



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

МИКРОБИОЛОГИЯ. ЧАСТЬ 2

НЕТРУСОВ
АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

Содержание

Лекция 1. Нитрификация	6
Краткая биография С. Н. Виноградского. Хемолитотрофия.	6
Трудности выделения <i>Beggiatoa</i> в чистую культуру.	6
Нитрифицирующие бактерии.	6
Фазы нитрификации.	7
Полная нитрификация аммония бактерией <i>Nitrospira</i>	7
Роль нитрификаторов в цикле азота.	8
Схема окисления аммония нитрификаторами.	8
Метаболизм и характеристика нитрификаторов.	8
Энергетический метаболизм нитрификаторов.	9
Причины отсутствия роста нитрификаторов на гидроксиламине.	10
Обратный транспорт электронов при синтезе нуклеотидов.	10
Метаболизм углерода нитрификаторов.	10
Литотрофное окисление нитрита.	11
Систематика и характеристика нитрификаторов II фазы.	11
Особенности окисления нитрита.	11
Нитритоксидоредуктаза. Распределение в клетке других ферментов.	11
Углеродный метаболизм.	12
Лекция 2. Серные бактерии	13
История открытия и характеристики анаммокс бактерий.	13
Анаммоксосома, ее функции.	13
Сравнение окисления аммиака аэробами и анаэробами.	13
Серные бактерии. Работы С. Н. Виноградского.	14
Характеристика тиобацилл.	14
Сульфобациллы.	15
Сероокисляющие археи.	16
Распространение и местообитание серных бактерий.	16
Биохимия окисления тиосульфата.	16
Диспропорционирование тиосульфата в анаэробных условиях.	17
Диспропорционирование сульфита в анаэробных условиях.	17
Лекция 3. Серные и железooksисляющие бактерии	18
Анаэробное дыхание серных бактерий.	18
Аэробное дыхание серных бактерий.	18
Углеродный метаболизм серных бактерий.	18
Серные бактерии в биометаллургии.	18
Железooksисляющие бактерии.	19
Сидерофоры.	20

Железоокисляющие бактерии, окисляющие другие металлы.	21
Ацидофильные железоокислители.	21
Марганецокисляющие бактерии.	21
Бактерии, окисляющие другие металлы.	21
Рост железоокисляющих бактерий.	22
Шкала окислительно-восстановительных потенциалов бактерий.	23
Водородные бактерии.	23
Лекция 4. Водородные бактерии	25
Биология водородной бактерии <i>Alcaligenes eutrophus</i>	25
Систематика водородных бактерий.	25
Местообитание водородных бактерий.	25
Примеры аэробных водородных бактерий.	25
Гидрогеназы.	26
Схема электрон-транспортной цепи <i>Alcaligenes eutrophus</i>	26
Биология водородной бактерии <i>Alcaligenes eutrophus</i>	27
Биология <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	27
Практическое применение водородных бактерий.	28
Карбоксидобактерии.	29
Характеристика карбоксидобактерий.	29
Примеры карбоксидобактерий.	29
Окисление CO различными группами бактерий.	30
Применение карбоксидобактерий.	31
Лекция 5. Фотосинтез	32
Оксигенный фотосинтез.	32
Аноксигенный фотосинтез.	32
Возникновение фотосинтеза в эволюции.	32
Филогения фототрофных бактерий.	33
Свойства аноксигенных фототрофов.	34
Пути окисления соединений серы.	35
Фиксация углерода фототрофами.	35
Фотопроецесс у пурпурных, зеленых и гелиобактерий.	35
Лекция 6. Цианобактерии	37
Углеродный метаболизм аноксигенных фототрофов.	37
Цикл Арнона.	37
Гидроксипропионатный цикл.	37
Цианобактерии.	38
Семейства и рода цианобактерий.	39
Роль цианобактерий в экосистемах.	39

Азотфиксация, группы азотфиксаторов.....	40
Лекция 7. Азотфиксация.....	42
Механизм азотфиксации.....	42
Тест на определение азотфиксаторов.....	42
Регуляция нитрогеназы.....	42
Особенности биологии <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>	43
Особенности работы нитрогеназы <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>	43
Невозможность пересадки растениям генов нитрогеназы.....	43
Краткие итоги темы по азотфиксации.....	44
Глобальные циклы элементов.....	44
Глобальный цикл углерода и кислорода.....	44
Различные пути фиксации углекислого газа.	45
Лекция 8. Глобальный цикл элементов	47
Цикл Берга-2 фиксации углекислого газа.....	47
Глобальный цикл азота.....	47
Глобальный цикл серы.....	48
Лекция 9. Экология	51
Экология: определение, история и разделы науки.	51
Характеристики экологического фактора.....	51
Синэкология и типы взаимоотношений между организмами.	51
Демэкология.....	52
Экосистема озера.....	52
Метод прижизненного окрашивания микроорганизмов.	53
Молекулярно-биологические методы.	53
Метод стабильных изотопов.	55
Сбор образцов для экологических исследований.	55
Лекция 10. Методы обнаружения микроорганизмов в пробах	57
Методы обнаружения микроорганизмов в пробах.	57
Определение микробной биомассы и других параметров метаболизма микроорганизмов.....	58
Симбиоз между фототрофами и сульфатредукторами.....	58
Лишайники.....	59
Другие примеры симбиозов.	60
Паразитические взаимоотношения.....	60
"Грибные сады" муравьев.....	60
Симбиоз кальмара со светящимися бактериями.....	61
Пивоварение и виноделие.	62

Лекция 1. Нитрификация

Краткая биография С. Н. Виноградского. Хемолитотрофия.

Понятие хемолитотрофия и образ жизни микроорганизмов установил советский ученый С.Н. Виноградский, когда работал во Франции в лаборатории известного ученого С. Бари.

Виноградский родился под Киевом в г. Городец, закончил гимназию, имел предрасположенность к музыке, увлекался юриспруденцией. Выбрал юриспруденцию, поступил в Санкт-Петербургский университет, но через два года сменил специальность, поступив на кафедру микробиологии и закончив специальность физиология растений. После, он поехал в Германию на стажировку, где стал заниматься микроорганизмами, которые окисляют сероводород — представители рода *Beggiatoa* - градиентные микроорганизмы, которые не выносят высоких концентраций кислорода и потребляют сероводород. Идеальная поверхность для их существования — осадки в каналах. Изнутри анаэробных осадков поступает сероводород, после разложения белков, водород гидролизуется и из серосодержащих аминокислот образуется сероводород, который диффундирует к поверхности. На границе аэробной и анаэробной зоны находятся *Beggiatoa*, которые и окисляют сероводород. Второй путь их метаболизма — когда сероводород заканчивается, они начинают превращать серу в серную кислоту.

Этими микроорганизмами занялся Виноградский. Под микроскопом он доказал, что *Beggiatoa* являются автотрофами и доказал, что для фиксации CO_2 , клетки используют энергию, которую получают из кислорода. Это было открытие, потому как в то время никто не мог предполагать, что организмы могут использовать неорганические вещества для получения энергии. Он сообщил это своим коллегам, и они поздравили его с открытием нового вида жизни. Изначально было дано название аноргоксидация, но впоследствии этот термин устарел и сейчас повсеместно применяется термин хемолитотрофия — окисление неорганических соединений для получения энергии. Если организмы являются литотрофами, то их называют хемолитоавтотрофы. Эти микроорганизмы способны окислять сероводород, фиксировать CO_2 , полностью окислять ион серной кислоты.

Трудности выделения *Beggiatoa* в чистую культуру.

Beggiatoa очень трудно выделялась в чистые культуры. Строгие доказательства хемолитоавтотрофии должны были быть получены на чистых культурах. Чистую культуру *Beggiatoa* выделили в 1991 году из мест, которые окружают глубоководные термальные источники, иногда это может быть связано с черными курильщиками, где *Beggiatoa* образует чистые культуры с глубиной залегания до нескольких метров и толщиной до 60 см. Именно из морских *Beggiatoa* были выделены чистые культуры, которые сейчас используются. Сложность выделения связана с образованием слизистых чехлов, в которых запутываются посторонние клетки микроорганизмов, что не дает выделить чистую культуру *Beggiatoa*. В связи с невозможностью получения чистой культуры *Beggiatoa*, Виноградский переключился на изучение нитрификаторов.

Нитрифицирующие бактерии.

Нитрификация использовалась человечеством со средних веков. С помощью нитрифицирующих бактерий получали селитру, которая шла на получение пороха. Для этого, в местах, где есть большое количество бросового белка (скотобойни), устраивали

гряды из хорошо прорыхленной почвы, которую поливали кровью забитых животных. Шел процесс разложения белка — из аминокислот белков углеродная часть использовалась микроорганизмами, а азотная часть превращалась в аммиак, который диффундировал к поверхности и встречался с нитрифицирующими микроорганизмами. Нитрификаторы окисляли аммиак до нитрита, затем до нитрата. Затем, эту почву промывали, чтобы вымыть нитраты и смешивали с золой, происходила реакция образования KNO_3 — селитра, которую высушивали и применяли для производства пороха.

О том, что процесс нитрификации, это биологический процесс, впервые догадался Пастер, который упоминал об этом в статьях. Строгое доказательство было получено в 1877 г, когда два французских ученых Шлөзинг и Мунц (Schlozing, Muntz) поставили эксперимент с нитрифицирующими кучами земли. Они обработали часть почвы хлороформом, подавив это процесс, часть нагрели, так же подавив этот процесс. После, в эту стерильную почву добавили нестерильную, в которой шел процесс нитрификации и процесс нитрификации восстановился в обработанной почве. Таким простым способом было показано, что данный процесс — биологический, который можно подавить, убив живые клетки.

В 1890 г. британский ученый Перси Франкланд, который работал со своей женой Грейс (Percy and Grace Frankland) опубликовали статью, в которой говорилось, что была выделена чистая культура нитрифицирующих бактерий, которая окисляла аммиак (соль аммония) до нитрита. Они наблюдали эту культуру в течении трех лет, после культура была заражена и погибла. На месяц позже Фракландов, Виноградский опубликовал свою статью о выделении чистой культуры нитрифицирующих организмах. В своих первых двух статьях, Виноградский утверждал, что выделенные чистые культуры окисляли аммиак до нитрата, что вскоре было опровергнуто. В своей пятой публикации на эту тему (пятый мемуар), Виноградский сказал, что выделил организмы первой и второй фазы нитрификации.

Фазы нитрификации.

Первая фаза нитрификации проводит нитрификацию с уровня аммиака, заканчивая нитритом. Вторая фаза — окисление нитрита в нитрат. Эти две фазы нитрификации проводят две разные, филогенетически не связанные бактерии (автотрофы, нитрификаторы), которые получают энергию из окисления органических веществ и фиксируют CO_2 . Сведения были опубликованы в книге, которая вышла под редакцией английских ученых в 1970 г.

Полная нитрификация аммония бактерией *Nitrospira*.

В 2015 году, вышли статьи в Nature. Две группы исследователей показали, что есть представитель нитрифицирующих бактерий, относящийся к роду *Nitrospira*, который проводит полную нитрификацию, окисляя аммиак или соль аммония до нитрата. То есть, сейчас встает вопрос, был ли прав Виноградский в 1890 г. Этот процесс назван Comammox (COMplete AMMonia OXidiser, либо completely ammonium oxidation).

Роль нитрификаторов в цикле азота.

В 1890-х годах были опубликованы несколько статей, посвященные выделенным в чистые культуры нитрификаторам. При этом, первенство досталось Виноградскому, а про Франкландов забыли.

Нитрифицирующие бактерии распространены повсеместно. Они включены в глобальный цикл азота и играют в нем одну из главенствующих ролей, поскольку они окисляют восстановленные формы азота в виде аммиака, который возникает при аэробном и анаэробном разложении белков, и окисляют это соединение до нитрата. Нитрат лучше впитывается корнями растений — более приемлемый для растений источник азота, хотя он более быстро вымывается из почвы (соли нитрата более растворимы, чем соли аммония).

В сельском хозяйстве применяется удобрение — нитроаммофосное соединение в которое входит и нитратная и аммонийная часть азотных удобрений.

Схема окисления аммония нитрификаторами.

При нитрификации, клетки аммонийных организмов получают энергию за счет окисления аммиака. Аммиак окисляется до нитрита, а затем, другими представителями нитрифицирующих организмов — до нитрата. Поскольку открыт новый организм, который полностью окисляет аммиак до нитрата, сейчас превращения иона аммония выглядит следующим образом:

Ион аммония превращается в нитрит, затем в нитрат. Процесс денитрификации приводит к появлению газообразного азота. Процесс азотфиксации приводит к связыванию атмосферного азота в аммоний. Comatтох приводит к полному окислению аммиака в нитрат (Рисунок 1.1)

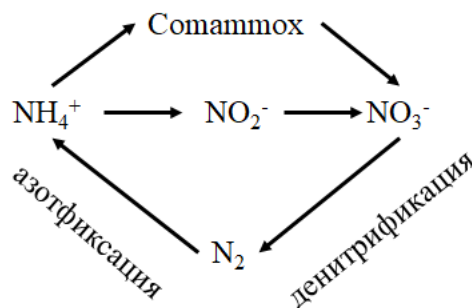


Рисунок 1.1. Схема окисления аммония нитрификаторами

Бактерии, осуществляющие Comatтох, выделили в чистую культуру, которая еще не имеет подтвержденного название, поэтому пока носит название *Candidatus «Nitrospira Inopinata»*. Все неподтвержденные названия принято ставить в кавычки, все латинские названия принято писать курсивом, но, когда не подтверждено название, курсив не ставят.

Метаболизм и характеристика нитрификаторов.

Литотрофное окисление аммиака проводят граммотрицательные организмы, которые являются облигатными литотрофами (используют в качестве субстрата только аммиак). В качестве источника углерода используют CO_2 , являясь автотрофами. И

используют аммиак, который могут сами образовывать из мочевины с помощью фермента уреазы. Систематическое положение нитрификаторов I фазы *Nitrosomonas* (подвижные палочки), *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosalobus* (выпуклости в виде полостей), *Nitrosavibrio* (короткие изогнутые палочки). Все подвижны в определенной стадии роста, после, теряют жгутики, прикрепляются к субстрату и растут. По филогенетическому положению относятся к бета-, гамма- и эпсилон-протеобактериям. Эти микроорганизмы обладают высокоразвитой системой внутренних цитоплазматических мембран (ВЦМ), в чем напоминают метанотрофов. Структурно, молекула метана и аммиака внешне похожа, метанмонооксигеназа окисляет аммиак, а аммиакмонооксигеназа может окислять метанол, но на этих соединениях нитрифицирующие микроорганизмы не растут. Но их ферменты способны окислять субстраты друг друга. Наличие и расположение ВЦМ имеет большое сходство между метан- и аммиакоокисляющими микроорганизмами. Считают, что для метаноокисляющих микроорганизмов, гидрофобное окружение помогает клетке для концентрации вокруг себя метана (плохо растворим в воде). Возможно у нитрификаторов такая способность так же присутствует.

Энергетический метаболизм нитрификаторов.

Энергетический обмен связан с окислением аммиака:

Аммиак + $1/2\text{O}_2$ = гидроксиламин + H_2O под действием восстановителя при помощи катализа аммиакмонооксигеназой. Реакция протекает с затратой энергии.

Вторая реакция может протекать двумя путями:

1. Гидроксиламин окисляется до нитрита с образованием $4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ (энергия для роста и метаболизма)
2. Гидроксиламин превращается в HNO с выделением $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$

HNO гидролизует (гидроксиламинооксидоредуктаза, расположена в периплазме) с выделением $\text{HNO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$

Гидроксиламин — энергетический субстрат для роста аммиакоокисляющих микроорганизмов.

Аммиакмонооксигеназа (МОА) — сложно выделяемый и сложно очищаемый фермент. Содержит ион меди в активном центре и на полиакриламидном геле дает полосу с массой 28 кДа. Фермент нестабилен, клетки растут медленно с низкой биомассой.

В периплазматическом пространстве аммиак и ион аммония переходят друг в друга. Аммиак с помощью фермента аммиакмонооксигеназы превращается в гидроксиламин при участии кислорода с образованием воды. МОА — мембраносвязанный фермент, прилегает к периплазматической части мембраны. Гидроксиламин помощью гидроксиламинооксидоредуктазы превращается в протоны и электроны. Трансмембранно расположен комплекс убихинон-Q-цитохром В/С, который дает 2 протона для реакций, которые возникают из обменной реакции $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ = \text{NADH} + \text{H}^+$. С убихинонового комплекса, электроны переносятся на цитохромный комплекс C554 (растворимый) и C552 (мембраносвязанный). С C552 на мембранозалегающий цитохромоксидазный комплекс a1, с которого электроны попадают на кислород и образуют воду. На уровне передачи электронов с C552 на a1 возникает трансмембранный градиент протонов, что связано с синтезом АТФ через реализацию/диссипацию трансмембранного градиента протонов, благодаря чему клетки получают энергию для роста и фиксации. Но этой энергии мало, поэтому клетки

растут скудно, медленно, с образованием малой биомассы. С этим связана недостаточность сведений о нитрифицирующих организмах первой фазы. Концентрации клеток в 1 мл достигает 10^{-6} - 10^{-7} (в то время, как *E.coli* достигает концентраций 10^{10}), что затрудняет выделение и изучение ферментов.

Было выяснено, что нитрификаторы I фазы растут за счет окисления аммиака через гидроксиламин с образованием азотистой кислоты.

Причины отсутствия роста нитрификаторов на гидроксиламине.

Всегда возникал вопрос, зачем нужен аммиак? На гидроксиламине клетки почему-то не растут, поэтому было высказано мнение, которое впоследствии было доказано экспериментально — гидроксиламин и аммиак должны окисляться одновременно.

Первое свидетельство тому, что они окисляются одновременно и не могут существовать друг без друга — нитрификаторы I фазы не растут на гидроксиламине без аммиака.

Второе: пиридиннуклеотид служит донором электронов для аммиака. Восстановленный пиридиннуклеотид выступает в качестве доноров для фиксации CO_2 в цикле Кальвина.

Третье: Количество аммиака и гидроксиламина, которое окисляется клеткой микроорганизма, окисляется в эквимольных концентрациях (1:1). Добавление больших количеств гидроксиламина подавляет окисление аммиака.

Обратный транспорт электронов при синтезе нуклеотидов.

Синтез пиридиннуклеотидов, необходимых для фиксации CO_2 идет через обратный транспорт электронов. Электроны с гидроксиламина поступают на цитохромы и убихиноновый комплекс. В этом случае, клетки должны затрачивать энергию.

Впервые, обратный транспорт электронов на нитрифицирующих бактериях был показан в 1964 г. американским исследователем Alim. При окислении аммиака и гидроксиламина образуется градиент протонов и формируется трансмембранный потенциал.

Метаболизм углерода нитрификаторов.

Метаболизм углерода у нитрификаторов I фазы связан с функционированием цикла Кальвина. Других путей фиксации CO_2 у нитрификаторов не обнаружено. Клетки некоторых видов и штаммов образуют карбоксисомы — внутриклеточные компартменты, окруженные простой белковой мембраной, которые не позволяют диффундировать содержимому карбоксисом в цитозоль. Было показано, что в карбоксисомах находится высокая концентрация первого фермента цикла Кальвина — РуБисКО (рибулозобисфосфатоксигеназакарбоксилаза). Считается, что клетки таким образом повышают свою способность захватывать большее количества углерода и с большей эффективностью фиксировать CO_2 . Карбоксисомы предотвращают повышение осмолярности цитоплазмы.

Так же, было показано, что некоторые нитрификаторы I фазы способны фиксировать некоторые органические соединения. С помощью меченых по C^{14} соединений, было показано, что на 130% увеличивается урожай клеток, при одновременном использовании с CO_2 ацетата, пирувата и формиата. Эти субстраты

могут играть роль дополнительного источника углерода. Они включают углерод из этих соединений в относительно небольших количествах по сравнению с фиксацией углерода из CO_2 — миксотрофия.

