северных рек – отходами ЦБК.

Кислородный режим водоема, окислительно-восстановительные условия водной среды оказывают решающее влияние на минерализацию ОВ микробиотой и тем самым на процесс самоочищения. При недостаточном содержании кислорода в воде (менее 0,1–0,5 мг/л) интенсивность микробиологических процессов резко снижается и меняется их направленность. Об образовании токсичных продуктов анаэробной деградации ОВ мы уже говорили. Кроме того, некоторые сложные органические загрязнители, которые в какой-то степени могут окисляться водной микробиотой в аэробных условиях, в анаэробных условиях вообще не окисляются или окисляются только частично и невероятно медленно. К числу таких загрязнителей можно отнести лигнин и тяжелые фракции нефти. Осаждение этих продуктов на дно водоема ведет к их необратимой аккумуляции и к гибели бентосного сообщества.

Существенным фактором, влияющим на активность бактериальной переработки ОВ, сбрасываемых в водоемы, является **обеспеченность бактериального населения биогенными элементами**. Оптимальным считают соотношение $C:N:P=106:116:1$, установленное Редфилдом для биомассы водорослей. В случае дефицита азота и фосфора даже при обилии ОВ активность и рост бактериального населения прекратятся. Подсчитано, что для бактериального окисления одной тонны сложных ОВ, обедненных N и P, необходимо около 20 кг азота и около 2 кг фосфора. Биогенные элементы в солевой форме находятся в водоемах почти всегда в минимуме. Даже в высокопродуктивных и загрязняемых водоемах большая часть N и P пребывает в составе биомассы фитопланктона и бактерий. В периоды массового развития водоросли практически полностью извлекают их из воды. Содержание солей N и P в этот период часто равно аналитическому нулю, особенно в поверхностном слое, где и скапливаются все поверхностно-активные загрязняющие ОВ: нефть, органические кислоты и спирты.

Таким образом, в периоды сильного развития фитопланктона бактериальная деструкция безазотистых ОВ тормозится. Восстановление активности окисляющей их микробиоты происходит только после того, как ОВ фитопланктона включается в пищевую цепь, работа которой восстанавливается (рис. 20). Развитие животного населения, его обилие, нормальное функционирование являются важным, стимулирующим самоочищение путем ускорения регенерации солевых биогенов, находящихся в телах бактерий и водорослей.

Другая важнейшая функция животного населения в процессах самоочищения состоит в окислении бактериальной массы, образование которой является неизбежным следствием любого процесса бактериальной деструкции. При окислении 1 т ОВ (например, нефти) в водоеме образуется не меньше 200 кг массы бактерий, которая сама должна быть окислена. Эту функцию выполняют в основном животные – потребители бактерий, они окисляют эту биомассу в процессе своего обмена и освобождают заключенные в ней биогены (рис. 18).

В настоящее время активно изучаются и другие механизмы регенерации бактериальных биогенов, включаемые в процесс са-

моочистения водоемов. Они связаны с регулированием плотности бактериальных популяций с помощью хищных прокариот типа *Bdellovibrio* и развитием бактериофагов. Численность и тех, и других коррелирует с плотностью бактериального населения. Различия в числе хищных бактерий в осадках олиготрофного и мезотрофного водоемов можно увидеть в табл. 3. Что касается бактериофагов, то в олиготрофном оз. Байкал их количество на порядок меньше ОЧБ, а в мезотрофном Рыбинском водохранилище – на порядок больше.

Тем не менее, для всей экосистемы работает закономерность: чем быстрее животное население водоема минерализует массу бактерий, тем быстрее циркулируют биогены, тем скорее и полнее проходит процесс самоочистения и восстановления качества воды. В этом смысле задачи повышения биологической продуктивности и ускорения восстановления качества воды совпадают. Однако обе решаются в таком взаимодействии только при условии, если загрязняющие вещества, попадающие в водоем, не токсичны, доступны действию микроорганизмов, если их количество не ведет к перегрузке экосистемы водоема и подрыву ее целостности.

В связи с этим особое значение имеют адаптивные возможности бактерий, которые позволяют им осуществлять деструкцию трудноокисляемых и часто токсичных ОВ.