Есть микроорганизмы, которые растут только как миксотрофы, они не могут расти как чистые автотрофы или гетеротрофы. Если их соединить на чистые минеральные или органические среды, они погибают через некоторое время. Причины этого процесса до сих пор неизвестны. Нитрификаторы I фазы могут расти как миксотрофы, но для них это скорее исключение из правил.

Литотрофное окисление нитрита.

Нитрит окисляется до нитрата. На этом участке нитрификации клетки получают энергию. Нитрит окисляется специальной группой микроорганизмов, которые филогенетически не связаны с нитрификаторами I фазы и носят название нитрификаторы II фазы. Они все являются облигатными литоавтотрофами, за исключением 1 рода *Nitrobacter*, который может расти миксотрофно. Все остальные, в присутствии органических веществ не растут и даже подавляются в росте. *Nitrobacter* может использовать 10% углерода из органических веществ.

Систематика и характеристика нитрификаторов II фазы.

Включает роды: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira*. Среди *Nitrospira* был обнаружен организм, который окислял аммиак до нитрата полностью. Клетки нитрификаторов II фазы грамотрицательные, но в отличие от остальных грамотрицательных микроорганизмов не синтезируют муреин. Имеют полярный жгут, растут в виде биопленок, образуя скопление клеток на поверхности неподвижных объектов. В природе практически все микроорганизмы плавают в виде биопленок, а не в форме планктона.

Особенности окисления нитрита.

Окисление нитрита в нитрат в природе идет быстрее, чем накопление нитрита. Поэтому в природе он практически никогда не накапливается и его нельзя измерить. При низких концентрациях pH, нитрит диспропорционируется на нитрат и NO^- , а при pH = 7-9, служит субстратом для нитрификаторов. Находят их в аэробных и анаэробных зонах (анаэробные микроорганизмы, хемолитоавтотрофы, распространены повсеместно) в пресноводных и морских местах обитания.

Нитритоксидоредуктаза. Распределение в клетке других ферментов.

Нитритоксидоредуктаза содержит молибден, железо и серу. pH оптимум для окисления нитрита в нитрат = 8. Km до 3.6 мМ. У нитрификаторов II фазы обнаружено несколько цитохромов и цитохромоксидаз типа aa3, которые содержат 2 субъединицы (27, 40 Да). Пространственное распределение ферментов и путей окисления может быть представлено как:

Нитритоксидоредуктаза залегает в ЦПМ с выпячиваем в цитоплазму. В цитоплазме происходит окисление NO_2 в NO_3 , электроны поступают на aa3, после электроны поступают на цитохром C и цитохромоксидазу. На этом этапе из цитоплазматического пространства образуется градиент протонов, который затем реализуется в виде энергии.

Окисление нитрита происходит на уровне +400 мВ, электроны идут на цитохромоксидазу. Небольшое количество энергии идет на восстановление пиридиннуклеотида (-400 мВ), где действует обратный транспорт электронов. Для синтеза 1 моля пиридиннуклеотида, требуется окисление 5 молей нитрита в нитрат.

Углеродный метаболизм.

Углеродный метаболизм в основном связан с фиксацией CO_2 в цикле Кальвина. Для *Nitrobacter winogradskyi* был отмечен микотрофный рост. Некоторые способны расти гетеротрофно на средах с ацетатом и гидролизатом казеина (смесь аминокислот). Могут фиксировать углерод и пирувата, глицерина, формиата. Рост медленный, время генерации 30 — 150 часов. По сравнению с посевным материалом, количество клеток увеличивается в 10 — 50 раз.

Лекция 2. Серные бактерии

История открытия и характеристики анаммокс бактерий.

В 1995 году в голландском городе Делфт, была проведена конференция, посвященная 100-летию назначения Бейеринка профессором микробиологии в Делфтском университете (нидерл. Technische Universiteit Delft). Там, была показана фотография нового микроорганизма с необычной формой (клетка с кратерообразной выемкой). Через несколько лет была опубликована статья в журнале *Science* нового микроорганизма и путей метаболизма Анаммох бактерий. В течении несколько лет, ученые, которые занимались удалением азота из сточных вод, заметили, что азот исчезает. Они поставили эксперимент с мечеными соединениями N15. Этот процесс шел, только когда одновременно присутствовал аммиак и нитрит. Получилось, что на выходе получался азот с атомом из аммиака и нитрита. Этот процесс был ранее неизвестен. Удалось выделить микроорганизмы, который был назван Анаммокс.

Выделить чистую культуру не получалось. Самая чистая культура составляла 900 клеток Анаммокс и какая-нибудь одна другая. После, такие процессы были обнаружены на всех очистных сооружениях. Этот процесс довольно удобный — с его помощью удаляется восстановленный и окисленный азот. До сих пор все представители Анаммокс имеют статус Candidatus «Brocadia Anammoxidans», C. «Scalinduna Sorekinn» и другие. Все они относятся к специфической филогенетической ветви планктомицеты. Грамотрицательные автотрофные бактерии.

Анаммоксосома, ее функции.

В цитоплазме планктомицетов обнаружены большие вакуоли, которые получили название анаммоксосома. Могут занимать весь объем клетки. Считают, что эти образования, окружены белковой оболочкой, которая не позволяет выйти в цитозоль биологически вредному веществу гидразин. При окислении аммиака образуется гидразин N_2H_4 . В анаммоксосомах проходит следующий процесс:

В анаммоксосоме заложена гидразингидролаза. На гидразингидролазу поступает аммиак. С нитритвосстанавливающего фермента переходит 5 протонов. Из гидразингидролазы и аммиака образуется гидразин с образованием воды.

Гидразинокисляющий фермент окисляет гидразин с образованием азота и выделением 4 протонов, которые идут на нитритвосстанавливающий фермент

Сравнение окисления аммиака аэробами и анаэробами.

В таблице 2.1 представлено сравнение параметров окисления аммиака нитрифицирующими аэробными и анаэробными микроорганизмами.

Таблица 2.1. Сравнение параметров окисления аммиака аэробами и анаэробами

Параметры	Нитрификаторы NO_3 , NO_2	Anammox NH_3 , NH_4
Выделяемая энергия, кДж/моль	-275	-357
Выход биомассы, моль С/моль NH_3	0.08	0.07
Скорость процесса нМ/мин/мг белка	200-600	60
Скорость роста, час ⁻¹	0.04	0.002
Время удвоения, дни	0.73	10.6
Константа Михаэлиса, мкМ	5 — 2600	5

K_s для NO_2 , мкМ	-	25
K_s для O_2 , мкМ	10 — 50	-

Анаммокс бактерии имеют красный цвет, поскольку имеют цитохром С. Большая проблема — накопить реакцию и удержать её в реакторе. Но если случится резкое изменение pH, попадание кислорода, то бактерии умрут. Тем не менее, процессы с использованием Анаммокс-бактерий используются на сооружениях для очистки сточных вод.

Например, при строительстве Олимпийских сооружений в городе Сочи, в горах было построено очистное сооружение на основе Анаммокс-бактерий, в связи с присутствием большого количества рабочих, чтобы предварительно очистить отходы, прежде чем спускать их в речку Мзымту. Данное очистительное сооружение до сих пор находится в Красной поляне и очищает сточные воды. Технология очистки сточных вод с процессом Анаммокс постепенно внедряет свои технологии (Сколково, Южная Корея). Данная организация была удостоена правительственной наградой 2015 года.

Серные бактерии. Работы С. Н. Виноградского.

Серные бактерии (тиобациллы) используют неорганические источники для получения энергии. Аэробные организмы, среди которых выделяют истинные серные бактерии (окисляют восстановленное соединение серы — сероводород, атомарная сера, тиосульфат и др.) и морфологически-своеобразные серные бактерии, которые окисляют сероводород в две стадии:

1. Окисление сероводорода;
2. Откладывание гранул серы внутри клетки.

Виноградский стал работать в Страсбурге с представителем рода *Beggiatoa* — нитчатая бактерия, которая растет на поверхности осадков неглубоких каналов, где образуют беловато-сероватый налет.

Как сказал Пастер: «открытия приходят в подготовленный ум» — должна быть определённая степень подготовки, прежде чем сделать открытие. Виноградский проследил процесс окисления сероводорода с помощью плоскопараллельных капилляров (круглые капилляры преломляют свет, из-за чего сложно настроить микроскоп). Далее, плоскопараллельными капиллярами занимался Перфильев для работы с почвами. Стекло не пропускает кислород, благодаря чему можно смотреть за реакцией. Он пропускал с одного конца сероводород и следил за ростом бактерий. Клетки так же фиксировали CO_2 — он сделал открытие нового образа жизни. Он так же проследил процесс окисления серы до иона серной кислоты — аэробный процесс. Он вывел формулу хемолитоавтотрофии — окисления неорганических соединений, получения при этом энергии и фиксации CO_2 . Количественно определил параметры процесса, вывел формулу, по которой клетки фиксируют CO_2 и подсчитал количество кислорода, которое необходимо на фиксацию CO_2 .

Характеристика тиобацилл.

Потом, стали выделять организмы, которые окисляли сероводород до серной кислоты. В 1902 Натансон (Nathanson) выделил сульфидокисляющий микроорганизм из вод британского залива. В 1904 году Бейеринк выделил вторую культуру того же вида — *Thiobacillus tiobarans* и *T. Denitrificans*. В 1995 году была выделена чистая культура *Beggiatoa*, которая развивалась на дне океана в местах рядом с черными курильщиками, где жизнь растет и развивается на соединениях серы.

Тиобациллы раньше разделяли по предпочтениям к pH — щелочные, слабокислые и сильнокислые. pH до 1.5 — *Acidithiobacillus*. Виды, которые откладывают в себе серу, насчитывают около 10 видов. Они все грамотрицательные аэробы, бесцветные (в отличие от автотрофных микроорганизмов, которые метаболизируют соединения серы), растут на сероводороде и откладывают внутри себя серу. Клетки отличаются большим размером, и все виды относятся к микроаэрофилам — аэробы, которые не выдерживают высоких концентраций кислорода, предпочитают градиентные места обитания — граница перехода от аэробных к анаэробным средам (границы озер, осадков каналов и прочее). Из анаэробной части осадков, где происходит разложение органического материала, поднимается сероводород до границы раздела фаз (слой до 0.5 мм), где располагаются серные бактерии. Они получают необходимый свободно диффундирующий кислород из аэробной среды. Большая часть серных организмов обладают скольжением, что помогает им находить оптимальные по содержанию кислорода и сероводорода места обитания и там расселяться. Некоторые передвигаются с помощью жгутиков, некоторые неподвижны. 40% образуют нити, 20% — чехлы. Чистых культур выделено немного — из 10 родов только в 4 присутствуют чистые культуры. На этих чистых культурах доказано существование автотрофов, гетеротрофов и миксотрофов.

Род *Thiobacillus* и *Acidithiobacillus*, которые окисляют сероводород непосредственно до иона серной кислоты, распространены повсеместно. Исследователи считают, что именно эти микроорганизмы являются бактериальным фильтром — препятствуют проникновению большей части сероводорода в аэробную зону и атмосферу Земли. *Thiobacillus* осуществляют фильтрующую функцию в почвах и морях, где образуется больше всего осадков. Они существуют в любых реках и озерах. *Acidithiobacillus* селятся в условиях, где преобладают низкие значения pH — сольфатары (выделение сероводорода, приуроченное к вулканической деятельности), выкачивание сероводорода из подводных местообитаний, местообитания горячих серных источников с выделением сероводорода из Земли и окислением кислородом воздуха. В экспериментах было показано, что морфологически-своеобразные серные бактерии окисляют сероводород на 3 порядка быстрее, чем идет спонтанное окисление сероводорода на воздухе. Там, где он окисляется спонтанно, окисление идет до серы. Наиболее известный пример — Йеллоустонский национальный парк, который является кратером огромного вулкана, который продолжает быть активным. Геологи США опасаются, что если произойдет извержение этого вулкана, то погибнет около половины жителей США и будет нанесен непоправимый вред остальным государствам.

Сульфобациллы.

pH озер, которые образуются в местах залегания серы довольно низкий — до 1.5, которое является излюбленным местом обитания *Acidithiobacillus*. Было установлено, что при температуре ниже 50°, преобладают бактерии, при температуре выше 50° преобладают археи, которые более устойчивы к высоким температурам и низким pH.

Среди бактерий так же есть микроорганизмы, которые растут при высоких температурах — *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *S. Acidophilus*, *S. Sibiricus* и т.д. Сульфобациллы могут расти до температуры 55°. Представители рода сульфобацилл приурочены к местам, где проводят выщелачивание металлов из бедных руд.

Сероокисляющие археи.

Из местообитаний с температурами до 70-100° выделяют археи рода *Sulfolobus* и *Acidean* — два самых распространенных вида архей, которые произрастают при температурах 70-80°, окисляют серу, повышая таким образом pH среды.

Распространение и местообитание серных бактерий.

Acidithiobacillus можно встретить повсеместно, поэтому их выделяют из любых аэробных мест на Земле. Есть прием снижения pH у высокощелочных почв — вносят серный цвет в почву, что позволяет снизить pH почв. Спонтанный процесс, *Thiobacillus* находят свой природный субстрат — серу и начинают ее окислять с образованием серной кислоты, которая снижает pH почв.

Их находят в соленых болотах на хемоклине стратифицированных озер, где есть анаэробная зона, которая содержит сероводород и аэробную зону над ним. В некоторых морях (например, Черное море), раньше, анаэробную зону фиксировали на уровне 200 метров, на настоящее время — 70 м. То есть, в черном море происходит образование сероводорода. На границе сероводородного и аэробного слоя черного моря происходит массовое окисление сероводорода и других соединений серы. Второй процесс, протекающий в тех же условиях — аноксигенное окисление серы, при помощи аноксигенных автотрофов, которые используют сероводород или восстановленные соединения серы (тиосульфат) в качестве донора электронов для аноксигенного фотосинтеза (без выделения кислорода).

Микроорганизмы, которые окисляют восстановленные соединения серы присутствуют практически во всех местах обитания, их можно найти в мезофильных и термофильных местах обитания.

Микроорганизмы, которые относятся к морфологически-своеобразным серным бактериям так же распространены повсеместно, но проявляют фобию к кислороду и свету, поэтому они выбирают места обитания, где могут развиваться в темноте с низким содержанием кислорода, в отличие от тиобацилл, которые выдерживают высокие концентрации кислорода. Показано, что наилучшая концентрация кислорода для *Beggiatoa* — 0.6-6 %. Вокруг черных курильщиков открыты новые культуры микроорганизмов, относящихся к *Beggiatoa*, которые образуют колонии шириной (или радиусом) до 30 м и 60 м в высоту. Вокруг таких местообитаний складываются особенные экологические ниши, где развиваются наиболее развитые в филогенетическом плане микроорганизмы, а так же, креветки и рыбы, которые питаются этими микроорганизмами. Это интересно тем, что биомасса возникает не за счет фотосинтеза (солнечный свет проникает в глубину морской толщи на 300 м), а за счет первичной продукции микроорганизмов.

Биохимия окисления тиосульфата.

Биохимия окисления процессов тиосульфата у *Acidethiobacillus acidocaldus*:

Окисление тиосульфата происходит в цитоплазме на тиосульфатцитохромС-оксидоредуктазе с образованием тетратионата, который с помощью транспортного процесса переносится в цитозоль.

2 электрона переносятся на цитохромС, который занимает трансмембранное положение.

Тетратионат окисляется с образованием 6 электронов и 4 сульфидов и переносит электроны через трансмембранно-залегающий комплекс цитохромаВ и убихинона. Сульфид окисляется до сульфата, при этом образуется 8 электронов, которые переносятся на цитохромВ-убихиноновый комплекс, откуда 14 электронов переносятся на цитохромС.

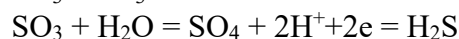
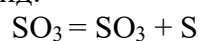
Цитохромоксидаза получает 14 электронов + 2 электрона. 16 электронов с цитохромоксидазы поступает на 4O_2 и превращаются в $8\text{H}_2\text{O}$. Сульфат-ион транспортируется в параплазматическое пространство и во вне клетки.

В этом процессе ионы тиосульфата окисляются до ионов сульфата с переносом электронов на цитохромоксидазу, которая переносит электроны на кислород с образованием $8\text{H}_2\text{O}$.

Для других видов пока данные процессы не установлены.

Диспропорционирование тиосульфата в анаэробных условиях.

В 1987 году, немецкие ученые Бак и Ципеонка (Cypionka), показали, что в анаэробных условиях тиосульфат может диспропорционироваться на сульфат и сульфид:



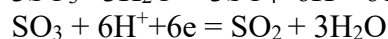
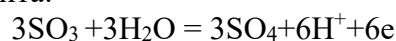
Суммарная реакция имеет вид:



Один атом серы окисляется, и клетка получает энергию в виде восстановительного эквивалента, которая идет на восстановление второго атома серы

Диспропорционирование сульфита в анаэробных условиях.

В 1987 году Бак и Финнинг зафиксировали процесс диспропорционирования сульфита:



Суммарная реакция имеет вид:



Три иона сульфида окисляются до серной кислоты, благодаря этому клетка получает энергию для восстановления серы до сероводорода.

Реакции диспропорционирования могут проводить аэробные и анаэробные микроорганизмы.

Лекция 3. Серные и железooksисляющие бактерии

Анаэробное дыхание серных бактерий.

В 2002 году появилась работа, доказывающая, что микроорганизмы *Acidithiobacillus*, которые ранее считались анаэробами, способны к аэробному дыханию. При этом, аэробное дыхание может осуществляться за счет восстановления элементарной серы и восстановления трехвалентного железа. При окислении водорода восстанавливается сера и трехвалентное железо.

Аэробное дыхание серных бактерий.

При неблагоприятных условиях (аноксигенных), но при наличии приемлемых доноров электронов, начинаются процессы, которые позволяют серным бактериям переживать неблагоприятные условия и занимать более выгодные экологические ниши. Если рассматривать анаэробное дыхание этих микроорганизмов — когда они окисляют двухвалентное железо до трехвалентного — то в качестве фермента, который занимается осуществлением данного процесса у них выступает рустицианин (rust — ржавчина) — небольшой белок 28 кДа расположенный в периплазматическом пространстве и устойчивый к низкому pH (до 2). Поэтому, рустицианин восстанавливает при окислении железа цитохромС, а так же, связан с переносом электронов на цитохромС.

Углеродный метаболизм серных бактерий.

Углеродный метаболизм микроорганизмов связан с наличием в них цикла Кальвина. Чтобы сделать этот процесс более интенсивным и выгодным для клетки, они научились запасать первый фермент — РуБисКО (рибулозобисфосфаткарбоксилаза) в больших количествах в цитозолях клетки, формируя специальные внутриклеточные компартменты — карбоксисомы.

Карбоксисомы — ограниченные от остального цитозоля структуры, которые напоминают вытянутые шестигранные кристаллы, ограниченные от остального цитозоля белковой мембраной, которая не позволяет увеличивать осмолярность цитозоля и, таким образом, сохранять это содержимое цитозоля в нужных пределах по осмолярности. Этот механизм позволяет концентрировать значительное количество первого фермента в активном кристаллическом состоянии, что позволяет с большей эффективностью фиксировать CO_2 . Такие же карбоксисомы находят у нитрификаторов, цианобактерий и других автотрофных организмов

Серные бактерии в биометаллургии.

Тиобациллы и другие серные бактерии применяют в металлургии для выщелачивания металлов, когда из бедных полиметаллических руд нужно извлечь металлы, но строить шахты или добывать открытым способом с дальнейшей переплавкой экологически не выгодно. Поэтому, металлы концентрируют с помощью микроорганизмов, в так называемой гидрометаллургии по следующим притекающим реакциям:

1. $\text{FeS}_2 + 3 \frac{1}{2} \text{O}_2 = \text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$
2. $\text{S}^0 + 1 \frac{1}{2} \text{O}_2 = \text{H}_2\text{SO}_4$
3. $\text{FeSO}_4 + \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{H}_2\text{O}$
4. $\text{MeS} + 2\text{Fe}^{3+} = \text{Me}^{2+} + 2\text{Fe}^{2+} + \text{S}^0$

Металлы принимают участие в окислении трехвалентного железа до двухвалентного железа, окисляют серу, сульфид железа до серной кислоты. Данные реакции протекают при низком значении pH, что позволяет выщелачивать рН почв. Раствор металлов осаждают, выпаривают и отправляют в дельнейшую металлургию. Это очень эффективный, сравнительно дешевый, безопасный способ выделения металлов из бедных руд. Выделяется повсеместно. Был известен ещё в средние века, когда люди выяснили, что в кислых потоках, может выщелачиваться медь. Бывает, осуществляется так называемое «кучное» выщелачивание, когда бедные руды поливают сверху водой, содержащие микроорганизмы, в кучном пространстве перемешивают или запускают внутрь куч трубы с кислородом (аэробный процесс, который требует большого количества кислорода), таким образом, преобразуя металлы в жидкость и вымывая их из руды. Бывает, осуществляют так называемое, чановое выщелачивание, когда ту же самую руду складывают в чаны и поддерживают оптимальные pH и температуру (более дорогостоящий, но более контролируемый процесс). Подземное выщелачивание — бурят несколько отверстий в земле, по которым с одной стороны в руду подводят раствор вместе с микроорганизмами, а с другой стороны собирают раствор в виде растворенного железа. Такой процесс осуществляют микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям металла. Поэтому, необходимо подбирать микроорганизмы, устойчивые к высоким содержаниям железа, кобальта, никеля, меди, цинка

Железоокисляющие бактерии.

Железо- и марганецокисляющие микроорганизмы.

О том, что микроорганизмы могут участвовать в окислении железа, было известно уже в 1836 г., когда Эренберг выделил и описал микроорганизм *Gallionella ferruginea* — своеобразный по морфологии организм, имеющий своеобразные места обитания. Микроорганизм имеет форму, похожую на кофейное зерно, окисляет железо и выделяет нитевидные тяжи, которые пропитываются трехвалентным железом. Константа растворимости трехвалентного железа 10^{-7} — практически нерастворимое и недоступное для микроорганизмов соединение при нейтральных значениях pH. Эти соединения откладываются в полисахаридных тяжах, которые становятся хрупкими, могут отламываться. Клетка таким образом избавляется от продуктов реакции окисления железа. Клетки получают метаболическую энергию и проживают в местах обитания, которые приурочены к выходу железосодержащих вод — рудники, которые выходят на поверхность и содержат двухвалентное железо из областей, где вода встречается с кислородом. Двухвалентное железо в местах, где pH близки к нормальному и в присутствии кислорода быстро окисляется до трехвалентного железа и быстро выпадает в осадок (пятна ржавчины).

Gallionella ferruginea — один из немногих организмов, проживающий в близких к нейтральным значениям pH, поэтому он использует осадок — охру, который образуется на подводных частях растения, камнях. *Gallionella* может найти субстрат для окисления железа в местах, где кислород не успел насытить воды и воздействовать на двухвалентное железо. В 1913 году, голландский ученый Бейеринк выделил бациллу, которая так же окисляет двухвалентное железо в условиях низкого содержания кислорода и при нейтральных pH — пограничные состояния анаэробной зоны.

Большинство настоящих окислителей железа, которые могут окислять серные соединения и двухвалентное железо, живут в условиях, когда pH среды обитания ниже 5 (может достигать до 1.5), поскольку при таких условиях, железо всегда находится в двухвалентной форме и у них всегда есть субстрат для получения энергии. Этот прием используют для борьбы с ржавчиной, когда обрабатывают потеки ржавчины кислотными растворами органических кислот (ацетат, уксусная, лимонная кислота) или минеральных кислот (соляная, фосфорная).

Фосфорная кислота применяется в промышленности для обработки автомобилей, которые образуют соединения фосфора с железом в виде тонкой пленки, препятствуя контакту железа с воздухом и образованию ржавчины на кузовах автомобилей (фосфатирование кузовов). В природе, двухвалентное железо представлено в следующих состояниях:

$\text{Fe}(\text{OH})_2$ — гидроксид железа

$\text{FeO}(\text{OH})$ — гоулетит

FeO — оксид железа

Fe_3O_4 — магнетит

Fe_2O_3 — гематит

FeS — троилит/пирретин

FeS_2 — марказит/пирит

FeCO_3 — сидерит

FeCl_2 — лауренсит

FeCl_3 — молвсит

CuFeS_2 — халькопирит

Соединений двухвалентного железа в природе довольно много. Микроорганизмы, могут всегда найти субстрат для своего роста и окисления. Железоокисляющие микроорганизмы присутствуют всюду, поскольку везде могут образовываться восстановленные и окисленные формы железа. Более всего эти организмы предпочитают кислые зоны, где мала вероятность окисления железа при встрече с кислородом — кислые шахтные воды, кислые дренажные системы, кислые болота, закисленные озера. В остальных местах обитания двухвалентное железо практически недоступно, поскольку окислено в осадок оксида железа в виде охры. Клетки, которые живут при нейтральных значениях pH испытывают дефицит железа. Железо необходимо всем дышащим кислородом организмам (человеку нужно железо, поскольку оно входит в состав гема, который входит в состав гемоглобина, который является основным переносчиком кислорода и присутствует у всех организмов, который имеют кровеносную систему).

Сидерофоры.

Микроорганизмы решают проблему транспорта нерастворимого железа в клетке с помощью специальных ферментов или кофакторов, которые позволяют сорбировать на себе трехвалентное железо, затем переносить его в клетки, высвобождая. Такие организмы были названы общим словом сидерофоры. Они ответственны за транспорт железа в клетки микроорганизмов. Человек и другие млекопитающие получают железо с пищей, поэтому красное мясо полезно для питания человека. Сидерофоры обладают уникальным свойством — сродство трехвалентному железу гораздо выше, чем к двухвалентному, поэтому они сорбируют на себе трехвалентное железо в клетке.

Трехвалентное железо окисляется в клетке до двухвалентного, оно отщепляется от сидерофоров и сидерофор готов для нового переноса атома железа.

Когда в окружающей среде мало трехвалентного железа, сидерофоры находятся в форме челнока на поверхности клетки, так, они могут отщепляться от клетки и путешествовать, пока не найдут трехвалентное железо.

Железоокисляющие бактерии, окисляющие другие металлы.

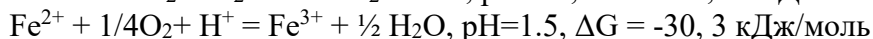
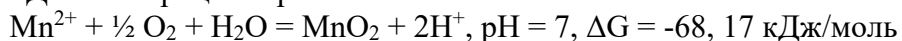
Микроорганизмы, которые окисляют железо могут окислять и другие металлы. У них функционирует цикл Кальвина, но жизнь у них не простая, поскольку в кислых условиях, константа растворимости CO_2 низка, и надо постараться, чтобы поймать субстрат для углеродного метаболизма. У них так же образуются карбоксисомы с накоплением РубисКО.

Ацидофильные железоокислители.

Ацидофильные железоокислители в природе растут за счет окисления пирита. При окислении пирита они одновременно окисляют железо и сульфид до серной кислоты, которая закисляет местообитание. Если вода (водопроводная или для промышленных процессов) содержит железо, то эти организмы растут и содержат в себе гликокаликс, трубы постепенно зарастают изнутри, появляется ржавчинный цвет у воды — либо надо менять источник воды, либо сами трубы. Рост железоокисляющих бактерий — вредный процесс для хозяйственной деятельности человека. С этим процессом борются, но микроорганизмы не сдают своих позиций.

Марганецокисляющие бактерии.

В 1901 году Джексон выделил микроорганизм, который окислял двухвалентный марганец до четырёхвалентного — *Crenothrix manganifera*. С тех пор ведутся поиски организмов, которые окисляют и другие металлы с переменной валентностью. С точки зрения термодинамики, окисление двухвалентного марганца в четырехвалентный, более энергетически выгодно, чем окисление двухвалентного железа в трехвалентное железо. Данный процесс протекает по схеме:



Энергия близка к энергии, необходимой для синтеза одной молекулы АТФ. При окислении марганца необходимо учитывать, что при pH больше 8, марганец быстро самопроизвольно окисляется до Mn^{4+} . А при pH ниже 6, его окисление становится термодинамический не выгодно. Поэтому окисление марганца происходит в диапазоне pH 6-8, когда для них энергетически выгодно получать энергию и запасать е для своего биосинтеза.

Бактерии, окисляющие другие металлы.

Таблица 3.1. Окислители металлов

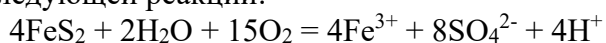
Бактерии	Окисляемый органический субстрат	Морфология	Местообитание
Автотрофы			
<i>G. ferruginea</i>	Fe^{2+}	Почковидные клетки	Пресная вода (низкое содержание O_2)

<i>Leptospirillum ferroginia</i>	Fe^{2+}	Изогнутые палочки	Шахтные воды
<i>Stibiobacter senarmontii</i>	St^{3+}	Плеоморфные палочки	Пресная вода
<i>Acidethiobacillus ferrooxidans</i>	Fe^{2+} , S^0 , Se^0 , U^{4+}	Палочки	Кислые шахтные воды
Гетеротрофы			
<i>Bacillus sp.</i>	Mn^{2+}	Палочки	Пресная вода
Есть много организмов, у которых не подтверждено использование метаболической энергии <i>Arthrobacter sp.</i>	Mn^{2+} (?)	? Плеоморфные палочки	Почва
<i>Citrobacter sp.</i>	Mn^{2+} (?)	Палочки	Почва
<i>Metallogenium personatum</i>	Mn^{2+} (?)	Палочки	Пресная вода
<i>Oceanospirillum</i>	Mn^{2+}	Искривленные палочки	Морские местообитания
Археи			
Автотрофы			
<i>Sulfobacillus acidocaldarius</i>	Mn^{2+} , Fe^{2+} ? S^0	Лопостные, коккоидные	Горячие источники (которые могут быть кислые, серосодержащие)

Железо и марганец не единственные металлы, которые могут быть подвержены окислению. Все металлы с переходной валентностью могут быть окислены микроорганизмы. Однако, получение метаболической энергии в данном случае необходимо доказывать. К таким металлам относятся медь, уран, мышьяк, сурьма, молибден, селен, кобальт, цинк, никель, свинец.

Рост железоокисляющих бактерий.

В природе, у микроорганизмов, которые окисляют железо, рост происходит за счет следующей реакции:



Окислительно-восстановительный потенциал Fe^{2+} находится в районе +650 мВ, кислорода и воды +720 мВ — это очень близкие по потенциалы значения. Поэтому, микроорганизмы, которые окисляют двухвалентное железо, должны окислить много железа, чтобы получить энергию из разности потенциалов. У них работает один пул фосфорилирования железа, и они должны переработать большое количество железа, чтобы получить энергию. Однако, при окислении пирита, уровни входа потенциалов в электрон-транспортную цепь разные. Сера окисляется в сульфат в 6-электронном окислении. Большая часть электронов попадает на более высокие по потенциалу энергетические пути.

Шкала окислительно-восстановительных потенциалов бактерий.

Железо (+680 мВ), электроны попадают в электрон-транспортную цепь и попадают на кислород. Это окисление может приводить к созданию потенциала, который реализуется в АТФ/АДФ-пуле (700 мВ). Энергия может расходоваться на обратный транспорт электронов до уровня восстановленных пиридиннуклеотидов (-40 мВ), которые идут на цикл Кальвина и на биосинтез (+60 мВ). Пул АТФ/АДФ распределяются на фиксацию CO_2 и биосинтез.

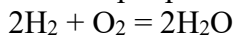
Количество двухвалентного железа, которое должно быть окислено до фиксации CO_2 , требуется окислить около 50 М Fe^{2+} (2.5 мг), что будет эквивалентно 1 М CO_2 (48 гр). Железоокисляющие микроорганизмы производят большое количество трехвалентного железа. Поэтому, процессы, которые они производят, весьма значительны, хотя растут клетки скудно. Рассмотреть клетки в охре весьма сложно и трудно.

Кофактор, который окисляет трехвалентное железо в двухвалентное железо — рустицианин. У *Acidithiobacillus ferrooxidans* он выделен и очищен. Рустицианин 16.3 кДа, относится к голубым медьсодержащим белкам, содержит в активном центре медь и имеет голубой оттенок при выделении. Расположен в периплазматическом пространстве. Окислительно-восстановительный потенциал +680 мВ — близок к потенциалу двух/ трехвалентного железа, устойчив при низких рН (до 2) и сохраняет ферментативную активность.

Водородные бактерии.

Водородные бактерии или бактерии гремучего газа. Эти микроорганизмы — аэробы, проводят реакцию гремучего газа без взрыва. Для проведения реакции гремучего газа, аппарат Киппа заряжают серной или соляной кислотой, бросают туда цинк, выделяется водород, который собирают и через трубочку запускают в пустую перевернутую консервную банку. Сверху ставят спичку, залитую парафином. Через 2-3 минуты, когда банка наполнена, спичку снимают и подносят зажигалку и банка взлетает в потолок — реакция гремучего газа, которая протекает со взрывом на воздухе.

Микроорганизмы, которые осуществляют окисление водорода на воздухе, окисляют эту же реакцию последовательно, поэтому взрыва не происходит, вместо этого, происходит запасание огромного количества энергии, поскольку окислительно-восстановительный потенциал пары водород-протон +400 мВ, а потенциал кислород-вода +820 мВ. Поэтому микроорганизм может синтезировать до 4 молей АТФ. Реакция окисления микроорганизмами водорода:



Многие микроорганизмы способны окислять водород в аэробных условиях, образовывать большую биомассу. В биотехнологии этим воспользовались, когда использовали процесс выращивания микроорганизмов в ферментерах на минеральной среде, содержащей в газовой фазе водород, кислород и CO_2 . Автотрофные организмы потребляли водород с образованием воды, в результате чего образовывалась энергия, которая шла на фиксацию углерода. Биомасса при выращивании водородоокисляющих организмов на средах с водородом и CO_2 составляла 30 гр/л, но если их выращивать на средах с глюкозой (факультативные автотрофы), то они образовывали большую биомассу — до 60 гр/л. Оказалось, что эти организмы способны создавать природный пластик — поли-бета-гидроксимасляная кислота — при создании условий, когда у

организмов много углерода, но мало азота в среде. Организм это чувствует и начинает запасать углерод на будущее, когда перейдет в неблагоприятные условия. Он накапливает углерод в виде поли-бета-гидроксимасляной кислоты — полимер оксимасляной кислоты с длиной до 200 звеньев. Накапливаемый полимер легко экстрагируется хлороформом, затем хлороформ испаряют и получают поли-бета-гидроксимасляную кислоту — биоразрушаемый полимер. Из него можно делать пакеты для переноски продуктов, хирургические саморастворяемые нити, покрытие различного рода внутренних протезов (невозможно отлить протез точно по суставу пациента, пластик постепенно будет растворяться и заменяться соединительными тканями пациента). Организму *Alcaligenes eutrophus* можно давать органические кислоты и получать разные модификации пластика — разные сочетания валериановой и масляной кислоты дает разные свойства. Эти организмы, когда растут на глюкозе производят до 90% поли-бета-гидроксимасляной кислоты. Исследование водородных бактерий началось в лаборатории профессора Ганса Шлегеля, который приобрел всеобщую известность за публикацию учебника «Общая микробиология», который вышел в ФРГ в начале 1960-х годов, выдержал 6 изданий при жизни Шлегеля. 7 издание в 2006 году, написали его последователи и назвали «Микробиология Шлегеля».

В его лаборатории начались первые исследования микроорганизма, который популярен во всем мире из-за способности образовывать поли-бета-оксимасляную кислоту.

Лекция 4. Водородные бактерии

Биология водородной бактерии *Alcaligenes eutrophus*.

Наиболее изученным микроорганизмом является *Alcaligenes eutrophus*, был выделен в лаборатории Ганса Гетера Шлегеля. Этот организм является типичным представителем водородных бактерий — аэроб, растет на полностью минеральных средах, в газовую фазу которых входит CO_2 , водород и кислород. Он выдерживает высокие концентрации водорода и кислорода, растет быстро и дает большую биомассу. Были проведены исследования, позволяющие получить биомассу из неорганического соединения — водорода, для получения белка. Белок получался высокого качества — до 60% в клетках было истинного белка (для сравнения, в говядине — 21-25% белка). Поэтому, это было перспективной добавкой в корм скота. Такие исследования были проведены в Красноярске в полупромышленных масштабах для получения белка, пока не были замечены феномены, когда микроорганизмы могут синтезировать поли-бета-гидрокси-масляную кислоту. С тех пор, исследования повернулись в другую сторону, стали исследовать возможность синтеза природных биоразлагаемых полимеров — природного пластика, которые в очищенном состоянии проявляют свойства термопластика. Были сделаны попытки создания упаковок для одноразовых бытовых препаратов (шампунь, зубная паста), чтобы при попадании во внешнюю среду они не накапливались, а быстро разлагались. Потом, стали применять биопластик в медицинских целях — хирургические нити, поддержка и формирование внутренних протезов человека. Такие исследования в биомедицинских целях ведутся в Красноярске.

Систематика водородных бактерий.

Систематически, водородные бактерии не попадают в определённую филогенетическую группу — свойство использовать водород распределено по многим филогенетическим линиям среди бактерий. Кроме того, водород могут использовать не только аэробы, но и анаэробы, поскольку водород образуется в анаэробных условиях брожения и потребляется в аэробных же условиях — существует много организмов, которые способны метаболизировать водород в анаэробных условиях (метаногены, сульфатредукторы, нитратредукторы, ацетогены). Водород так же используется железобактериями. Водород является выгодным субстратом для получения энергии в аэробных и анаэробных условиях.

Местообитание водородных бактерий.

Водородные бактерии живут на границе раздела фаз аэробной и анаэробной среды — где невысокие концентрации кислорода и высокие концентрации водорода (которые недоиспользованы в анаэробных условиях) поднимаются до границы раздела фаз. Аэробные водородокисляющие бактерии имеют преимущества в этой экологической нише и с высокой скоростью потребляют водород. Водород, из аэробных зон практически не попадает в атмосферу, поскольку потребляется в анаэробной среде и так же потребляется с высокой скоростью на границе раздела фаз.

Примеры аэробных водородных бактерий.

Автотрофы:

Аэробы:

Alcaligenes eutrophus, *A. Gidrogenophilus* — использует цикл Кальвина, грамотрицательный.

Arthrobacter I1/X — использует цикл Кальвина, грамположительный

Hydrogenobacter Thermophilus — использует восстановительный цикл трикарбоновых кислот (цикл Арнона), грамположительный

Mycobacterium Gardonea — использует восстановительный цикл Кальвина, грамположительный

Псевдомонады

Анаэробы:

Ацетогены: *Acobacterium wieringe*, *A. Woodii*, *Clostridium aceticum* — ацетилКоА путь фиксации CO₂

Метаногены: *Methanobrevibacter arboriphilicus*, *Methanosarcina barkeri* — ацетилКоА путь фиксации CO₂

Сульфидогены: *Desulfobacter hydrogenophilus*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcima* — восстановительный цикл трикарбоновых кислот (цикл Арнона)

Нитратредукторы — факультативные аэробы, которые используют водород для своего роста.