5.4. Общие закономерности микробиологической деструкции загрязняющих веществ

1. Универсальным механизмом деградации является **биологическое окисление**, в процессе которого происходят разные биохимические реакции: гидролиз, окисдирование, дегидрирование, дегалогенирование и т.п. В аэробных условиях бета-окисление – обычный метаболический процесс, характерный для большинства микроорганизмов, поскольку является важным источником энергии.

2. **Субстратное ингибирование.** Зависимость скорости окисления субстрата от его концентрации. При повышении концентрации после некоторого значения скорость перестает возрас-

тать и даже начинает снижаться, в чем проявляется принцип экономии клеточного метаболизма, в основе которого лежат, с одной стороны, регуляция синтеза ферментов, с другой – регуляция их активности. Практический выход: необходимость разбавления стоков перед биологической очисткой.

3. Явление **диуаксии** – последовательное окисление различных веществ в полисубстратных смесях: сначала потребляется самый легкоокисляемый субстрат (например, глюкоза), который подавляет синтез ферментов, необходимых для окисления других более трудноокисляемых веществ (например, фенола). Классический пример – глюкоза и лактоза. Глюкоза подавляет синтез фермента β -галактозидазы (который гидролизует лактозу на D-глюкозу и D-галактозу), даже если в среде есть лактоза – индуктор этого фермента.

4. **Кометаболизм** (соокисление) – процесс, при котором в процессе потребления и окисления основного источника углерода и энергии потребляется и окисляется другой, неосновной источник углерода и энергии, часто может быть представленным токсичным веществом или ксенобиотиком. Основным источником идет на нужды конструктивного метаболизма, а соокисляемый субстрат не используется для роста, поскольку не преобразуется до образования промежуточных продуктов, пригодных для участия в метаболизме.

5. **Адаптация микроорганизмов:** фенотипическая, представленная индуцибельными ферментами, и генетическая, обусловленная мутациями. Многие микроорганизмы имеют способность к деградации сложных органических загрязнителей. Это свойство может приобретаться в результате включения SOS-регуляторной системы в процессе адаптивного мутагенеза. В этот процесс вовлекается 5% природной популяции микроорганизмов при наличии стрессового мутагенного воздействия. Эмпирически давно было установлено, что если природную микробную популяцию, чаще всего выделенную из загрязненной почвы, инкубировать в среде с ксенобиотиком в качестве единственного источника углерода и энергии, то рано или поздно в накопительной культуре появится микроорганизм, способный к деградации необычного соединения.

6. **Плазмиды деградации** содержат нехромосомные гены, кодирующие структуру ферментов особых катаболических путей самых необычных субстратов. Известны камфарная, октановая, салициловая плазмиды, которые могут передаваться от одного вида прокариот другому в результате конъюгации. Примером может быть анализ генетических систем катаболизма нафталина 18 штаммов *Pseudomonas fluorescens*, изолированных из загрязненных нефтепродуктами почв различных географических районов РФ. В 13 штаммах обнаружены плазмиды размером от 20 до 120 т.п.н. По крайней мере 5 плазмид являются конъюгативными и содержат катаболические гены, ответственные за полную утилизацию нафталина и салицилата. Предполагается, что ключевые гены биodeградации нафталина эволюционируют независимо в составе отдельных блоков, образуя разные сочетания в разных штаммах. Поскольку плазмиды могут легко утрачиваться хозяевами, то стабильных деструкторов ксенобиотиков ищут среди родококков, у которых гены деградации включены в хромосому.

5.5. Интегральные количественные показатели окислительной способности микробиоты водоемов

Интенсивность дыхания R определяется как скорость потребления кислорода микробиотой. Считается, что она пропорциональна количеству бактериальной массы: $R=QB$, где B – биомасса, а Q – удельная интенсивность дыхания. Для грубых оценок можно использовать следующие величины Q , выраженные в мг O_2 /сут/кл: $1,0 \cdot 10^{-10}$ при $P/B=0$;

$$1,5 \cdot 10^{-10} \text{ при } 0 < P/B < 0,5 \text{ и} \\ 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ при } P/B > 0,5 \text{ сут}^{-1}.$$

Величины R и Q служат мерой скорости деструкции органического вещества бактериями. Показано, что бактериальное дыхание составляет от суммарной деструкции в среднем в эвтрофных озерах 55%, в мезотрофных – 65% и в олиготрофных – 85%.