Количество микроорганизмов, которые могут использовать водород в аэробных и анаэробных условиях огромно. Водород является привлекательным субстратом для роста, поскольку в нем заключена большая энергия. Может легко окисляться ферментами — гидрогеназами.

Гидрогеназы.

Когда исследовали *Alcaligenes eutrophus* обнаружили, что у него есть две гидрогеназы: растворимая и не связанная с мембраной, вторая, была связана с мембраной и не растворима. Нерастворимая гидрогеназа была связана с получением энергии микроорганизмом. Было доказано, что после окисления водорода, она поставляет электроны в электрон-транспортную цепь, а образовавшийся протон идет на формирование протонного градиента, в отличие от растворимой гидрогеназы, которая восстанавливала пиридиннуклеотиды. NADH практически полностью использовался в качестве восстановительных эквивалентов в цикле Кальвина для фиксации CO₂.

Эти две гидрогеназы разнесены в пространстве клетки, каждая работает на своем уровне. Обе никельсодержащие. Растворимую гидрогеназу изучали больше, нашли способы полной очистки и обнаружили, что она содержит 1 ФМН, 2 железосерных центра FeS и три железосерных центра, которые имеют конфигурацию Fe₄S. Этот фермент содержит 4 различных полипептида α63, β56, γ30, Δ26 кДа, суммарная молекулярная масса около 200'000 кДа. Часть генов, которые кодируют ключевые ферменты цикла Кальвина расположены на мегаплазмиде. Кроме того, некоторые ферменты промежуточных реакций так же локализованы на мегаплазмиде.

Было показано, что *Alcaligenes eutrophus* фиксируют CO₂ через цикл Кальвина. Могут так же быть и факультативными гетеротрофами — расти за счет потребления сахаров. В этом видятся экологические преимущества, которые присущи этим микроорганизмам в условиях, когда заканчивается водород в среде обитания.

Схема электрон-транспортной цепи *Alcaligenes eutrophus*.

Водород передает гидрогеназе 2 электрона, 2 образовавшихся протона идут на формирование протонного градиента.

2 протона идут на растворимую гидрогеназу и идут на восстановление пиридиннуклеотида. NADH идет на формирование клеточного материала при помощи АТФ и CO_2 .

2 электрона с мембранной гидрогеназы идут на убихинон, туда же поступают 2 протона из цитозоля. Передача электронов на комплекс цитохромов BC1 — цитохром C — цитохром AA3, при этом возникает градиент протонов.

Цитохромоксидаза восстанавливает кислород.

Перенос протонов через АТФазу, протоны заканчивают свой путь на формировании АТФ. АТФ + CO_2 + NADH потребляются в цикле Кальвина.

Таким образом, цитохромоксидаза поставляет электроны, которые образует гидрогеназа, которая имеет пул убихинона. Перенос электронов заканчивается на АТФазе.

Биология водородной бактерии *Alcaligenes eutrophus*.

Некоторые водородные бактерии имеют только одну гидрогеназу (не имеют растворимую гидрогеназу). Если они переносят электроны на уровень убихинонов, то у них должен возникать обратный транспорт электронов с затратой энергии в виде АТФ для образования NADH, которые потребляются в цикле Кальвина.

Hydrogenobacter thermophilus — был выделен японскими авторами в 1985 году и с тех пор с ним работают, поскольку он интересен по своей физиологии и биохимии. Аэроб, который растет при высоких температурах (70°), при которых водород плохо удерживается в растворенном состоянии в среде, поэтому нужно постоянно барботировать среду потоком водорода, автотроф. Растет при концентрации $\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{O}_2$ — 75:10:15, то есть, растет при высоких концентрациях водорода, но не выдерживает нормальных условий кислорода, поэтому при его выращивании, концентрацию кислорода искусственно снижают. *Hydrogenobacter thermophilus* является уникальным организмом, поскольку использует восстановительный цикл трикарбоновых кислот, или цикл Арнона.

Цикл Арнона был впервые открыт у анаэробов, зеленых серных фототрофных бактерий, которые используют восстановленные соединения серы в качестве источника электронов и не образуют кислород. После, этот цикл обнаружили у сульфатредукторов и других анаэробов. Было очень интересно и необычно встретить этот цикл у аэробного организма, к которому относится *Hydrogenobacter thermophilus*. До сих пор не дают четкого объяснения, почему цикл Арнона может использовать аэробный организм, поскольку некоторые стадии идут с использованием ферментов ферредоксинов, которые являются аналогами пиридиннуклеотидов — могут восстанавливаться, окисляться, являются донорами электронов и протонов у аэробов. Ферредоксины — белки которые небольшой молярной массы, находятся у анаэробов, аноксигенных автотрофов.

Биология *Bradyrhizobium japonicum*.

Bradyrhizobium japonicum симбионт бобовых растений, формирует клубеньки (специальные выросты корневой ткани, где располагаются клетки *Bradyrhizobium japonicum*). При поникании внутрь растения они меняют свою внешность и морфологию, становясь бесформенными организмами — бактериоидами, в которых происходит фиксация атмосферного азота.

При фиксации атмосферного азота всегда происходит выделение водорода — так устроена нитрогеназа, которая участвует в фиксации атмосферного азота. На 1 молекулу аммиака выделяется 1 молекула водорода.

Bradyrhizobium japonicum научился поглощать выделяемый гидрогеназой водород. Он так же использует водород в качестве источника энергии, поэтому, такие организмы имеют экологические преимущества по сравнению с другими нитратредукторами, которые не имеют гидрогеназных систем, направленных на поглощение водорода. Эти организмы с дополнительной гидрогеназой имеют экологические преимущества, выражающиеся в большей энергии для роста и развития, поэтому, они могут быстрее завоевывать экологические ниши по сравнению с конкурентами.

Долгое время не могли выделить гидрогеназу, потому как когда *Bradyrhizobium japonicum* выращивается на среде с кислородом, активность его гидрогеназы снижена. При снижении концентрации кислорода до 11%, в газовой фазе, начинается экспрессия гидрогеназы. Выяснили, что экспрессия идет только при сниженной концентрации кислорода — единственный фактор, влияющий на активность генов, участвующих в синтезе гидрогеназы. Активность генов подавляется при помощи глутамата. Дыхательная система есть, когда клетки растут в виде бактериоидов в тканях растения. Свободные клетки проявляют дыхание, имеют дыхательную цепь с высоким содержанием цитохромаА.

При выращивании на средах с низким содержанием кислорода, было обнаружено, что клетки имеют разветвленную, содержащие ризоиды, оксидазу. На уровне оксидазы поток электронов разветвляется на 2 независимые оксидазы — цитохромы типа А и типа О, которые, очевидно, так же контролируются содержанием кислорода.

Практическое применение водородных бактерий.

Практическое применение водородных бактерий главным образом задействовано на образование белка.

Для таких крупномасштабных производственных процессов выгодно получать низкостоящий субстрат, который можно получать на гидроэлектростанциях. При электролизе воды получается водород и кислород, оба субстрата затрачиваются на рост водородных бактерий. Так же можно затрачивать CO_2 , выделяющийся с близлежащих теплостанций. Так, CO_2 , выделяющийся в атмосферу, будет поступать в ценный продукт — белок.

В замкнутых пространствах были эксперименты по потреблению CO_2 — космические станции, где экипаж при дыхании постоянно выделяет CO_2 , что является большой проблемой — снабжение экипажа кислородом и удаление CO_2 . Одним из способов решения проблемы, было применение водородных бактерий, поскольку они потребляют CO_2 , но также потребляют и кислород. Кислород можно получать при помощи электролиза воды.

На подводных лодках экипаж выделяет CO_2 . Обычно, его связывали с поглотителями — щелочью. Если использовать водородные бактерии, то они будут потреблять CO_2 и он не будет выбрасываться за пределы корабля. Процесс выброса CO_2 за пределы корабля улавливается датчиками, что делает возможным отследить траекторию движения подводных лодок.

Когда водородные бактерии растут на бедных минеральных средах, они образуют биопластик, около 10% в клетке. При пересадке на углеродный субстрат, где меняют содержание углерода и азота в среде, что важно для регулирования процесса, водородные бактерии увеличивает синтез биопластика до 90% от своего веса. Клетки на приросте в средах с глюкозой могут образовывать до 60 гр. кл/сухая масса, что является высоким выходом получения природного пластика.

Карбоксидобактерии.

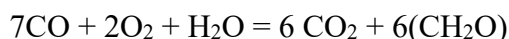
Карбоксидобактерии — используют в качестве субстрата угарный газ, CO. CO является сильным ингибитором цитохромоксидазы. Конкурентно воздействует на активный центр цитохромаАА3 (цитохромный центр митохондрий). Гемы типа А ингибируются CO. В присутствии концентрации CO более 5%, кислород дышащие организмы начинают постепенно угнетаться, и наступает смерть. Антидотом для CO является кислород — искусственное продувание. Часто, угарным газом отравляются люди в замкнутых помещениях, которые не умеют топить печь. Если закрыть воздухоотвод раньше, то начинается неполное сгорание дров или углей, и люди угорают вплоть до смертельного случая. Люди пытаются закрыть печь раньше, потому как так, уголь сможет отдать больше тепла. Правильное время определения закрытия печи плохо соблюдают городские жители.

Второй случай — угорание от газа в гараже, когда запираются в автомобиле, включают его для тепла и закрывают гараж.

СО-окисляющие организмы, истинные карбоксидобактерии, являются аэробами. Проводят окисление CO по следующей реакции:



Довольно высокие количество выделяемой энергии, что сопоставимо с энергией 4 АТФ. Если карбоксидобактерии растут автотрофно, фиксируя далее CO₂ в цикле Кальвина:



(CH₂O) — материал клетки. В таком состоянии находится углерод в клетке живых организмов.

Характеристика карбоксидобактерий.

СО-дегидрогеназа, особая дегидрогеназа, которую находят в клетках карбоксидобактерии. Так же ее встречают у автотрофов, которые в процессе аноксигенного фотосинтеза используют CO в качестве донора электронов и СО-дегидрогеназу. Она была выделена и имеет массу 230 кДа.

Примеры карбоксидобактерий.

СО-окисляющие микроорганизмы представлены в таблице 4.1

Таблица 4.1. СО-окисляющие микроорганизмы

Физиологическая группа	Бактерии
Типичные карбоксидотрофы	<i>Alkaligenes carboxydus</i> <i>Arthrobacter 11/X</i> (может расти как водородиспользующий организм и как карбоксидиспользующий) <i>Carboxidum Shlegelii</i> Псевдомонады

Азотфиксирующие организмы	<i>Azomonas B1, C2</i> <i>Azotobacter A1</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Метанотрофы	<i>Methylomonas methanica, methylosinus trichosporium</i> , ацетогены, клостридии
Метаногены	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , <i>Metanosarcina barceri, Metanotrix songenii</i>
Фототрофы (аноксигенные)	<i>Rhodociclus gelatinosus, Spirulina</i>
Сульфатредукторы	<i>Desulphovibrium vulgaris</i>

Метанотрофы могут окислять CO, но не растут за счет CO.

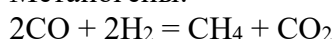
Свойство окислять CO распространено практически по всему филогенетическому древу бактерий. Очевидно, оно передавалось друг другу посредством латерального переноса гена. Ген, кодирующий CO-дегидрогеназу легко передается от вида к виду.

Окисление CO различными группами бактерий.

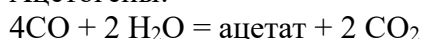
При окислении CO метанотрофы проводят реакцию:

$CO + O_2 + \text{метанмонооксигеназа (восстановитель)} = CO_2 + H_2O + \text{восстановитель (окисленный)}$

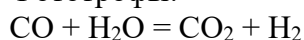
Метаногены:



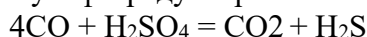
Ацетогены:



Фототрофы:



Сульфатредукторы:



Молекулярная масса CO-дегидрогеназы аэробов составляет 230-300 кДа, состав субъединиц ($\alpha\beta\gamma$)₃, следующий, они содержат 3 молибдена в активном центре, 8 Fe, 7 ½ Zn, 2S.

Железо-серный центр CO-дегидрогеназы может быть локализован в хромосоме и на плазмидах. Поэтому, можно получить мутанты из плазмид, тогда, из карбониксидобактерий получают гетеротрофы, не способные расти на средах с CO, становятся гетеротрофами. Гены RuBisCO так же могут быть локализованы на бактериях. Плазмиды карбониксидобактерий варьируют от 3.5 до 558000 пар нуклеотидов.

CO является следовым газом в атмосфере, его концентрация около 0.5 — 100 * 10⁻⁶ % по объему. CO появляется в атмосфере за счет вулканической деятельности, лесных пожаров — 9.7-11.7 * 10⁻⁸ тонн CO/год выделяется. CO выделяется в результате автомобильной деятельности, с газовых тепловых электростанций. На то, что CO в некоторых местах города имеет повышенные концентрации, свидетельствует о том, что CO карбониксидобактерии присутствуют в больших количествах в придорожных почвах. В лесах и больших ботанических садах карбониксидобактерий практически нет. Многие карбониксидобактерии содержат гидрогеназы — ферменты, которые позволяют им расти за счет водорода.

Применение карбоксидобактерий.

В настоящее время их рассматривают как перспективные источник для получения топливного этанола, посредством восстановления ацетата. В определённых условиях, клетки ацетогенов могут превращать ацетальдегид в этанол. Уже выращивают ацетогены на синтез-газе металлургических заводов.

Можно получать белок ацетогенов за счет использования CO. Некоторые организмы растут на 100% CO, превращая его в ацетат и образуя биомассу.

Лекция 5. Фотосинтез

Оксигенный фотосинтез.

Оксигенный тип фотосинтеза проводится растениями и цианобактериями. Вода окисляется до кислорода, является донором электронов для фотосистемы 2.

Аноксигенный фотосинтез.

В аноксигенном фотосинтезе кислород не участвует, не выделяется в процессе аноксигенного фотосинтеза. Донором электронов являются восстановители — восстановленное соединение серы, водород, органические аминокислоты.

Возникновение фотосинтеза в эволюции.

Фотосинтез на Земле, вначале, в форме аноксигенного, возник давно. Ученые предполагают, что он возник сразу же, как атмосфера Земли очистилась от вулканического пепла. Земля была загрязнена вулканической пылью и сажей, что препятствовало активности фотосинтетических организмов.

В течении долгого времени, около 3 млрд. лет, Земля была анаэробной. Из фототрофных процессов лидировал аноксигенный фотосинтез, для которого были созданы все подходящие условия — свет, субстраты, доноры электронов для фотосинтеза и вода для роста микроорганизмов. Затем, с эволюцией, аноксигенные Фототрофные бактерии дали толчок к появлению оксигенных фототрофных организмов. Считается, что первыми появились цианобактерии, которые стали синтезировать кислород. Около 1 млрд. лет кислород не появлялся в атмосфере, что могло быть связано с большим количеством двухвалентного железа, которое находилось в растворенном состоянии. Двухвалентное железо в анаэробных условиях стабильно. Кислород стал окислять железо до трехвалентного, и оно стало оседать в форме осадков. Осадки трехвалентного железа хорошо видны на геологических срезах.

Затем, кислород стал появляться в атмосфере, стал формироваться озоновый слой и задерживаться ультрафиолет. Ультрафиолет препятствовал появлению жизни на суше, поэтому, жизнь могла существовать только в воде. Ультрафиолет — это жесткое излучение, которое повреждает ДНК (данный принцип заложен в стерилизации воздуха, поверхностей, операционных). Поэтому, пока жесткий ультрафиолет достигал поверхности Земли, на поверхности суши жизнь была невозможна и существовала только в океанах. Вода в значительной степени снижает вредное действие ультрафиолетового излучения. При появлении озонового слоя, ультрафиолетовые лучи начали ослаблять свое действие и на поверхности суши появились возможности для формирования жизни. С появлением кислорода при помощи древних цианобактерий (предшественниками современных цианобактерий) стала возможна жизнь, появился новый мощный акцептор электронов, и эволюция пошла более быстрыми темпами.

Недавно, британские ученые с канадскими коллегами открыли залежные фоссилии в породах, которым по геологическим оценкам 200 млн. лет со времени возникновения Земли, были обнаружены микроорганизмы, которые откладывали нанотрубочки. Если это открытие будет подтверждено, то оно поменяет представление о возникновении жизни на Земле. Сейчас считается, что первые осадочные породы с отпечатками микроорганизмов появились, когда Земля остыла, что произошло через 1.5 млрд. лет, после её образования. Иначе, получится, что первая жизнь на Земле была занесена извне.

Филогения фототрофных бактерий.

Филогенетическая цепь фототрофных бактерий имеет вид прямой с филумами (рисунок 5.1).

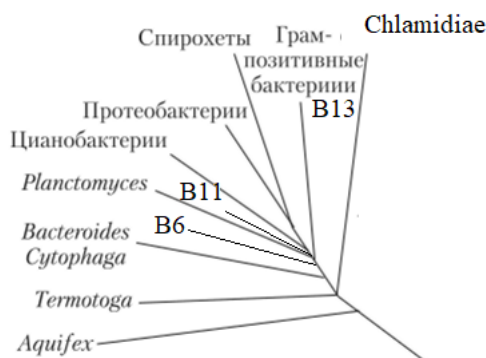


Рисунок 5.1. Филогенетическая цепь фототрофных бактерий

В третий филум входят несерные фотосинтезирующие бактерии (B6), Зеленые серные фотосинтезирующие бактерии (B11).

До генов кодирующих по 16S РНК, все бактерии делили на 4 большие группы. Группировки делили по строению клеточной стенки: фирмикуты (лат. Firmicutes) (грамположительные, толстая клеточная стенка), грациликуты (лат. Gracilicutes) (грамотрицательные, тонкая клеточная стенка), молликуты (или микоплазмы, лат. Mollicutes, странная клеточная стенка), без клеточной стенки.

Среди филогенетических ветвей часто известна последовательность гена, кодирующего 16S РН, но не можем культивировать в лаборатории. Наиболее культивируемыми являются пурпурные фототрофные бактерии.

Пурпурные фотобактерии, которые зависят от серы или не зависят от серы, имеют схему, которая показывает их эволюцию (рисунок 5.2)

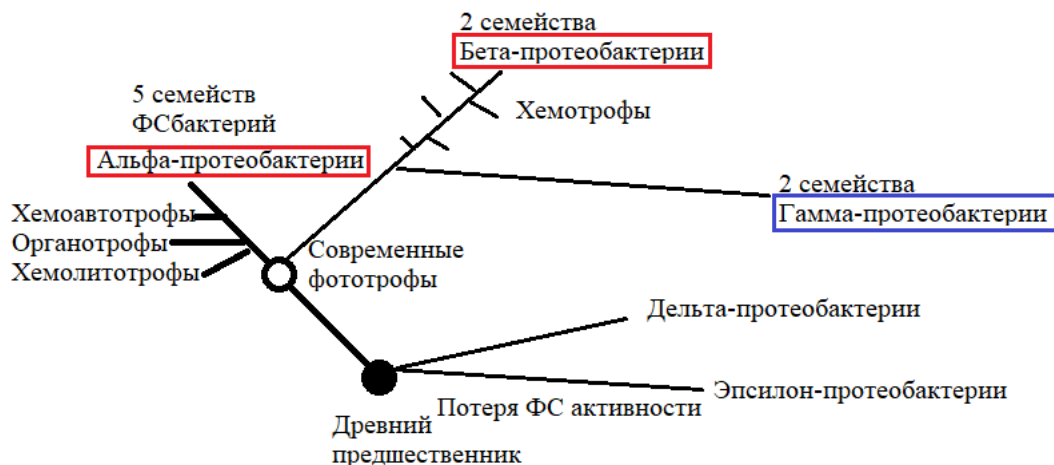


Рисунок 5.2. Филогенетическое древо пурпурных фотобактерий.

Красным обозначены несерные фотосинтетические бактерии, синим — серные фотосинтетические бактерии.

На каком-то этапе эволюции, фототрофная активность была потеряна:

Дельта-протеобактерии (хемолитотрофы) включает сульфатредуцирующие бактерии;

Эпсилон-протеобактерии (хемолитоавтотрофы) включают в себя хеликобактер и другие микроорганизмы.

Свойства аноксигенных фототрофов.

Таблица 5.1. Свойства аноксигенных фототрофных бактерий

Характеристика	Зеленые серные	Зеленые несерные	Пурпурные серные	Пурпурные несерные
Основной фотосинтезирующий пигмент	Бактериохлорофиллы (BChl a+c, d,e)	BChl a+c	BChl a или e	BChl a или b
Морфология ф/с мембран	Хлоросомы, независимые от ЦПМ. Имеют вид тесно примыкающих друг к другу пузырьков, локализованы в цитозоле клетки		Сферические или ламеллярные (вытянутые) мембранные комплексы, соединенные с плазматической мембраной. Образуют тесную сеть.	
Доноры электронов	Водород, сульфид, сера	Водород, сульфид, сера, органические кислоты, сахара, аминокислоты	Восстановленные соединения серы, водород	Органические вещества, водород, восстановленные соединения серы
Отложение серы	Вне клетки	-	Внутри клетки	Вне клетки
Тип метаболизма	Облигатные анаэробные фотолитоавтотрофы	Гетеротрофы, иногда фотоавтотрофы, хемогетеротрофы (при проживании анаэробно в темноте)	Облигатные анаэробы, фотолитоавтотрофы	Анаэробные фотоорганогетеротрофы. Иногда, факультативные фотолитоавтотрофы, хемоорганогетеротрофы (в темноте)
Подвижность	Неподвижны Некоторые имеют газовые вакуоли	Скольжение	Полярный жгут	Полярный жгут Некоторые имеют газовые вакуоли или неподвижны
Максимумы поглощения пигментов ФСА, нм	450 740	450 760	400 870 1030	400 870 1030

На тонких срезах в просвечивающем электронном микроскопе хорошо видна различная морфология мембран. На мембранах локализуются фотосинтетические пигмента.

Подвижность — важное свойство для фотоорганизмов, поскольку они развиваются в водной толще. Двигаясь за светом, они имеют экологические преимущества

Пурпурные бактерии способны поглощать свет в большем диапазоне, что отражается на строении их светособирающего комплекса.

Пути окисления соединений серы.

Пути окисления восстановленных соединений у фототрофных бактерий зависят от субстрата — сера или тиосульфат.

Тиосульфатредуктаза превращает тиосульфат в сульфит и сероводород.

Из сероводорода получается сульфид с выделением 6 электронов.

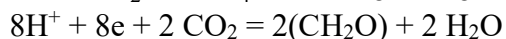
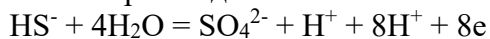
Сероводород обменивается с элементарной серой 2 электронами.

Сульфит вступает в реакцию с аденозинмонофосфатом, и при помощи АФС-редуктазы образует АФС (аденозинфосфосульфат).

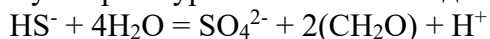
АФС на следующем этапе с добавлением неорганического фосфора образует АДФ (из АМФ. Из 2 АДФ образуется 2АТФ + 1АМФ) при помощи субстратного фосфорилирования АДФ-сульфорилазой

Фиксация углерода фототрофами.

Сера используется как запасной продукт, который может откладываться внутри организма. Энергия идет из восстановления соединений серы.



Суммарное уравнение имеет вид:



CH_2O — материал клеток

Таким образом, клетки, которые растут автотрофно, фиксируют CO_2 при помощи энергии, которая выделяется при окислении сульфита до иона серной кислоты.

При росте в автотрофных условиях, когда источником углерода является CO_2 , клетки могут фиксировать CO_2 в одном из двух циклов — цикл Кальвина и восстановительный цикл трикарбоновых кислот. В 1990-годы был открыт гидроксипропионовый путь.

Фотопроецесс у пурпурных, зеленых и гелиобактерий.

Фотопроецесс приурочен к функционированию фотосинтетического аппарата, связанного с реакционными центрами.

У пурпурных и зеленых несерных бактерий есть пигмент P870 — светособирающий пигмент, на котором проходят взаимодействия кванта света (окислительно-восстановительный потенциал +0.45В). Получая электрон, образуется возбужденное состояние P870* (ОВП -0.9В). Затем, электрон проходит через комплекс бактериохлорофиллА и бактерифеофитин и приходит на уровень пула убихинонов, цитохрома BC1, цитохромаC2 и возвращается в окисленный пигмент P870. При таком переносе электронов через фотосинтетическую цепь переноса электронов формируется АТФ в процессе фотосинтетического фосфорилирования. NAD нет, поэтому клетки зарабатывают восстановленные пиридиннуклеотиды с помощью обратного транспорта электронов с уровня убихинона (-320мВ) на пиридиннуклеотиды (NADH) с затратой энергии. Считают, что этот процесс может идти с затратой АТФ или трансмембранного градиента протонов, который формируется при переносе электронов через фотосинтетическую цепь.

Зеленые серные:

P840 (ОВП +0.36В), поглощает квант света, переходит на уровень -1.1.В P840*. Электрон перемещается на бактериохлорофиллА, железосерный центр, убихинон,

цитохромС553 и возвращается в основное состояние Р840. При транспорте электронов образуется АТФ. В прямом переносе электронов с FeS на ферредоксин происходит восстановление NAD до NADH (прямой перенос электронов)

Гелиобактерии:

Р798 (ОВП + 0.36В) восстанавливается до Р798* (-1.2 В). Электрон переносится на бактериохлорофиллА-ОН, FeS, убихинон, цитохромВС1, цитохромВ553. Образуется АТФ. От железосерного кластера на восстановленный ферредоксин образуется NADH при прямом переносе электронов. Р798 содержит бактериохлорофиллG — уникальный для гелиобактерий фермент.

Р840 и Р870 содержат бактериохлорофиллА.

Лекция 6. Цианобактерии

Углеродный метаболизм аноксигенных фототрофов.

Некоторые из аноксигенных фототрофов, в качестве источника углерода используют CO_2 (таблица 5.1). Одним из путей фиксации CO_2 является цикл Кальвина — рибулозобисфосфатный цикл.

Цикл Арнона.

Цикл Арнона был открыт в 1960 г, когда появились изотопы. Было показано, что у некоторых представителей рода *Chlorobium* (зеленые серные строго анаэробные бактерии), отсутствуют характерные черты цикла Кальвина. Так, был обнаружен восстановительный цикл трикарбоновых цикл Кальвина или обратный ЦТК (цикл трикарбоновых кислот). Если цикл Кребса закручен в сторону окисления ацетилкофермента А до двух молекул CO_2 , то ЦТК направлен на формирование ацетилКоА из 2 молекул CO_2 .

1. Разложение цитрата на ацетилКоА и оксалоацетат. Для реакции нужны затраты АТФ и КоА
 2. Оксалоацетат восстанавливается до малата, который превращается в фумаровую кислоту.
 3. Фумаровая кислота восстанавливается до сукцината с затратой 2 электронов и 2 протонов
 4. Сукцинат превращается в сукцинилКоА с затратой АТФ и КоА.
 5. На сукцинилКоА (I субстрат) происходит фиксация CO_2 с затратой АТФ (на реакцию восстановления CO_2). СукцинилКоА превращается в 2-кетоглутарат
 6. На 2-кетоглутарат (II субстрат) происходит фиксация CO_2 с затратой АТФ с образованием изоцитрата
 7. Изоцитрат изомеризуется в цитрат. Цикл замыкается.
- На 3 молекулы CO_2 тратится 5АТФ и 12H^+ с образованием триозофосфата
8. Вне цикла протекает реакция присоединения CO_2 с участием ферредоксина (восст.) с образованием пировиноградной кислоты
 9. Пируват с затратой АТФ превращается в фосфоенолпируват
 10. Фосфоенолпируват с затратой АТФ и 2H^+ превращается в триозофосфат, который идет на формирование гексозофосфатов, что идет далее на материал клетки.

Таким образом, идет достройка до C_3 соединений, которые обычно участвуют в реакциях центрального метаболизма и до гексоз, которые участвуют в конструктивном метаболизме клетки.

Цикл Арнона идет с затратой энергии в виде АТФ и восстановительных эквивалентов из 12H^+ и 12 е, которые скорее всего берутся из ферредоксинов. Ферредоксины — железосерные белки, которые у строгих анаэробов, выполняют роль пиридиннуклеотидов. Переносят восстановительные эквиваленты, участвуют в циклах, протекающих в анаэробных условиях.

Практически у всех серных зеленых бактерий обнаружен цикл Арнона, так же, он обнаружен у некоторых сульфатредукторов.

Гидроксипропионатный цикл.

У некоторых представителей зеленых несерных бактерий, относящихся к роду, например *Chloroflexus* (обладают скользящим сдвижением, нестрогие анаэробы) не был

обнаружен цикл Арнона. У них был обнаружен гидроксипропионатный цикл фиксации CO_2 . Этот цикл был обнаружен у представителей зеленых несерных бактерий в лаборатории профессора Фукса в Германии, где впоследствии работал Иван Берг который открыл ещё два способа фиксации CO_2 .

МалилКоА расщепляется на ацетилКоА, на котором происходит фиксация молекулы CO_2 с затратой молекулы АТФ и восстановителя — 2H^+ . В результате, образуется малоновый полуальдегид.

Восстановление малонового полуальдегида происходит до гидроксипропионилаКоА

ГидроксипропионилКоА восстанавливается до пропионилКоА

На пропионилКоА происходит фиксация CO_2 с превращением в метилмалонилКоА (при использовании 1 молекулы АТФ)

МетилмалонилКоА превращается в малилКоА. Цикл замыкается.

МалилКоА на ацетилКоА и глиоксилат.

Глиоксилат идет в материал клеток для фиксации. Дальше, он может достраиваться до C_3 соединений.

Общая реакция имеет вид:



Цианобактерии.

Окислительный фотосинтез — фотосинтез, который идет с выделением кислорода и выделением CO_2 .

Цианобактерии появились на очень ранней Земле, однако, по расчётам ученых, позже, чем анаэробные автотрофные бактерии. Донорами электронов у анаэробных фототрофов были неорганические соединения — водород, соединения серы и некоторые органические соединения. С помощью этих микроорганизмов был развит путь получения энергии за счет циклического фотофосфорилирования.

Цианобактерии развили способность использовать воду в качестве донора электронов при фотосинтезе. Вода окисляется до кислорода с выделением двух протонов и 2 электронов, которые служат донорами для дальнейших реакций. Цианобактерии начали производить кислород, который постепенно начал окислять большое количество растворенного в анаэробной воде океанов железо. Железо постепенно окислялось, превращаясь в трёхвалентное железо — залежи окисного железа в осадочных породах.

Цианобактерии развились до таких концентраций, что кислород стал образовывать атмосферу с 21% кислорода, что и имеем на настоящий момент. С появление кислорода в атмосфере Земли появился озоновый слой, что послужило стимулом для появления жизни на суше. Жесткий ультрафиолет выжигал все на поверхности Земли, что препятствовало выходу жизни на сушу. После появления озонового слоя, на суше появились растения, которые стали синтезировать кислород, поэтому у организмов появился более энергоемкий источник — кислород.

До 1970-х годов, цианобактерии называли сине-зеленые водоросли, и они попадали в классификационные схемы ботаников. Цианобактерии — прокариоты, у них нет оформленного ядра, а водоросли и высшие растения — эукариоты, у них есть оформленное ядро. Поэтому, классификацией цианобактерий правильнее заниматься микробиологам. Сиквенс 16S рибосомальной РНК послужило веской причиной для

попадания цианобактерий в филум B10. Затем, наступают трудности, поскольку многие цианобактерии не выделяются в чистом виде.

Микробиологи не могут классифицировать микроорганизм, если он не был получен в чистой культуре. Поэтому, большинство описанных цианобактерий находятся в статусе кандидатов на получение звания, когда будет выделена чистая культура.

Семейства и рода цианобактерий.

1 Семейство — *Chloroococcales* (Хлорококковые) — одиночные клетки или их агрегаты. Под микроскопом выглядят как 2 капсулы, окруженная общей капсулой.

Рода *Chloroococcus*, *Gleotheca*, *Gleobacter*, *Gleocapsa*, *Synchococcus*, *Synchocistis* и др. Некоторые из представителей родов способны к азотфиксации.

2 семейство — *Pleurocapsales* (Плеурокапсовые) — размножаются образованием молодых сферических клеток (байециты), которые выходят в окружающую среду после разрыва стенки

Рода: *Cyanocistis*, *Thermocarpella*, *Pleurocapsales* и др.

3 семейство — *Oscillatoriales* — нитчатые клетки, которые размножаются бинарным делением в одной плоскости

Рода: *Spirulina*, *Oscillatoria* др. + прохлорофиты

Спирулина — цианобактерия, которая растет при высоких значениях pH, то возможно способствует тому, что у них больше возможностей фиксации CO₂. Спирулину собирают 2 раза в год спирулину на острове Чад, высушивают ее и используют эту биомассу в пищу.

4 семейство — *Nostocaceae* — содержит клетки, которые могут фиксировать азот — гетероцисты. Гетероцисты темные в оптический микроскоп, поскольку они не пропускают свет. Когда нет связанных источников азотфиксации, они появляются в количестве 1:10. Распространены повсеместно

5 семейство — *Stigonematacae* — разветвленные. Делятся, образуя веточки. Это ветвящиеся клетки, которые характерно видны под микроскопом.

Цианобактерии способны фиксировать самостоятельно азот, благодаря чему могут завоевывать различные экологические ниши. Для развития им нужен свет, вода, CO₂ и азот.

Роль цианобактерий в экосистемах.

Некоторые части растений или зданий покрыты зеленым налетом — цианобактериями. Они образуют симбиозы с грибами в виде лишайников. Грибы — эдификаторы этого сообщества, они защищают цианобактерии от высыхания, снабжая влагой и минеральными солями цианобактерии. Фиксируя CO₂, цианобактерии выделяют органические вещества в восстановленной форме для питания грибов. Таким образом, этот симбиоз довольно прочен и жизнеспособен. Огромное количество лишайников распространено повсеместно. Лишайники являются индикаторами загрязнения — если воздух загрязнен, то лишайников не встретить. Цианобактериальный компонент лишайников помогает обрести грибам новый субстрат в виде азота — некоторые цианобактерии способны выделять аминокислоты.

Азотфиксация, группы азотфиксаторов.

Азотфиксация — процесс, который присущ только микроорганизмам. Азотфиксация присуща аэробным и анаэробным микроорганизмам. Фермент или ферментный комплекс, который ответственен за азотфиксацию — нитрогеназа — фермент, чувствительный к кислороду и необратимо ингибируется в присутствии кислорода.

К азотфиксаторам относятся:

Свободноживущие автотрофы:

Хемоорганотрофы, фототрофы, хемолитотрофы

Свободноживущие анаэробы:

Хемоорганотрофы, фототрофы, хемолитотрофы (все археи)

Симбиотические:

С бобовыми растениями (соя, горох, клевер), с другими растениями (ольха, слива, бейберри и многие кустарники)

Образуют наросты на стволе, которые были названы корончатыми опухольями — выросты стволового материала из растения. Туда проникают астромикеты из рода *Franseria*, начинается полезный для дерева рост, где происходит фиксация атмосферного азота — растения получают экологические преимущества в виде большей биомассы, быстрого роста. На листьях ольхи появляются черные выпуклые вкрапления, которые назвали «чернильные орешки», там тоже поселяются *Franseria*. Эти клетки начинают продуцировать сильный пигмент из которых раньше делали чернила.

Симбиотические азотфиксаторы образуют прочные симбиозы с бобовыми растениями. Они начинают колонизировать корни бобовых растений. Начинается проникновение клетки через корневой волосок. Клетки при помощи лигтина и органических веществ растений и собственных полисахаридов узнают друг друга. В некоторых исследованиях на бобовых растениях, было показано, что до 30% фиксируемого углерода из CO_2 выделяется для привлечения микроорганизмов, из которых после селективно выбираются азотфиксирующие микроорганизмы. Через оболочку корневых волосков проникают микроорганизмы и образуют инфекционную нить в наиболее тонкой части корня, по которой ДНК проникает в межклетники корня и начинается формирование без особых морфологически-характерных образований, который образуются бактериоидами. Бактериоиды начинают фиксировать атмосферный азот и образуют клубеньки. Одно из веществ, которое синтезируется при симбиозе растением, помогает защитить азотфиксирующую систему. Клубеньки на разрезе малиново-красного цвета из-за наличия леггемоглобина (другое название — леоглобин). Этот фермент формируется одновременным действием растения и бактериоида. Растения синтезирует гем, а бактерии — белок. Леггемоглобин — очень чувствительная к кислороду оксидаза, которая мгновенно восстанавливает кислород, препятствуя его проникновению к нитрогеназе. Леггемоглобин в выделенном и очищенном состоянии способен реагировать на 10^{-9} М кислорода. Обычная оксидазная система, чувствует 10^{-6} М кислорода.

Микроорганизмы, которые живут в симбиозе с бобовыми растениями, с большой интенсивностью фиксируют атмосферный азот. Было подсчитано, что микроорганизмы фиксируют до 100 кг N/га/год. Свободноживущие фиксируют 1-3 кг N/га/год. В агротехнике есть прием — бактериализация семян. Семена бобовых растений обрабатывают перед посадкой массой азотфиксирующих симбионтов, и они сразу начинают колонизировать нужные растения, увеличивая их биомассу.

Свободноживущие клетки азотфиксаторов, которые постоянно встречаются с кислородом — *Azotobacter* — почвенный микроорганизм, который постоянно имеет дело с кислородом. Он защищает нитрогеназу образуя слизь на всей поверхности — слизистая оболочка препятствует быстрой диффузии кислорода. Как только кислород доходит до клетки, он борется с кислородом при помощи быстрых оксидазных систем. Представители самых быстродышащих клеток организма.

Гетероцистные цианобактерии имеют другие способы защиты нитрогеназы. Гетероцисты окружены толстой клеточной стенкой. Диффузия кислорода ослаблена, но гетероцисты содержат дыхательную систему, поэтому кислород быстро окисляется. Также, гетероцисты не содержат фотосистему2.

У безгетероцистных азотфиксаторов, фиксация кислорода происходит за счет того, что клетки цианобактерий фиксируют азот в очень узкий временной промежуток. Перед рассветом, когда клетки, которые проводят оксигенный фотосинтез (ночью фотосинтез не идет и кислород не выделяется), кислород поглощается микроокружением, наступает момент, когда клетка запускает активность нитрогеназы.

Ответа на вопрос, как безгетероцистные цианобактерии, способные к фиксации азота защищают гидрогеназу во время активного фотосинтеза, нет.

Лекция 7. Азотфиксация

Механизм азотфиксации.

Фиксацию азота проводят только микроорганизмы. Фиксацию осуществляет комплекс ферментов нитрогеназы-редуктазы.

Процесс можно записать как:

Атмосферный азот восстанавливают 4H^+ до промежуточного соединения $\text{HN}=\text{NH}$, затем 2H^+ образуют $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$. Далее, с затратой ещё 2H^+ , происходит образование 2NH_3 . На этой стадии затрачивается 16 АТФ, с образованием 16 АМФ + 16 неорганического фосфора — энергетически-движущая сила фиксации атмосферного азота.

На ферментативном уровне:

4 Пирувата превращаются в 4 ацетилКоА + 4CO_2 (выделение 2H^+). Пируват восстанавливает флаводоксин, который принимает на себя 2H^+ и 2e

4 Флаводоксина превращается в 4 флаводоксина восстановленного.