Принимается, что общую скорость использования бактериями органического вещества A (коэффициент ассимиляции) можно представить в виде суммы $A=P+R$. Разумеется, что при этом все 3 скорости должны быть выражены в одних и тех же единицах. Такие расчеты обычно проводятся в энергетических единицах, считая, что при потреблении 1 мг O_2 на обмен затрачивается 3,4 кал (14,3 Дж), а энергосодержание 1 мг сырого клеточного вещества бактерий равно 1 кал или 4,2 Дж.

Коэффициент эффективности использования ассимилированной энергии или коэффициент энергетического обмена бактерий $K_2=P/P+R$ показывает, какая часть потребленной ими энергии израсходована на дыхание, а какая часть аккумулирована в клеточном материале. В естественных сообществах K_2 имеет среднее значение 0,32–0,37. Это означает, что в процессе деструкции органического вещества (ОВ) около 30% энергии расходуется бактериями на конструктивный метаболизм, а 70% – на энергетический. На загрязненных участках водоемов K_2 может снижаться до 0,03–0,11, т.е. ОВ только окисляется бактериями. Тем не менее в оценочных расчетах рекомендуется K_2 принимать равным 0,5 для эвтрофных водоемов, 0,3–0,4 – для мезотрофных и 0,1–0,2 – для олиготрофных, поэтому величину K_2 следует рассматривать в совокупности с общей экологической обстановкой в водоеме.

Эти значения можно привлекать либо для оценки скорости продукции по скорости потребления кислорода:

$$P = K_2 \cdot R / (1 - K_2),$$

либо для определения скорости потребления кислорода по скорости продукции:

$$R = (1 - K_2) \cdot P / K_2.$$

5.6. Показатели биоиндикации степени загрязнения водоемов

Степень загрязненности водоема оценивается по количеству и характеру присутствующих в воде органических соединений, которые определяют структуру водного сообщества. Способность развиваться в среде с определенным содержанием ОВ, соответствующего той или иной степени загрязненности, называется сапробностью данного организма. Сообщества, в которые входят организмы одной сапробности, используют в целях биоиндикации. Классификация сапробности водоемов отражает процесс протекания горной олиготрофной речки с горной вершины к устью. На равнине ее воды пополняются ОВ и она становится мезотрофной. Дополнительное загрязнение приводит ее в разряд политрофной. Самоочищение проходит в обратном порядке.

Полисапробная зона (зона сильного загрязнения) характеризуется наличием в воде большого количества высокомолекулярных ОВ и почти полным отсутствием свободного кислорода. Вследствие этого биохимические процессы носят анаэробный характер. Вода содержит значительные количества газообразных продуктов анаэробного распада органических веществ – CO_2 , H_2S , CH_4 . Число сапротрофных бактерий, вырастающих на МПА (ОЧБ), может достигать многих миллионов в 1 мл.

В условиях полисапробной зоны наблюдается массовое развитие разнообразных гетеротрофных прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Среди бактерий индикаторами являются *Spirillum tenue*, *S. volutans*, хлопьеобразующие *Zooglea ramigera*, нитчатые серобактерии *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Sphaerotilus*. В целом доминируют сапротрофные и нитчатые бактерии, из водорослей развивается *Euglena viridis*, из грибов – *Fusarium aduaeductum*. Среди простейших наиболее характерны мелкие бесцветные жгутиковые, инфузории *Colpidium colpoda*, *Vorticella microstoma*, амёбы *Pelomixa palustris*. Микронаселение бентоса составляют в основном анаэробные сапротрофные бактерии, олигохеты *Tubifex*, *Limnodrilus*, личинки комара *Chironomus plumosus*.

Мезосапробная зона (зона среднего загрязнения) подразделяется на альфа- и бета-мезосапробную подзоны.

В **α -мезосапробной** подзоне протекают аэробные процессы окисления ОВ с образованием аммиака. O_2 присутствует, но его недостаточно. В этой зоне развиваются главным образом организмы, адаптированные к недостатку кислорода. ОЧБ равно 10^5 кл/мл. Показательными являются *Sphaerotilus natans*, *Spirochaeta plicatilis*, так же как в полисапробной зоне развиваются бактериальные зооглеи, нитчатые серобактерии. Из цианобактерий развивается *Oscillatoria*, из грибов – *Mucor racemosus*. Животные организмы представлены многочисленными видами инфузорий (*Paramecium caudatum*, *Opercularia coarctata*), жгутиковыми простейшими, коловратками (*Rotaria*), низшими ракообразными (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*). В илах много олигохет и личинок хирономид.