Электроны с флаводоксина переносятся на 4 редуктазадегидрогеназу (окисл.) до восстановления фермента. Необратимо ингибируется кислородом.

4 редуктазадегидрогеназа (восст.) снова окисляется с выделением 8e . Затрата 16 АТФ

Денитрогеназа (окисл.) восстанавливается при помощи 8e до денитрогеназы (восст.)

8 электронов и протонов идут на $2\text{N}_2 = 2\text{NH}_3$ с выделением 2e

На каждый перенос электронов затрачивается 2 АТФ.

Денитрогеназа содержит железо-молибденовый кофактор и участвует в восстановлении азота. У *Methanosarcina barkeri*, нитрогеназа содержит молибден, вольфрам и железо в нитрогеназе.

Тест на определение азотфиксаторов.

Определение азотфиксирующей способности микроорганизмов проводят по газоаналитическому методу. Оказалось, что нитрогеназные системы способны восстанавливать ацетилен в этилен (при участии 2H^+). Ацетилен и этилен — два газа, которые хорошо различимы на хроматографе. В 0 часов, пик только ацетилена, через 2 часа появляется 2 пика — ацетилен и этилен и ещё через 2 часа появляется больший пик от этилена.

Расчет скорости азотфиксации ведут по площади пиков (не стандартная программа), по которой рассчитывают концентрацию газов. Реакцию проводят в герметично замкнутых объёмах (стеклянные колбы, закрытые резиновыми пробками с металлическими колпачками), отбор проб проводится при помощи шприцов, которые отбирают точное количество газов.

Регуляция нитрогеназы.

Нитрогеназа подвержена регуляции. Регулирование этого процесса осуществляется глутаматом или аммонием. Когда в замкнутом объеме идет фиксация атмосферного азота после пересчета через ацетилен-этиленовую систему. В какой-то момент времени после начала процесса азотфиксации добавляется в небольшом количестве соль аммония и азотфиксация останавливается. Как только аммоний употребился клетками и ушел на метаболизм, азотфиксация восстанавливается с той же

скоростью — switch-off — эффект. Наглядный пример того, как быстро и точно проходит регуляция фиксации атмосферного азота.

Особенности биологии *Streptomyces thermoautotrophicus*.

В 1997 году была опубликована работа с *Streptomyces thermoautotrophicus* — актиномицет, который рос при условиях азотфиксации (для его роста нужен был кислород, CO, высокая температура +56° -N(N₂). После выделения было установлено, что организм являлся стрептомицетом, за что и получил свое название. Этот организм был выделен из необычных мест обитания. В Баварии до сих пор существует промысел по получению угля для барбекю/шашлыков — выжигание древесины при недостаточном количестве кислорода — бревна обкладывают дерном, поджигают и получают уголь. В пластах дерна углежоговых мест был выделен этот организм. Необходимость CO объясняется в создающихся условиях при горении дерна.

Streptomyces thermoautotrophicus является аэробом. В статье 1997 года было описание очистки фермента и описания процесса азотфиксации, проводимой *Streptomyces thermoautotrophicus*, которая оказалась непохожей на классическую систему азотфиксации. Она не подвержена действию кислорода, более того, она зависит от присутствия кислорода — в качестве промежуточного продукта образуется супероксид радикал.

Особенности работы нитрогеназы *Streptomyces thermoautotrophicus*.

CO окисляется (при помощи воды) до CO₂ + 2e + 2 H⁺ (при помощи CO-дегидрогеназы)

2e переносятся на кислород с образованием 2 супероксидрадикала

Супероксидрадикал с помощью супероксидоредуктазы переносит 2e на молибден-железо-серную дегидрогеназу: 8e+N₂ +n H⁺ = NH₃ + H₂

Остается неясным, откуда берутся протоны в реакции.

Нитрогеназа необычна — зависит от кислорода, CO и супероксидрадикала, который образуется при передаче электронов на кислород. В выделенном и чистом виде она не чувствительна к кислороду и перекиси водорода. Она не способна восстанавливать ацетилен до этилена. Она слаботребовательна к АТФ — затрачивается 4АТФ. Субъединицы выделенного и очищенного фермента отличались от известных нитрогеназ.

Невозможность пересадки растениям генов нитрогеназы.

На протяжении многих лет, до начала 1990-х годов, когда появились возможности переносов генов, появились идеи переноса генов азотфиксации растениям. Если сделать растение азотфиксирующим, не нужно будет добавлять в почву для увеличения урожая, азотные удобрения. Не удалось заставить растения азотфиксировать без помощи микроорганизмов.

Скорее всего, не успех объясняется тем, что надо было создать систему защиты нитрогеназ, которые надо было бы внести в растения. Система защиты — сложный механизм с вовлечением нескольких белков. Работ по попытке встраивания нитрогеназы *Streptomyces thermoautotrophicus* нет.

Краткие итоги темы по азотфиксации.

Азотфиксация встречается повсеместно. Симбиотические и свободные азотфиксаторы распространены в аэробных и анаэробных средах обитания. Азотфиксация осуществляется только микроорганизмами. Симбиотические азотфиксаторы в 100 раз активнее в отношении к свободноживущим азотфиксаторам. На поля вносят азотфиксирующие организмы, с тем, чтобы вносить меньше азотных удобрений и заставлять микроорганизмы работать в почве, где выращиваются полезные растения.

Глобальные циклы элементов.

На Земле постоянно проходят обмен веществ, через органическую и неорганическую часть. Во всех циклах участвуют микроорганизмы, они могут окислять неорганические соединения, окислять различные металлы и металлоиды, участвуя таким образом в круговороте веществ.

Глобальный цикл углерода и кислорода.

Все начинается с фиксации атмосферного CO_2 , который восстанавливается и переходит в органическое вещество (растения, животные, микроорганизмы).

CO_2 фиксируется растениями, потом, без изменения валентности попадает в животных. При отмирании растений — в микроорганизмы, из микроорганизмов в животных и из животных в микроорганизмы. При разложении CO_2 окисляется с изменением валентности до атмосферного CO_2 .

Оксигенный фотосинтез идет к восстановлению CO_2 до уровня окисленности углерода. При аэробном дыхании O_2 восстанавливается до воды.

Органическое вещество при попадании в анаэробные среды обитания превращается в метан, используется метаногенами. Метанотрофные микроорганизмы окисляют метан до CO_2 , потребляя при этом кислород.

Метан, без изменения валентности может переходить в залежный метангидрат. Метангидрат без изменения валентности может переходить в атмосферный метан и окисляться до CO_2 метанотрофами.

Метангидрат залегает на определенных глубинах океана и существует при температуре менее 6 градусов и при давлении больше 10 атм. Расчёты показывают, что до 30 объемов метангидрата может растворяться в литре воды. Так же, он может растворяться во льду. Поэтому, глобальное потепление, приводящее к увеличению температуры в Арктике, приводит к высвобождению метангидрата и увеличению количества парниковых газов, что негативно сказывается для жизни Земли.

Автотрофы вносят большой вклад в образование первичного органического вещества на Земле. Самый большой вклад вносят наземные растения и водоросли, расположенные в толще океана (по фиксации CO_2). Океан занимает 2/3 площадь Земли и на 300 метров проникаем для света — область в которой могут жить организмы, осуществляющие кислородный фотосинтез. Органическое вещество, образованное водорослями и цианобактериями составляет значительную часть. По оценкам экологов и геологов, около 5% от всего фиксированного CO_2 приходится на действие метанотрофов. Если сравнить цифры по резервуарам углерода на Земле, то получится таблица 7.1.

Таблица 7.1. Основные резервуары углерода на Земле

Местонахождение	% от всего углерода
Скалы и осадки	99.5 (80% — неорганическое)
Океаны	0.05
Метангидраты	0.014
Ископаемое топливо (нефть + газ)	0.006
Наземная биосфера (растения, животные, микроорганизмы)	0.003
Водная биосфера (растения, животные, микроорганизмы)	0.000002
Всего углерода на Земле	$76 \cdot 10^{15}$ тонн

С началом промышленной эволюции, количество CO_2 в атмосфере увеличилось на 40%. Многие связывают это увеличение с глобальным потеплением.

Различные пути фиксации углекислого газа.

Самый мощный процесс фиксации CO_2 — цикл Кальвина, который присущ растениям, цианобактериями, водорослям. Как считают ученые, РубисКО — фермент с двойной субстратной специфичностью, являются самым распространенным ферментом на Земле.

Восстановительный цикл трикарбоновых кислот был открыт у зеленых серных бактерий (1960-1980 годы).

АцетилКоА путь фиксации CO_2 у строгих анаэробов — открытие приурочено к работам с ацетогенами — организмами, способными расщеплять 1 глюкозу до 3 молекул ацетата (2 молекулы ацетата идут через пируватный цикл, а третья молекула ацетата возникает через фиксацию 2 CO_2) — путь Вуда-Льюнгдала.

Гидроксипропионатный цикл у зеленых несерных бактерий.

В последние годы были открыты циклы:

Тригидроксипропионатный-четырегидроксипропионатный цикл. Был открыт в 2007 году. Цикл Берга-1. Открыт у архей из филогенетической линии кренархаеота. Открыто у гипертермофильного ацетатофила, который растет в анаэробных условиях при низком значении pH. Генные пробы, которые были проведены с различными осадками, показали, что гены, который кодируют синтез ферментов цикла Берга-1 широко распространен.

Цикл Берга-1:

Начинается на ацетилКоА, на котором происходит фиксация CO_2 с АТФ. АцетилКоА превращается в малонилКоА.

МалонилКоА восстанавливается через несколько промежуточных реакций в 3-гидроксипропионат.

Гидроксипропионат превращается в 3-гидроксипропионилКоА. Реакция идет с затратой АТФ и присоединением КоА

3-гидроксипропионилКоА превращается в пропионилКоА с помощью NAD(P)H

ПропионилКоА превращается в метилмалонилКоА с присоединением CO_2 и использованием АТФ.

МетилмалонилКоА превращается в сукцинилКоА

СукцинилКоА через несколько последовательных реакций превращается в 4-гидроксипропионат (с реакцией восстановления пиридиннуклеотида)

4-гидроксibuтират превращается в 4-гидроксibuтиратКоА с затратой энергии АТФ, который превращается в кротонилКоА.

КротонилКоА превращается в 3-гидроксibuтирилКоА

3-гидроксibuтирилКоА окисляется до ацетоацетилКоА, который расщепляется на 2 ацетилКоА

АцетилКоА с затратой восстановленного ферредоксина и фиксацией CO_2 превращается в пируват.

Таким образом, в цикле фиксируется 2 CO_2 и ацетилКоА, который участвует дальше в построении материалов клетки фиксирует на себе CO_2 .

При определении всех ферментов этого цикла, нахождении и идентификации всех промежуточных продуктов (которые находятся в состоянии с КоА) главной проблемой было то, что таких соединений не делают фирмы. Бергу пришлось синтезировать все эти вещества самому и следить за метаболизмом с помощью меченого C^{14} при помощи масс-спектроскопического анализа. Описание этого цикла заняло несколько лет. Надо было показать, что эти ферменты активируются в анаэробных условиях, найти локализацию генов и показать, что эти гены не уникальны для этого организма. Science (2007) T.32, c.1782.

Лекция 8. Глобальный цикл элементов

Цикл Берга-2 фиксации углекислого газа.

Цикл Берга-2 был открыт в 2010 году — дикароксилатный/4-гидроксibuтиратный цикл фиксации CO_2 . Этот цикл был обнаружен у гипертермофильных архей, автотрофов и анаэробов — *Ignicoccus hospitalis*, *Thermoproteus neutrophilus*, *Pyrolobus fumarii*. Существуют в глубоководных частях океана, где есть выходы горячих источников с выходом H^+ .

АцетилКоА фиксирует CO_2 с затратой восстановленного ферредоксина с превращением в пируват, который фосфорилируется с затратой АТФ до фосфоенолпирувата.

Фосфоенолпируват фиксирует CO_2 , превращаясь в оксалоацетат.

Оксалоацетат с затратой восстановленного пиридиннуклеотида превращается в малат.

Малат с потерей воды превращается в фумарат.

Фумарат восстанавливается до сукцината (с участием восстановленного флавопротеина)

Сукцинат с присоединением КоА превращается в сукцинилКоА

СукцинилКоА восстанавливается до полуальдегид сукцината

Полуальдегид сукцината с затратой NAD(P)H восстанавливается в 4-гидроксibuтират

4-гидроксibuтират превращается в 4-гидроксibuтирилКоА с затратой энергии АТФ

4-гидроксibuтирилКоА теряет молекулу воды, превращаясь в кротонилКоА.

КротонилКоА присоединяет воду, превращаясь в 3-гидроксibuтирилКоА

3-гидроксibuтирилКоА окисляется дегидрогеназой в ацетоацетилКоА

АцетоацетилКоА расщепляется на 2 ацетилКоА

АцетилКоА с присоединением CO_2 достраивается до пирувата при помощи ферредоксина. Пируват идет на биосинтез материала клетки. Цикл замыкается

Как показывают пробы, взятые в различных частях, показывают, что гены, встречаемые в данном цикле, часто встречается.

Глобальный цикл азота.

В глобальном цикле азота есть две реакции, которые проводят только микроорганизмы. Азотфиксация — образование связанного азота приводит к возникновению органических соединений — белков, ферментов, аминокислот.

Денитрификация — связанный азот расщепляется и попадает обратно в атмосферу.

Глобальный цикл азота проходит в аэробной и анаэробной среде, поскольку, эти процессы идут при помощи аэробных и анаэробных микроорганизмов.

В аэробной части Земли происходит окисление аммиака до NO_2 и NO_3 (нитратредукция, осуществляется в рубце жвачных животных 0 восстановление нитрата до нитрита. Нитрит попадает в кровь, связывается с гемоглобином и останавливает дыхание — нитратное отравление). (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrospira* (окислял аммиак непосредственно в нитрат)). В чистые культуры азотфиксирующих организмов проще выделяют бактерии.

В анаэробной зоне:

Из NO_3 через промежуточное состояние NO до N_2O с образованием N_2 происходит процесс денитрификации. Обычно, это автотрофные организмы, бывают и гетеротрофные. В качестве донора электронов могут использовать кислород или нитрит.

Азотфиксация: $\text{N}_2 + \text{H}_2 = \text{NH}_3$

Аммиак попадает в NH -группы белков без изменения валентности, распад белков приводит к образованию аммиака без изменения валентности азота — аммонификация (в аэробных и анаэробных условиях).

Процесс, приводящий к одновременному восстановлению NO_2 и окислению NH_3 — Анаммокс (анаэробное аммонийное соединение).

Процесс, приводящий к восстановлению нитрата и нитрита до аммиака — диссимиляционное восстановление нитрата и нитрита в аммиак. Этот процесс идет с получением энергии. В нем принимают участие факультативные бактерии, которые живут в анаэробных местах обитания.

Азотфиксация идет в аэробной и анаэробной зоне с восстановлением. В аэробной зоне участвуют цианобактерии, клубеньковые бактерии, свободноживущие микроорганизмы и стрептомицеты (единственный из бактерий, который имеет нечувствительную к кислороду нитрифицирующую систему). В анаэробной среде — аноксигенные фототрофные бактерии, метаногены.

Денитрификация осуществляется представителями рода *Pseudomonas*, *Bacillus* и другие факультативные анаэробы.

Нитратредукция осуществляется энтеробактериями.

Установлено, что процесс диссимиляционного восстановления доминирует над денитрификацией в восстановленных местах обитания, богатых осадками — морские осадки или кишечник человека. Аммиак существует в виде аммонийного NH_4^+ иона, при нормальных значениях pH (около 7). В щелочных условиях (pH выше 8), аммиак становится летучим — основной путь попадания аммиака в атмосферу, например, с животноводческих сред. Аммиак составляет до 15% от выделяемого азота в атмосферу.

В морских обитаниях и некоторых наземных условиях, археи могут доминировать при окислении аммиака до нитрата и нитрита. При внесении в почву азотсодержащих удобрений (нитроаммофоска — одновременно содержит аммиак и фосфор), начинают ингибировать первую стадию окисления аммиака, добавлением в почву нитрапирина (2-хлор-6-трихлорметилпиридин). Нитрапирин активно предотвращает образования аммония, что позволяет растениям поглотить удобрение. Иначе, образуется нитрат, который легко вымывается из почвы — уходит после дождей в подпочвенные воды, может попасть в систему водоснабжения, что опасно для человека.

Глобальный цикл серы.

Цикл серы важен, его осуществляют бактерии и археи, связан с морскими местообитаниями. В морских местообитаниях находятся большие количества сульфатов, которые являются субстратами для существования сульфатоокисляющих бактерий. Сульфид — это газ, который диффундирует в верхние слои воды и там встречается с микроорганизмами, которые способны его окислять.

Черное море из-за высокой активности десульфатирующих организмов является анаэробным до глубины в 100 м. Сульфид является отравляющим газом, связывается в

цитохроме с двухвалентным железом, прекращая передачу электронов в электрон-транспортной цепи. Сероводород имеет резко неприятный запах.

В аэробных условиях окислять сульфат способны тиобациллы, в анаэробных условиях — аноксигенные фототрофные микроорганизмы. С глубины 300 метров начинается активность фототрофных микроорганизмов, которые способны использовать сульфид для доноров аноксигенного метаболизма, в аэробной зоне сульфид попадает аэробным тиобациллам, которые окисляют сероводород до сульфата.

Сероводород окисляется до иона серной кислоты через промежуточное образование серы (серные хемолитоавтотрофы) — в аэробных условиях. В анаэробных условиях окисление осуществляется при помощи аноксигенных фототрофных бактерий до иона серной кислоты.

Сера может восстановиться и превратиться в сероводород в диссимиляционном процессе (с получением энергии из окисления органического/неорганического вещества), осуществляется археями — диссимиляционная сероредукция.

Процесс диспропорционирования серы происходит одновременно с окислением и восстановлением (химический процесс)

SH-группы белков — компоненты живых и отмерших клеток превращаются в сероводород. Процесс проходит без изменения валентности — дисульфуризация.

Ассимиляционная сульфатредукция проходит в аэробной и анаэробной среде и заключается в образовании белковых SH-групп. Проходит у микроорганизмов и растений.

Диссимиляционная сульфатредукция — основной процесс, который приводит к восстановлению сульфата и образованию сероводорода, протекает в морских местообитаниях и соленых озерах. В минорных объемах протекает повсеместно — после распада белков и превращения серосодержащих аминокислот.

Серные хемолитоавтотрофы (бактерии археи) контролируют процесс перехода сульфат-сероводород.

Некоторые цианобактерии могут принимать участие в данных процессах. При попадании в анаэробные зоны на свету, они могут использовать воду и сероводород в качестве доноров электронов при фотосинтезе, образуя серу. Сера может откладываться внутри и снаружи клетки.

Большие залежи серы обнаруживаются в местах разломов Земной коры.

В природе, у серы три основных состояния с валентностью -2 (сульфидрильное состояние в виде SH-групп белков или SH), 0 (элементарная сера), +6 (SO_4).

Основные запасы серы на Земле находятся в виде минералов — гипс и пирит. Окислы содержат основные запасы иона серной кислоты — моря. Значительное количество серы в виде газа SO_2 выделяется при сжигании источников энергии (бензин, природный газ). В природе, токсичный сероводород связывается с железом (FeS) — пирит или (FeS_2) — феррит. Сероредукторы живут в тех же нишах, что и сульфатредуцирующие бактерии. Некоторые органические соединения серы так же распространены в природе — диметилсульфид — продукт распада диметилсульфониопропионата. Диметилсульфониопропионат — осмопротектор морских водорослей, который выходит при отмирании клеток водорослей. При его распаде образуется диметилсульфид акрилат. Диметилсульфид выделяется в атмосферу, где окисляется в метансульфонат, SO_4 и SO_2 . Образуется в природных нишах, может превратиться в метан, превращаться в диметилсульфоксид или служить в

энергетическом метаболизме некоторых анаэробов (диметилсульфид — диметилсульфоксид).

Лекция 9. Экология

Экология: определение, история и разделы науки.

Впервые в научный обиход термин «экология» был внесен Эрнстом Геккелем в 1866 году в книге «Всеобщая морфология организмов». Экология образовано от двух греческих слов — «жилище/местообитание» + «значение/слово». По Геккелю, экология — это наука о микроорганизмах с окружающей средой, куда входят в широком смысле все условия существования. На организме, в окружающем мире действуют абиотические (небиологические) а биотические (биологические) факторы. Наука экология подразделяется на три больших раздела:

Аутэкология — изучает влияние внешних физико-химических условий на организмы.

Синэкология — изучает взаимоотношения организмов данного вида, с окружающими его особями других видов (влияние биотических факторов на интересующий организм)

Демэкология — популяционная экология, объектами изучения которой являются не организмы, а популяция организмов.

Популяции, как составные части (подсистемы) образуют сообщества (биоценоз). Взаимодействия сообщества со средой обитания, образуют экосистему (биогеоценоз), что является предметом изучения системной экологии.

Характеристики экологического фактора.

Для любого изучаемого фактора можно найти интервал изменений при которой организмы меняются мало — зона (область) оптимума. В каждом факторе можно найти зону лимитирования роста развития и зону ингибирования. Зона оптимума может варьироваться для организмов по изменениям фактора. Крайние изменения факторов, которые организм может перенести — пределы толерантности. Организмы с широким пределом толерантности — эврибионты. Организмы с узким пределом толерантности — стенобионты. Характер изменения любого изменения состояния организма может заметно различаться от особи одного и того же вида. Чтобы получить данные изменения особи одного вида, необходимо неоднократно повторять измерения на группе особей. Происходит переход от экологии особей к экологии популяций.

Синэкология и типа взаимоотношений между организмами.

Синэкология — отношения организмов друг с другом. Взаимоотношения особей могут по разному влиять друг на друга. Принято обозначать отношения, как:

1. 00 — нейтраллизм — между видами/особями, которые изучают синэкология не выявлено форм влияния или отсутствие взаимного влияния
2. 0+ — комменсализм (кооперативные взаимоотношения, образования консорциума) — вторая популяция растет быстрее, но не влияет на рост первой популяции. Например, в кишечнике младенца вначале поселяются клетки *E.coli*, которые быстро потребляют кислород, среда становится благоприятной для развития бифидобактерий (анаэробы).
3. 0- — аменсализм — вторая популяция растет медленнее, но не влияет на рост популяции первой
4. ++ — мутуализм — возникают случайно (протокооперация) или не случайно, поддерживаются на протяжении многих поколений (мутуализм). Например,

взаимоотношения в чайном грибе — дрожжи + уксуснокислые бактерии, клубеньковые бактерии, лишайник

5. +- — хищничество/паразитизм — популяция 1 получает преимущества при подавлении роста популяции 2. Например, грамотрицательные бактерии являются жертвой, а бактерии *Vibrio* являются хищниками и нападают на них, высасывают цитоплазматическое пространство, в одной экосистеме растут простейшие и дрожжи — дрожжи являются пищей для простейших
6. -- — конкуренция — бывает межвидовая (за ресурс, действует принцип конкурентного исключения, сформулированные Гаузе) либо внутривидовая.

Принцип конкурентного исключения — два вида со сходными пищевыми потребностями не могут занимать одну экологическую нишу. Один вид обязательно вытеснит другой. Например, взаимодействие двух видов молочнокислых бактерий. Вытеснение происходит при помощи образования бактериоцинов — антибиотики, безопасные для человека, но опасные для микроорганизмов сходных с молочнокислыми бактериями

Демэкология.

Демэкология — экология популяция.

Популяция — любое, способное к воспроизведению совокупность особей одного вида более или менее изолированных в пространстве или во времени от особей своего вида. Важнейшими признаками популяции является численность и плотность. Плотность — количество особей на объем пространства или поверхность.

Метаболически взаимодействующие популяции образуют группировки, называемые гильдиями. Отдельные гильдии, проводящие взаимодополняющие метаболические действия, образуют микробные сообщества.

Экосистема озера.

Если рассмотрим в качестве примера, сообщества, которые складываются в озере — растения на берегах и две зоны в озере — фотическая (окисленная), где находятся цианобактерии и водоросли и окисленная зона.

Сообщество 1: в фотической зоне происходит взаимодействие цианобактерии + водоросли, которые образуют первичное органическое вещество в результате фотосинтеза и выделяют кислород — аноксигенный фотосинтез.

Сообщество 2: в окислительной зоне, в которой постоянно присутствует кислород. Хемоорганотрофы окисляют органическое вещество — происходит обратная реакция — органическое вещество окисляется до CO_2 и вступает в дальнейший круговорот в фотической зоне.

Сообщество 3: в форме осадков. Состоит из гильдий:

Гильдия 1: метаногены + ацетогены;

Гильдия 2: сульфатредукторы + сероредукторы;

Гильдия 3: денитрификаторы;

Гильдия 4: бродильщики.

Одни гильдии образуют кислоты, другие их потребляют. В результате образуется биогаз — смесь метана и CO_2 .

В неглубоких озерах на границе раздела фаз могут присутствовать автотрофы, потребляющие сероводород.

Новые органические вещества, которые вносятся в среду, например, листья с листопадом (аллохтонная или зимогенная органическая материя). Вызывают активность хемоорганотрофных и хемолитотрофных микроорганизмах. Для отдельных ключевых систем (углерод, азот, сера) можно проследить возникновение циклических биогеохимических процессов.

Наука микробной экологии имеет два основных предмета для изучения:

1. Изучение биоразнообразия микроорганизмов в природе и типов взаимодействия (гильдий) микробных сообществ.
2. Изменение активностей микробных сообществ и наблюдения их действия в экосистемах.

Метод прижизненного окрашивания микроорганизмов.

Методы экологии микроорганизмов.

Первым методом является метод прижизненного окрашивания микроорганизмов. Есть красители, которые проникают в клетку. Есть флуоресцентные красители, которые, если клетки метаболически активны, то отщепляется определённый гидролазный участок флуоресцентного красителя и метка начинает светиться. То есть, светится только метаболически-активные клетки. Наиболее наглядный процесс можно проследить на дрожжах при добавлении к ним метиленовой сини — бесцветными будут метаболически активные клетки, а синими будут мертвые клетки. При попадании на тетразолиевые красители протонов (действуют как акцепторы в клетки, они превращаются в формазан — вещество красного света. Соответственно, все клетки окрасившиеся в красный — метаболически активны. Данный метод можно превратить в количественный, если проводить эксперимент по окрашиванию какое-то время, а после экстрагировать формазан спиртом, то на спектрофотометре можно аналитически посчитать, сколько клеток было метаболически активно — сколько формазана образовалось за единицу времени на разных субстратах. Этот метод важен при изучении живых некультивируемых бактерий, которые эффективно изучаются эпидемиологами, которым надо выделить, какое количество клеток, например, сальмонелл, шигелл, клеток, которые вызывают холеру, находятся в поверхностных водах водоема. Оказалось, что некоторые клетки могут переходить в живое некультивируемое состояние. При попадании в живое состояние (попадание в живой организм) они переходят в активное состояние, а на специальных средах они не образуют колонии.

Молекулярно-биологические методы.

Молекулярно-биологические методы пришли сравнительно недавно в микробиологию. Метод FISH позволяет без применения специфических препаратов, обычно, под флуоресцентным микроскопом выявить клетки определенного домена, филума или рода. Поскольку, в каждом из этих представителей есть специфические участки 16S РНК, которые довольно короткие (22 нуклеотида) и на них можно сделать специальные метки. Эту реакцию проводят на фиксированных препаратах, добавляют специально меченную ДНК, которая гибридизируется с определенными клетками. Метод очень специфичен, поскольку не может произойти гибридизация на других клетках. После отмытки, можно увидеть свечения нужных клеток. Свечение кратковременное — после 30 минут свечения, зонды выцветают и приходится делать новые повторности.

Выявить наличие организма вплоть до рода можно с помощью метода DGGE — денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Метод заключается в выделении из природной пробы (почва, вода) тотального спектра микроорганизмов, далее, происходит тотальное выделение ДНК. ДНК смешивается с праймерами, которые сделаны под 16S рРНК, поскольку этот ген хорошо изучен и известно более 100000 последовательностей. Выбирают праймеры, которые бы амплифицировали область этого гена — 7 изменяемых областей в гене, остальные области консервативны. Выбирают так, чтобы амплифицированная область внутри праймеров была не более 500 нуклеотидов. Далее, всю ДНК наносят на денатурирующий гель. На полоски разгоняют ДНК и получают разгонку. Не денатурируемая ДНК идет с электрофорезом по гелю. Как только она доходит до концентрации мочевины при которой происходит денатурация (зависит от числа Г-Ц пар на участке амплифицированной ДНК), она останавливается и не идет дальше. Каждую полоску амплифицированного геля вырезают и снова измеряют на электрофорезе. Таки образом, получают необходимое количество сиквенсов и определяют по базе данных, к какому роду принадлежит полоса. В одной полосе находится неизменная популяция. Затем, вносятся изменения в экосистему и смотрят, какие микроорганизмы стимулируют или ингибируют свой рост. Метод позволяет без выделения чистой культуры проследить за динамикой изменения популяции.

Модификация метода GDDE — TGGE — то же самое, только используется термальный градиент. Выстраивается градиент температуры, где ДНК денатурируется и останавливается.

То же самое можно сделать при создании специальных молекулярных зондов или микрочипах, которые создают на специальной последовательности ДНК, специфичной именно для этих микроорганизмов. На предметное стекло наносят сетку из малых зондов (200 зондов на 1 см²), затем проводят выделение тотальной ДНК и гибридизуют на этих зондах. Как только произошла гибридизация, зонд начинает флуоресцировать. Микролазерным считыванием, считывают в какой точке произошла гибридизация и анализируют, какая в пробе находится ДНК. Особо важен этот метод для воздушного анализа помещений больниц на болезнетворные микроорганизмы, чтобы не появлялись болезнетворные микроорганизмы, которые бы повлияли на состояние пациентов.

Для измерения биологической активности в природе применяют микроэлектроды. Расстояние в 2 мм для *E.Coli* такое же по масштабу, как 2 км для человека. Поэтому изменения на уровне клетки могут быть очень значительными, а, например, на удалении 1-2 мм незначительны. Микроэлектроды делают для определения рН, окислительно-восстановительного потенциала, солености, температуры, содержания ионов натрия, калия, сероводорода, аммония, закиси азота, кислорода. Применение микроэлектродов характерно при изучении цианобактериальных матов. Сверху мата растет популяция/гильдия цианобактерий и водорослей, а на несколько миллиметров в глубину наступает анаэробная зона, где аноксигенные фототрофы используют сероводород для фотосинтеза. Ещё чуть глубже наступает черная зона, поскольку там выпадают в осадок сульфиды металлов — зона сульфатредукторов и сероредукторов. Градиент изменения концентрации кислорода, водорода и сероводорода прослеживают при помощи микроэлектрода. Резкое падение концентрации кислорода прослеживается в почве. Измерение концентрации кислорода в колонии *Bacillus Cereus* (аэробы) — колония возвышается над поверхностью агара на

400 мкм, 200 мкм из которых находятся в абсолютно анаэробной зоне внутри колонии и внутри агара.

Метод стабильных изотопов.

К стабильным изотопам относятся C^{14} , S^{35} . Для измерения скорости фотосинтеза применяют меченый по C^{14} CO_2 . На протяжении определенных интервалов времени ставят пробу на фиксацию CO_2 . Предполагается, что фиксация CO_2 идет в водной толще за счет действия окислительных фототрофов — цианобактерии и водоросли. Им дают меченый CO_2 , после отбирают пробу и изучают радиоактивность. В то же время ставят темновую пробу, в которой отсутствует фиксация CO_2 , либо присутствует фиксация на уровне гетеротрофного фотосинтеза.

Сульфатредукцию измеряют по появлению меченого изотопа S^{35} сероводорода. Сероводород возникает из восстановления меченого сульфата.

Можно измерять скорость образования метана в анаэробных условиях, если давать радиоактивный CO_2 в пробу + водород и наблюдать за появлением радиоактивного по C^{14} метана. Аналогично наблюдается скорость образования этана.

При наблюдении за активностью гетеротрофного сообщества, дают равномерно меченую глюкозу по C^{14} и следят за появлением меченого C^{14} . Нужен контроль, в качестве которого служит убитый формалином образец.

Стабильные изотопы позволяют проследить изотопный эффект. При биологической трансформации веществ возникает изотопный эффект, который проявляется в том, что ферменты, из представленного субстрата, предпочитают более легкие изотопы. Вещества, которые прошли через биологическую активность, обогащены легким изотопом и теряют тяжелые изотопы. Поэтому, разница между тяжелыми и легкими изотопами смотрят на масс-спектрометре. Если взять тяжелый изотоп C^{13} :

В морских карбонатах (осадочная порода), разница C^{12} - C^{13} 5 промилле.

Недавние осадки дают -10-35 промилле (содержание C^{13} ниже);

Биомасса растений дает от -12 до -25 промилле;

Нефть -20 до -35 промилле (нефти, скорее всего, является биологическим продуктом);

Метан -25 до -80 (метан является биологическим производным);

Скалы возраста 3 млрд. лет -12 — 22 промилле;

S^{35} : в метеоритном сульфиде -3 до +3 промилле;

Залежная сера -18 до +18 промилле;

Сульфид морских осадков -30 промилле (образовывался с помощью сульфатредукторов).

Сбор образцов для экологических исследований.

Для сбора образцов последующих экологических исследований, нужно соблюдать строгие правила. Пробу почвы отбирают по специально разработанным технологиям на специальном участке, где по определенной схеме отбирают пробы. Для почвенных микроорганизмов были разработаны плоскопараллельные капилляры Перфильева, которые позволяют избежать отражения света. С одного конца капилляра можно запускать веществ, с другого смотреть на продукты и смотреть на активность микроорганизмов.

Погружение стекол в почву формирует модель, на которую садятся микроорганизмы и впоследствии рассматривается созданный рельеф.

Стекла-аттрактанты: стекло погружается в агаровую среду, агар застывает тонким слоем. В толще агара распределены вещества, которые должны привлекать определенные виды микроорганизмов.

Проба воды: собирается при помощи батометров — специальные приспособления, которые опускают на определенную глубину, где оно наполняется водой, после достают на поверхность. Стерильный полиэтиленовый сосуд опускается на определенную глубину и спускает мессенджер — груз с шилом или скальпелем, который пробивает оболочку. Проба собирается и поднимается. На глубоких расстояниях надо учитывать, что проба собирается при высоких давлениях и надо следить за тем, чтобы не навредить микроорганизмам при поднятии их на поверхность. Пробы воды можно отбирать с помощью специальных шприцов. В стратифицированное озеро опускают приспособление со шприцами. При поднятии на верх видно, как шприцы забрали пробы с определенными микроорганизмами (пробы отличаются по цвету).

Проба осадков: забивают керн, который забивают на дно моря тяжелым предметом. Потом, керн достают и в лабораторных условиях достают керны природных осадков.

Можно отбирать пробы более целенаправленно — опускание исследователей в микроподводных лодках на два человека, один из которых пилот, а второй — ученый.

Пробы воздуха обычно отбирают при помощи аппаратов, которые засасывают воздух. Воздух проходит через специальное отверстие и весь воздух попадает на чашку Петри, которая располагается внутри. В зависимости от чистоты воздуха отбор воздуха идет 1-15 минут. За 10 минут в статическом положении на чашку Петри упадет количество микроорганизмов, содержащиеся в 10 литрах. Воздух можно фильтровать через мембранные фильтры, дальше их помещают на чашки Петри. На поверхности фильтров вырастают колонии, которые рассматривают под микроскопом.

Пробы биологических образцов: растения, корни, кровь, моча, кал, смыв с кожи, мокроты. Биологические образцы сохраняют в стерильном растворе NaCl 0.5%.

Лекция 10. Методы обнаружения микроорганизмов в пробах

Методы обнаружения микроорганизмов в пробах.

Обнаружение микроорганизмов в природных пробах проводят разными методами — фенотипическими, посев на различные среды (аэробы, анаэробы). Разработано более 300'000 сред для микроорганизмов, однако микробиологи могут культивировать не все имеющиеся микроорганизмы. По разным данным, по наличию ДНК имеющихся последовательностей, сейчас известно менее 1% от всех микроорганизмов, обитающих в природе.

Химические методы — определение липидного состава микроорганизмов. Липиды экстрагируют, преобразуют в метиловые эфиры и разгоняют на хроматографе. По соотношениям метиловых эфиров, качественному и количественному составу микроорганизмов судят об объекте. Существуют методы, которые достаточно быстро позволяют определить микроорганизм по метиловым эфирам, однако этот метод не очень точный. С помощью полимеразных цепных реакций и разработанных праймеров на отдельные гены, можно определить количество микроорганизмов, которые несут тот или иной ген (например, ген нитрификации). Количество микроорганизмов определяется под микроскопом. Для этого, под микроскопом при помощи окраски определяется количество тех или иных красителей. При этом, неизвестно, какие из микроорганизмов живые или мертвые — так называемый, метод прямого счета. Крупные клетки можно посмотреть в камерах Тома-Цейса или Горяева, можно подсчитать их количество, но данный метод так же не дает различия между живыми и мертвыми клетками. На чашках можно проводить подраживание микроорганизмов, но при этом не будет известно, какие именно микроорганизмы растут. В связи с этим, интересно отметить, что когда Австралийские ученые задались вопросом подсчитать количество морских микроорганизмов, которые растут на обычных средах (гр/л питательных веществ — глюкоза, дрожжевой экстракт) и те же самые пробы были высеяны на разбавленные среды в 100 раз для морских проб. Оказалось, что количество колоний, вырастающих на разбавленных пробах в 100 раз больше, чем на неразбавленных питательных средах. Поэтому, всегда надо учитывать, какие микроорганизмы выявляются при прямом подсчете проб микроорганизмов при использовании стандартных сред.

Техника флуоресцирующих антител — специфичная и точная техника для выявления микроорганизмов, к которым имеют антитела. Например, если нужно определить, какое количество микроорганизмов находятся в той или иной пробе, делают антитела к пробе, прикрепляют флуоресцентные красители и при помощи специфической реакции антиген-антитело, выявляют количество микроорганизмов той или иной пробы.

Гибридизация колоний осуществляется при поиске определенного гена в большом количестве колоний. Можно провести гибридизацию и определить именно ту колонию, которая содержит необходимый ген.

Определение микробной биомассы, обычно рассчитывают в гр/л. Граммы — вес абсолютно сухой биомассы (АСБ). Для разных микроорганизмов, количество клеток в АСБ разные, но можно сравнивать между собой разные микроорганизмы по массе.

Определение микробной биомассы и других параметров метаболизма микроорганизмов.

Количество микроорганизмов можно определять быстрым способом по содержанию АТФ. У всех живых организмов, содержание АТФ около 10^{-3} М. Поэтому, с помощью люциферазного теста можно быстро и точно определить количество живых клеток в пробе.

Можно определить содержание компонентов клеточных стенок — полигликана или липидов.

Количество хлорофилла для определения содержания фототрофных микроорганизмов.

Так же, определяют концентрацию ДНК, белков, содержания липидов.

Физиологические методы для определения концентрации микроорганизмов: по скорости дыхания или определение CO_2 .