β -мезосапробная подзона характеризуется почти полным отсутствием легкоокисляемых ОВ. В воде присутствуют NH_3 и продукты его окисления – NO_2^- и NO_3^- . O_2 достаточно. ОЧБ составляет 10^4 кл/мл. Развиваются автотрофные организмы: цианобактерии (*Anabaena*), зеленые (*Scenedesmus*) и диатомовые (*Melozira*) водоросли, нитрифицирующие бактерии. Из простейших – инфузории и корненожки. Из прочих планктонных животных появляются коловратки и ракообразные. В донных отложениях протекают интенсивные процессы минерализации с участием бактерий, многочисленных видов червей, личинок разнообразных насекомых, моллюсков. Появляются макрофиты (роголистник).

В **олигосапробной зоне** (зоне чистой воды) РОВ практически отсутствует (<1 мг/л), поэтому бактериальное население представлено в основном автотрофными организмами. Количество O_2 близко к полному насыщению. Зона характеризуется законченностью процессов нитрификации. ОЧБ составляет не более 103 кл/мл. Наблюдается большое видовое разнообразие микроорганизмов. Бактерии *Gallionella ferruginosa*, *Leptothrix ochraceae* в массе развиваются в родниках с железосодержащими водами. Из водорослей характерны диатомовые (*Cymbella cesati*) и зеленые (*Ulotrix zonata*), из коловраток – *Kellicottia longispina*, из ракообразных – ветвистоусые и веслоногие (*Eudiaptomus gracilis*) рачки. В илах присутствуют личинки поденок, моллюски.

5.7. Особенности деструкционных процессов в осадках водоемов

Донные отложения водоемов являются важнейшей составной частью всех водных экосистем. Имеющиеся сведения показывают очень важную, но неоднозначную роль донного комплекса в функционировании различных водных объектов. Депонирование в отложениях биогенных соединений позволяет поддерживать высокий биопродуктивный потенциал водоема, однако их избыточное накопление оказывает эвтрофирующее воздействие. Сорбция аллохтонных, в том числе токсичных, веществ служит важнейшим механизмом естественного очищения вод. В то же время трансформация подобных седиментов анаэробным бактериальным сообществом может вызвать эффект “вторичного загрязнения” вод не менее токсичными продуктами распада. Особое внимание уделяется изучению значимости илов в процессах круговорота ОВ и роли в них бактериального населения.

Существует проблема соотношения анаэробных и аэробных процессов деструкции ОВ – прежде всего в илах, где плотность микробного населения на 3 порядка выше, чем в водной толще. Поэтому среди многообразия микроорганизмов, населяющих пресноводные осадки, еще С.И. Кузнецов выбрал среди аэробов – сапротрофных бактерий, окисляющих углеводороды, фенолы, клетчатку, метан; из анаэробных – маслянокислых броодильщиков, метаногенов и сульфатредукторов согласно схеме (рис. 21).

Многолетние исследования интенсивности микробиологических процессов деструкции ОВ и цикла метана в донных отложениях внутренних водоемов разной трофности выявили важную, но различную роль этих процессов в функционировании континентальных водных экосистем. Оказалось, что доля илового распада в общеводоемном деструкционном потоке составляет в вегетационный период от 21 до 71%, а в подледный – достигает 90%. Причем если в водной толще окисляются в основном автохтонные лабильные соединения, то в осадках в процессах со-окисления бактериальному разрушению подвергаются также аллохтонные труднодоступные, а нередко токсичные вещества.

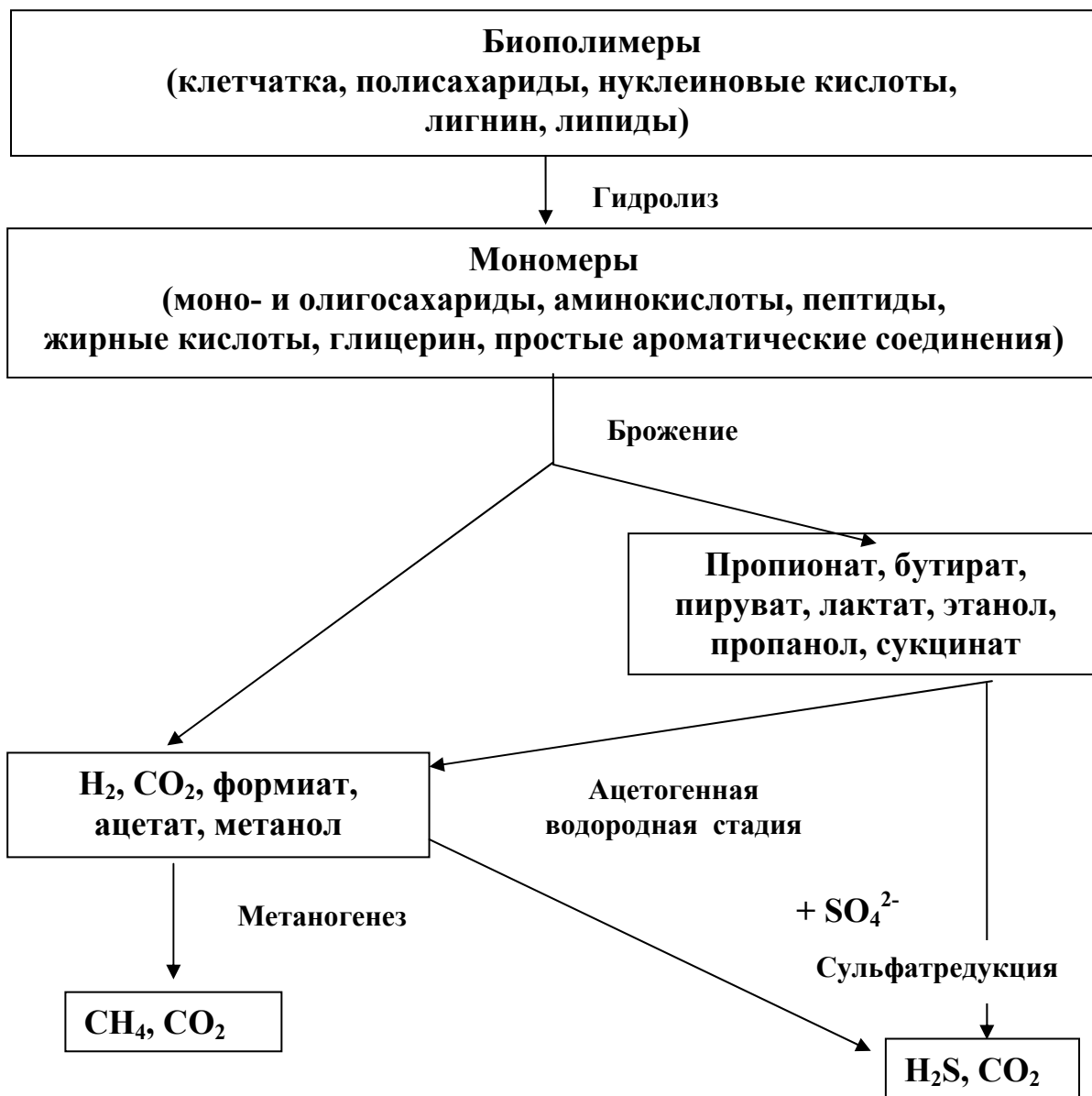


Рис. 21. Процессы анаэробной деградации органического вещества в водоемах [14]

Анаэробные процессы распада ОВ в отложениях играют важную роль во всех водоемах, а в большинстве из них доминирующую, составляя в среднем на водоем 33–95% суммарной деструкции. При этом в илах продуктивных озер и водохранилищ решающий вклад в анаэробную деструкцию принадлежит процессам метаногенеза, доля которых достигает 30 – 80%.

Показано, что ведущим экологическим фактором, определяющим уровень валовой деструкции ОВ в донных отложениях является их обеспеченность лабильными веществами и в целом трофическим статусом водоема. Направленность деструкционных потоков обусловлена окислительно-восстановительными условиями и кислородным режимом водоема в целом [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, можно заключить, что водные прокариоты представляют собой более таксономически обособленную группу, чем представлялось ранее. Кроме того, она состоит из многих вполне самостоятельных филогенетических ветвей. Если представить работу водной экосистемы в виде часового механизма, то движение множества мелких шестеренок обеспечивается работой разнообразных специфических бактерий и архей. Именно они раскручивают большой круговорот органического углерода, который в свою очередь определяет продуктивность водоема и обеспечивает качество воды. В этом состоит значение тех невидимых тружеников прокариотного мира, которые не огорчают человека болезнями, но которые уже принесли пользу в биотехнологии (например, получение биогаза) и еще послужат в век нанотехнологий.