Количественная оценка метаболизма микроорганизмов так же подвергается учету. Её так же можно определить в природе без выделения чистых культур. Оценка основана на гетеротрофном потенциале экологической ниши. Для этого, задают меченые по C^{14} органический субстрат (чаще всего — глюкоза) смотрят за скоростью выделения меченного по C^{14} CO_2 . На основании этого расчёта дают оценку экологической ниши. Есть несколько методов, когда на основе этого субстрата, в пробы вносят несколько других субстратов и смотрят, какие субстраты потребляются за определенное время. По этим показателям рассчитывают скорость потребления субстратов для данной экологической ниши (чаще — для почвенных или водных образцов). Чем больше субстратов потребляется, тем шире гетеротрофный потенциал, тем может быть плодороднее почва.

Рассчитывают процент дыхания по показателю «% CO_2 » из органического вещества, который вошел в биомассу клеток на количество CO_2 , который выделился в окружающую среду. Показатель рассчитывается в процентах. Учитывается, сколько энергии тратится на дыхание, сколько затрачивается на биомассу и поддержания клеток в живом состоянии.

Скорость микробной продукции экониши, рассчитывают по включениям меченного тимидина по тритию, который включается в ДНК. Можно рассмотреть и рассчитать разную скорость прироста биомассы в разных эконишах.

Скорость фотосинтеза смотрят по включению C^{14} в CO_2 , который из фотосинтеза включается в биомассу фототрофных организмов и проводят так называемую, световую и темновую пробы, чтобы различить скорость фотосинтеза.

Скорость дыхания определяют по выделению CO_2 и потребления кислорода.

По скорости фиксации атмосферного азота можно смотреть активность метаболизма.

Симбиоз между фототрофами и сульфатредукторами.

Взаимоотношения микроорганизмов в экосистемах (нейтрализм, кооперация, конкуренция).

У некоторых микроорганизмов возникают довольно устойчивые симбиозы между фототрофами и сульфатредукторами. Многие фототрофные микроорганизмы потребляют восстановленные серные соединения в качестве доноров электрона при фотосинтезе. Восстановленные серные соединения возникают при помощи деятельности сульфатредукторов. Возникают небольшие циклы, например, в

замкнутых системах озер, когда микроорганизм, который является фототрофом поглощает CO_2 , образуется клеточная масса. Этот фототроф (зеленый фототроф из рода *Chlorobium*) вступает во взаимоотношения с микроорганизмом, который восстанавливает серу до сероводорода. Сульфатредуктор так же окисляет ацетат и образуется CO_2 (*Desulfuromonas acetoxidans*). Такие устойчивые симбиозы возникают в природе и в лаборатории. Этот устойчивый симбиоз будет зависеть от света и количества восстановленных серных соединений.

Колонки Виноградского — в качестве образующего вещества для образования восстановленных соединений серы служит гипс, который восстанавливается сульфатредукторами. Сульфатредукторы получают органические вещества от отмирающих организмов на колонне Виноградского. Получается самовосстанавливающийся симбиоз — сульфатредукторы образуют сероводород, сероводород поднимается по колонне, встречает несколько уровней, которые образуются из фототрофных микроорганизмов (если держать колонны на свету) и используют сероводород — зеленые фототрофные бактерии, которые используют сероводород, аноксигенные пурпурные бактерии, оксигенные водоросли и цианобактерии, которые служат самыми мощными продуцентами системы — образуют кислород.

У фототрофных микроорганизмов и сульфатредукторов могут возникать более тесные кооперационные взаимоотношения, когда возникают тесные консорциумы и тесное физическое партнерство между сульфатредуктором и фотосинтезирующим микроорганизмом — сульфатредуктор находится в центре, а на нем, по периферии клетки, сидят фототрофные микроорганизмы — «*Chlorochromatium aggregatum*». Такие устойчивые консорциумы находят в неглубоких Голландских каналах, где свет проникает до дна и постоянно присутствует приток сульфатов и морской воды. Такое же по виду есть «*Chlorochromatium globum*». Эти микроорганизмы находятся на стадии кандидатов, поскольку в чистые культуры выделяются фототрофные микроорганизмы, а сульфатредукторы не удается выделить. В качестве фототрофов служат зеленые и коричневые фотосинтезирующие бактерии.

Более сложные консорциумы состоят из сульфатредуктора, вокруг которого расположены красные клетки, а над ними — зеленые клетки.

Еще один симбиоз *Chloroplana vacuolata* состоит из двух вытянутых клеток сульфатредукторов между которыми очень плотно сидят клетки зеленых бактерий. Эти консорциумы общаются между собой посредством химического общения — они выделяют химические вещества, позволяющее синхронно делиться вместе с сульфатредуктором. Поэтому, устойчивый симбиоз сохраняется на протяжении большого количества времени и количество фототрофного компонента всегда практически одинаков при расчете на клетки сульфатредукторов.

Лишайники.

Цианобактерии и грибы — фико- и микобионты этого сообщества. Цианобактерии приносят в этот консорциум азотфиксацию — могут снабжать гриб продуктами фиксации атмосферного азота. Гриб защищает клетки фикобионта от высыхания и служит механической защитой.

Другие примеры симбиозов.

Водный папоротник *Azolla* и цианобактерии образуют симбиоз. В пазухах листьев водного папоротника селятся цианобактерии, которые фиксируют азот (*Anabaena*), снабжая папоротник азотными соединениями.

Чайный гриб — устойчивое сообщество между уксуснокислыми бактериями и дрожжами. Уксуснокислые бактерии образуют строму, а дрожжи поселяются между складок. Уксуснокислые бактерии — палочки, но они образуют длинные цепочки целлюлозы и слизи, что помогает дрожжам быстро переходить от аэробного к анаэробному способу жизни. В данном случае симбиоза постоянно меняются процессы аэробного и анаэробного дыхания. Так как дрожжи сбрасывают сахар, образуя этанол, далее, этанол окисляется уксуснокислыми бактериями до CO_2 и образуется раствор между подслащенной водой, небольшим количеством этанола, уксуса и CO_2 .

Кефирные грибы — плотно сконцентрированный консорциум микроорганизмов, в котором принимает участие до 20-25 видов молочнокислых бактерий и 2 видов дрожжей. Дрожжи — специфические (кефирные дрожжи) которые приспособились использовать молочный сахар — лактозы (необычное свойство для обычных дрожжей). Лактоза потребляется и молочнокислыми бактериями. Гомо и гетеро ферментативное молочнокислое брожение участвует в образовании CO_2 , этанола и уксусной кислоты. Таким образом, в кефире содержится уксусная кислота, яблочная кислота, этанол, CO_2 и молочнокислые бактерии. Этот напиток является мощным пробиотическим средством, которое полезно для пищеварения человека.

Паразитические взаимоотношения.

Существующие в природных экосистемах, грамотрицательные бактерии являются жертвой, а бактерии *Vibrio* являются хищниками и нападают на них, высасывают цитоплазматическое пространство для собственного питания. Развиваются в цитоплазматической мембране.

"Грибные сады" муравьев.

Муравьи культивируют грибы для белкового питания личинок, «грибные сады».

Муравьи рода *Атта* или муравьи-листорезы, культивируют внутри муравейников специальные «грибные сады». Муравьи приносят в муравейник собранные листья, разрезают их на мелкие кусочки, увеличивая поверхность листа и заселяют их специально подобранными культивируемыми грибами. Муравьи из низшей агросистемы культивируют грибы, которые приносят вместе с собой случайно, а муравьи из высшей агросистемы передают грибы вертикально потомству.

«Грибной сад» устроен следующим образом: муравейник защищает грибы от осадков, муравьи распределяют грибницу по поверхности листьев, грибы растут, образуя белковую биомассу, которая служит белковым кормом для подрастающих личинок. Муравьи следят за ростом грибов, в жаркий период они начинают вентилировать сад, чтобы не допускать перегрева, во влажный период укрывают от источников влаги. Перегнившие листья, использованные грибами они удаляют из муравейника — так они следят за чистотой сада. Некоторые виды муравьев просто сбрасывают использованные листья вниз с муравейника, а некоторые виды уносят листья подальше от муравейника.

Отправляясь в брачный полет, королева ищет место для муравейника. У нее в специальном мешке рядом с ротовым аппаратом есть часть грибницы для передачи

новому поколению вертикально. На кутикуле у нее есть специальные актиномицеты для выработки антибиотика.

При закладке нового муравейника, королева начинает сама культивировать грибной сад, после появления рабочих муравьев, эта обязанность переходит им. По экологическим законам развивающиеся виды имеют врагов. Враги есть и у «грибных садов» — это специальные грибы, которые поселяются на саду. У муравьев есть защита — специальные актиномицеты, которые вырабатывают грибной антибиотик и с появлением гриба-паразита на саде, антибиотик начинает действовать и сад вылечивается.

Обычно, на кутикуле муравьев за головой, есть специальные актиномицеты, которые существуют все время. Искусственно вносили грибной паразит в развитый сад и через 2-3 дня, все рабочие муравьи специальным образом размножали актиномицет и переносили его на места, пораженные грибом-паразитом. Размножали его при помощи специальных гланд, где выделяется вещество, которое стимулирует рост актиномицета.

Сложная система взаимоотношений между грибом-производителем и грибом паразитом возникла в течении длительного времени. Молекулярно-биологические исследования по конкурентности генов-муравьев грибов-производителей и актиномицета, показывают, что они развиваются в длительный период времени.

Симбиоз кальмара со светящимися бактериями.

Пример симбиоза между животными и бактериями изучен на гавайском кальмаре бобтейл — ночной хищник, достигающий 4 см в длину. Он развивает у себя симбиоз со светящимися морскими бактериями *Aliivibrio fisheries*. Кальмар в лунные ночи, которые часто встречаются в морях, проплывает на небольшой глубине, хищники смотрят на их тени и ловят их. Чтобы снизить эффект от тени, на фоне звездного и лунного неба, кальмар отбрасывает свет специальным светящимся органом, таким образом тень становится менее заметной и шансы на выживание увеличиваются.

При вылуплении из яйца, кальмар стерилен, в его организме нет светящихся бактерий и этот симбиоз каждый раз возникает заново. После выхода в открытое море, кальмар начинает собирать светящиеся бактерии. Только один вид бактерий способен колонизировать кальмара, причины данного явления неизвестны.

Когда кальмар ищет партнеров — светящихся бактерий, он выбирает среди них только тех, которые являются светящимися и подвижными (одного и того же вида). У него есть специальные каналца, которые подходят ко светящемуся органу, к которому подходят микроорганизмы. Кальмар всасывает воду с частотой 20 импульсов/мин, каждый импульс засасывает около 20 мкл. воды. Бактерии попадают внутрь светящегося органа, колонизируют его (образуют биопленку), сбрасывают жгутики и начинают развивать в себе систему свечения, которая подвержена кворумсенсингу (quorum sensing). Концентрация бактерий увеличивается, увеличивается количество выделяемых веществ вокруг бактерий, в таких условиях возникает кворумсенсинг — клетки увеличивают свою люминесцентную активность до 1000 раз. Светящийся орган начинает интенсивно светиться в течении ночи. В ответ на колонизацию, кальмар выделяет специальную мукоидную слизь, которой питает светящиеся клетки. С наступлением рассвета, кальмар начинает активно выбрасывать клетки из светящегося органа, способствуя таким образом распространению популяции светящихся бактерий. Для кальмара, положительным эффектом от симбиоза является свечение и предохранение от хищников.

Симбиоз кальмара и светящихся бактерий показывает, каким образом может возникать устойчивый симбиоз с микроорганизмами.

Пивоварение и виноделие.

Биотехнология микроорганизмов, как наука возникла спонтанно, более чем 6000 лет назад. Люди применяли биотехнологические приемы для сохранения пищи с использованием микроорганизмов. Например, выпечка с использованием дрожжей, молочнокислые бактерии с использованием закваски (производство ржаного хлеба из ржанных дрожжей и молочнокислых бактерий, образующих молочную кислоту).

При приготовлении вина, пива, сыра, сквашенных молочных продуктов использовались традиционные биотехнологические производства. Так же использовалось при получении бортниками медовых продуктов из меда.

При приготовлении пива необходимо приготовить специальное сусло, которое готовится из солода. Солод готовят проращиванием ячменного зерна в специальных условиях, тонким слоем насыпают, проращивают. При достижении проращивания 2-4 мм, проращивание останавливают, именно в этом состоянии находятся с наибольшей активностью ферменты, которые нужны при осахаривании крахмала ячменя. Солод отбивают, сушат при разных температурах, получая при этом солода разного цвета, что определяет качество и цвет пива. Солод добавляют до 15% к другой части ячменя, растирают его и начинают варку сусла при температуре 53°, при которой работает фермент альфа-амилаза из солода (расщепляет крахмал ячменя на большие фрагменты — декстрины). При 63° работает фермент глюкоамилаза, который отщепляет глюконовые остатки с декстринов и сусло насыщается свободной глюкозой, которая потом будет сбраживаться дрожжами. На определенном этапе процесс останавливают кипячением, при этом добавляют цветки хмеля. Хмель начали добавлять в пиво в 15 веке немецкие монахи, что понравилось потребителям. Пиво стало более стойким при хранении благодаря эфирным маслам хмеля. Затем, сусло охлаждают, поступает в чаны для брожения. Брожение протекает по двум схемам:

1. Лагерное пиво, сбраживание протекает при температуре +8-10° в течении недели. Медленное брожение, которое проходит с помощью чистых культур лагерных культур.

2. Пиво английских сортов (эль) сбраживается при температуре +20-23° с помощью так называемых верховых дрожжей. По своей консистенции, более крепкое. Изначально в сусло закладывают большее количество сахаров для сбраживания.

Соотношения количества сахаров и декстрина важно при производстве пива. Если будет много сахаров, но мало декстрина, то пиво будет слишком крепкое и не вкусное (полнота пива). Если наоборот, то пиво не будет вкусным. Раньше, качество пива проверяли по тесту — человек в кожаных штанах садился на табуретку, облитую пивом. Если через 20 минут сидения, человек вставал, а табуретка не отлипала от кожаных штанов, то пиво было хорошим, а если сваливалась, то пиво признавали некачественным и выливали.

Сброженное сусло поступает на выдержку в лагерных танках. Лагерные танки — большие цистерны, соизмеримые по размерам с двумя цистернами по перевозке нефтепродуктов. Их сваривают вместе и получается 80-ти тонный лагерный танк. Лагерный танк обычно держат под Землей, где поддерживается постоянная температура. В Москве такое хранилище находится под Москвой-рекой. В лагерных

танках, пиво выдерживается для дешевых сортов пива 5-7 дней, для более дорогих сортов — до 40 дней. После, пиво поступает на розлив, под тем же самым давлением, которое создается в лагерных танках при хранении (за счет процесса медленного брожения). Современные технологии позволяют фильтровать пиво, которое разливается в стерильную тару и поступает на продажу. Все современные технологии добавляют консерванты (бензойная кислота), чтобы пиво долго стояло и не портилось.

Пиво бывает темное, светлое, эль (крепкие сорта). Обычно, содержание алкоголя 5-7%, в Англии есть пиво в 12% объемных единиц алкоголя.

Английские ученые провели эксперимент — добавляли в готовое продажное пиво *E.coli* 10⁵М/мл. На третьи сутки, вся *E.coli* обращалась в ноль — погибала вследствие действия экстрактивных веществ хмеля.

Вина бывают белые, красные, розовые и специальные. Их готовят по разным технологиям. Для белых вин берут виноград светлых сортов и могут сбраживать сок винограда, либо виноград с мякотью. Красные вина сбраживают в присутствии мякоти красных сортов винограда. Розовые вина делают из сока красного винограда без участия мякоти в брожении.

Винные суслу готовят сбраживанием спонтанными видами дрожжей, либо специальными. Виноделы пастеризуют сусли из ягод винограда и уже после заражают используемой культурой дрожжей. Дальше, происходит процесс сбраживания при температуре около 10-15° в период около месяца. Далее, вино сливают с осадка, такое вино считается молодым и не спелым. Во Франции есть специальный праздник Божоле, где во вторую пятницу ноября разрешено продавать и потреблять незрелое вино спелого урожая. Это вино считается не очень качественным и его нужно выдерживать. Выдержка вина осуществляется в дубовых бочках, которое идет минимум в течении года. Считается, что необходимо три года, чтобы вино приобрело необходимый вкус, букет и качества.

Красное и белое вина отличаются по качеству и сроку хранения. Белое вино хранится до 60 лет. Красное вино может храниться до 150 лет. Дальше, вина «стареют» и «умирают» (винодельческие термины). Самой распространенной болезнью вина является попадание кислорода, начинается активность уксуснокислых бактерий и вино скисает. Его можно переработать на винный уксус, не теряя виноматериал. А можно поступить, как рекомендовал Пастер виноделам из города Лилля — пастеризовать, нагревом при 80°C, тем самым спасая вино. Кроме того, в виноматериале и готовых видах могут поселиться микроорганизмы, которые выделяют полисахариды, вызывая ослизнение вина, из-за чего оно так же теряет качества. Некоторые микроорганизмы поселяются специфически — образуют мышинный привкус в вине.

Шотландские вина образуют естественное давление внутри бутылки за счет образования CO₂. Таким образом, вино выдерживается и продается.

Есть жемчужные вина — образуют давление, но меньше, чем у шампанских.

Шипучие вина — вино насыщают CO₂.

Процесс шампанизации вина занимает более трех лет. Фирма AbrauDurso выдерживает вина более трех лет в бутылках.

По остаточному сахару, шампанское делится на брют (сухое), полусухое, полусладкое и сладкое. Во всем мире продают сухое и брют. В России продают сладкое и полусладкое. По выдержке, игристые вина делятся на: без выдержки, выдержанные больше 6 месяцев, коллекционные (выдержка более 2 лет). Изготовление настоящего шампанского в бутылках — дорогостоящий процесс. Проводят выдержку Кюве —

бутылки для шампанизации вина закладывают на хранение, укупоривают пробкой с уздечкой и в течении трех лет каждые три месяца перекидывают бутылку на 30 градусов, сводят образующийся осадок дрожжей при дображивании на пробку. Процесс сведения на пробу называется ремюаж. После образования дрожжей на пробке начинается процесс дегоржаж — сбрасывание осадка. Опытными руками быстро открывают бутылку, под давлением из бутылки вылетает осадок дрожжей, бутылку доливают небольшим количеством сахарного ликера, закрывают новой пробкой и закрывают уздечкой, которая называется мюзле. Дальше, бутылка хранится без дрожжей, но под давлением. Таким образом выдержка доходит до трех лет.

В СССР был разработан быстрый резервуарный способ изготовления шампанского. В сосудах под давлением в ферментерах, сброживали виноматериал, насыщали CO_2 , фильтровали от дрожжей и под давлением разливали в бутылки. О качестве этого процесса свидетельствует то, что Франция закупила право на лицензию изготовления дешевых игристых вин. Впервые вино типа шампанского в России было произведено в середине 17 века на Дону. Выпускается до сих пор, называется Цимлянское.

Специализированные вина делятся на ароматизированные, десертные, крепленые (кагор, херес, портвейн, вермут). Производство хересных вин возникло в эпоху больших географических открытий, когда корабли находились в длительных плаваниях. Вода, которую моряки брали с собой быстро закисала, поэтому, моряки брали с собой вино. В условиях качки и высоких температур, образуются пленки хересных бактерий, который препятствуют доступу кислорода. Они образуют специфический аромат, что понравилось людям. В теплых странах бочки стоят под высокой температурой и дважды в год доливаются новой порцией вина. Портвейн — крепленое вино, которое образуется при добавлении карамели и выдерживании вина в бочках более трех лет. При выдерживании в дубовых бочках, часть спирта испаряется через капилляры в бочках. В течении трех лет испаряется около 15% спиртов, которые виноделы называют «доля ангелов».



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
Л Е К Ц И И У Ч Е Н Ы Х М Г У