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Вербина, Н.М. Гидромикробиология с основами общей микробиологии / Н.М. Вербина. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 288 с.
2. Верховцева, Н.В. Водная микробиология: учеб. пособие / Н.В. Верховцева, Е.П. Никифорова. – Ярославль, 1984. – 68 с.
3. Гальченко, В.Ф. Метанотрофные бактерии / В.Ф. Гальченко. – М.: ГЕОС, 2001. – 500 с.
4. Горленко, В.М. Экология водных микроорганизмов / В.М. Горленко, Г.А. Дубинина, С.И. Кузнецов. – М.: Наука, 1977. – 289 с.
5. Громов, Б.В. Экология бактерий: учеб. пособие / Б.В. Громов, Г.В. Павленко. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1989. – 248 с.
6. Гусев, М.В. Микробиология: учебник для студ. биол. специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Академия, 2003. – 464 с.
7. Дедыш, С.Н. Ацидофильные метанотрофные бактерии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук / С.Н. Дедыш. – М.: ИНМИ РАН, 2005. – 44 с.
8. Дзюбан, А.Н. Маслянокислые бактерии, относящиеся к роду *Clostridium*, в донных отложениях внутренних водоемов разного типа / А.Н. Дзюбан // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 119–125.
9. Дзюбан, А.Н. Деструкция органического вещества и цикл метана в донных отложениях внутренних водоемов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук / А.Н. Дзюбан. – СПб.: Институт Озероведения РАН, 2007. – 42 с.
10. Добровольская, Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / Т.Г. Добровольская. – М.: Академия, 2002. – 282 с.
11. Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию: учебное пособие / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова. – М.: Университет, 2001. – 256 с.
12. Заварзин, Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А. Заварзин. – М.: Наука, 2003. – 348 с.

13. Кондакова, Г.В. Влияние температуры и высоких концентраций солей на рост бактерий, выделенных из подземных вод / Г.В. Кондакова, А.В. Шишкина // Современные проблемы биологии и химии. – Ярославль, 2000. – С. 125–129.
14. Кузнецов, С.И. Методы изучения водных микроорганизмов / С.И. Кузнецов, Г.А. Дубинина. – М.: Наука, 1989. – 288 с.
15. Мишустина, И.Е. Морская микробиология. учеб. пособие. / И.Е. Мишустина, И.К. Щеглова, И.И. Мицкевич. – Владивосток: Изд-во Дальневосточ. ун-та, 1985. – С. 184.
16. Нетрусов, А.И. Микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Академия, 2006. – 352 с.
17. Пухова, Н.Ю. Экологическая физиология микроорганизмов. Ч. 2. Аутэкология микроорганизмов: учеб. пособие / Н.Ю. Пухова; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль: ЯрГУ, 2006. – 128 с.
18. Современная микробиология: Прокариоты: В 2 т.: Т. 2. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шелегеля. – М.: Мир, 2005. – 496 с.
19. Сорокин, Ю.И. Роль бактерий в жизни водоемов / Ю.И. Сорокин. – М.: Знание, 1974. – 64 с.
20. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Вып. 13: К 100-летию открытия метанотрофии / Отв. ред. В.Ф. Гальченко. – М.: Наука, 2006. – 343 с.
21. Филина Н.Ю. Биология и экология бактерий, образующих магнитоупорядоченные соединения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н.Ю. Филина. – М.: МГУ, 1987. – 24 с.
22. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др.; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2004. – 272 с.
23. Madigan, M.T. Brock biology of microorganisms / M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker. – New Jersey: Prentice Hall Inc., 1997. – 1038 p.
24. Rheinheimer, G. Aquatic microbiology / G. Rheinheimer. – NY: John Wiley&Sons, 1994. – 363 p.

Контрольные вопросы

1. Экология водных микроорганизмов как самостоятельное научное направление.
2. Формирование водной микробиологии как самостоятельной науки в конце XIX – начале XX века.
3. Основные задачи и результаты микробиологических исследований водоемов в период между первой и второй мировыми войнами.
4. Основные задачи и методы морфо-физиологического направления водной микробиологии.
5. Характеристика биогеохимического направления изучения водных микроорганизмов.
6. Продукционно-трофологическое направление водной микробиологии: основные задачи и способы их решения.
7. Современные технологии изучения водных микроорганизмов *in situ*.
8. Понятие об автохтонных и аллохтонных микроорганизмах.
9. Способы существования микроорганизмов в водной среде.
10. Сущность олиготрофии водных бактерий.
11. Филогенетическая принадлежность и разнообразие водных прокариот.
12. Общая характеристика протеобактерий.
13. Зональность водоемов, обусловленная сочетанным действием физико-химических факторов в водной среде.
14. Характеристика водных микробных сообществ: бактерионейстона, аэробного и анаэробного бактериопланктона, бактерибентоса, сообщества «жидкого» дна и биопленок.
15. Основные функциональные группы автохтонных микроорганизмов в водоеме: специалисты и универсалы, "микробиота рассеяния", микроорганизмы генофонда.
16. Цикл углерода в водоемах, его особенности.
17. Наиболее значимые микроорганизмы цикла углерода в водоемах: водородные бактерии, карбоксидобактерии, метаногены, метилотрофы, углеводородокисляющие, целлюлозоразла-

гающие, ацетогенные и маслянокислые бактерии, их характеристика.

18. Круговорот азота в водоемах, его особенности и участие в нем бактерий.

19. Наиболее значимые в водоемах микроорганизмы цикла азота: азотфиксаторы, аммонификаторы, нитрификаторы, денитрификаторы, их характеристика.

20. Круговорот серы в водоемах, его особенности.

21. Основные группы микроорганизмов цикла серы в водоемах: сульфатредукторы, сероредукторы, «гнилостные» бактерии, серобактерии, тионовые бактерии, фотосинтезирующие пурпурные, зеленые бактерии, их характеристика.

22. Круговорот фосфора в водоемах и участие в нем бактерий.

23. Круговорот железа и марганца, его особенности в водоемах различного типа.

24. Характеристика микроорганизмов, восстанавливающих и/или окисляющих металлы с переменной валентностью.

25. Определение общего числа водных бактерий методами прямого счета.

26. Методы определения и расчета массы водных бактерий.

27. Методы определения бактериальной продукции в водоемах.

28. P/V-коэффициент как интегральный показатель бактериальной активности в водоемах, его сходство и отличие от удельной скорости роста.

29. Методы определения продукции и скорости выедания бактериопланктона в изолированных пробах.

30. Место бактерий в трофической сети водоема. Понятие о микробной петле.

31. Пищевая ценность бактерий и методы ее определения.

32. Факторы, определяющие возможность потребления бактерий водными животными.

33. Характеристика микробного сообщества детрита.

34. Микробиологические показатели, определяющие бактериальный рацион «тонких» и «грубых» фильтраторов, детритофагов.

35. Краткая характеристика загрязнения водоемов. Понятие о первичном и вторичном загрязнении водоемов.
36. Основные процессы самоочищения водоемов и участие в них микроорганизмов.
37. Экологические факторы, определяющие интенсивность биохимического самоочищения вод.
38. Общие закономерности микробиологической деструкции загрязняющих веществ.
39. Интенсивность дыхания (R) как интегральный показатель бактериальной активности в водоемах.
40. Ассимиляционный коэффициент A и его значение для оценки физиологической активности водных бактерий.
41. Коэффициент энергетического обмена K_2 и его значение для оценки физиологической активности водных бактерий.
42. Изучение деструкции ксенобиотиков. Универсальные подходы и определение биоокисляющей способности конкретного водоема.
43. Биоиндикация загрязненности водоемов по микробиологическим показателям, шкала сапробности.
44. Микробиологическая характеристика водоемов различной сапробности.
45. Влияние деструкции органического вещества в осадках на состояние экосистемы водоема и качество воды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АК – аминокислоты
- АУ – ароматические углеводороды
- БАВ – биологически активные вещества
- Бхл – бактериохлорофилл
- ВОВ – взвешенное органическое вещество
- ВЦМ – внутрицитоплазматические мембраны
- ЖК – жирные кислоты
- КС – клеточная стенка
- ММО – метанмонооксигеназа
- МПА – мясо-пептонный агар
- МПЖ – мясо-пептонный желатин
- НОБ – нефтеокисляющие бактерии
- ОВ – органическое вещество
- ОЧБ – общее число бактерий
- ПАВ – поверхностно-активные вещества
- ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
- ПВК – пировиноградная кислота
- РОВ – растворенное органическое вещество
- УОБ – углеводородокисляющие бактерии
- Фд – ферредоксин
- ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
- ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ВОДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ И МЕТОДЫ	6
1.1. Формирование водной микробиологии как науки	6
1.2. Советский период.....	8
1.3. Основные направления и методы водной микробиологии	10
1.4. Современные методы изучения экологии водных микроорганизмов.....	15
2. КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ВОДОЕМОВ .	17
2.1. Аллохтонные и автохтонные микроорганизмы.....	17
2.2. Многообразие водных прокариот	18
2.3. Физико-химические условия и пространственная организация микробиоты в водоемах	25
3. ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ВОДНЫХ ПРОКАРИОТ	36
3.1. Цикл углерода и микроорганизмы, его осуществляющие	36
3.1.1. Водородные бактерии	40
3.1.2. Карбоксидобактерии	42
3.1.3. Метанобразующие археи (метаногены)	44
3.1.4. Метилотрофные организмы	46
3.1.4.1. Метанокисляющие бактерии	48
3.1.4.2. Факультативные метилотрофные бактерии .	50
3.1.5. Углевородокисляющие бактерии.....	52
3.1.6. Целлюлозоразлагающие бактерии.....	56
3.1.7. Ацетогенные бактерии.....	58
3.1.8. Маслянокислые бактерии	60
3.2. Цикл азота	62
3.2.1. Азотфиксирующие микроорганизмы	64
3.2.2. Аммонификаторы	66

3.2.3. Нитрифицирующие бактерии.....	68
3.2.3.1. Хемолитоавтотрофы.....	68
3.2.3.2. Гетеротрофные нитрификаторы	70
3.2.4. Денитрификаторы	71
3.3. Цикл серы.....	73
3.3.1. Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ)	74
3.3.2. Сероредуцирующие бактерии	78
3.3.3. Гнилостные бактерии, образующие сероводород	79
3.3.4. Бесцветные собственно серобактерии.....	79
3.3.5. Хемолитотрофные сероокисляющие (тионовые бактерии)	80
3.3.6. Фотосинтезирующие бактерии	81
3.3.6.1. Пурпурные бактерии.....	81
3.3.6.2. Зеленые бактерии.....	84
3.4. Цикл фосфора	87
3.5. Цикл железа и марганца	89
3.5.1. Микроорганизмы, восстанавливающие металлы	90
3.5.2. Окисление железа и марганца микроорганизмами	92
3.5.2.1. <i>Облигатно ацидофильные железобактерии</i>	93
3.5.2.2. <i>Бактерии, окисляющие железо в нейтральной и щелочной средах</i>	94
4. ПРОДУКЦИОННО-ТРОФИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ БАКТЕРИЙ В ВОДОЕМАХ	97
4.1. Количественные характеристики бактериальной продукции.....	97
4.2. Место бактерий в трофической сети водоема	100
4.3. Бактерии как пища водных животных	104
5. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В САМООЧИЩЕНИИ ВОД	109
5.1. Краткая характеристика загрязнения водоемов	109
5.2. Основные процессы самоочищения	110
5.3. Экологические факторы, определяющие интенсивность самоочищения вод	112
5.4. Общие закономерности микробиологической деструкции загрязняющих веществ	114
5.5. Интегральные количественные показатели окислительной способности микробиоты водоемов	116

5.6. Показатели биоиндикации степени загрязнения водоемов.....	118
5.7. Особенности деструкционных процессов в осадках водоемов	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	123
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	128

Учебное издание

Шеховцова Нина Валентиновна

ЭКОЛОГИЯ ВОДНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учебное пособие

Редактор, корректор А.А. Аладьева
Компьютерная верстка И.Н. Ивановой

Подписано в печать 13.05.2008 г. Формат 60×84/16.
Бумага тип. Усл. печ. л. 7,67. Уч.-изд. л. 6,07.
Тираж 110 экз. Заказ .

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе Ярославского
государственного университета.
Ярославский государственный университет.
150000 Ярославль, ул. Советская, 14.

Отпечатано
ООО «Ремдер» ЛР ИД № 06151 от 26.10.2001.
г. Ярославль, пр. Октября, 94, оф. 37
тел. (4852) 73-35-03, 58-03-48, факс 58-03-49.