

Г. А. ЗАВАРЗИН

ЛИТОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

Г. А. ЗАВАРЗИН

ЛИТОТРОФНЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

МОСКВА

1972

Литотрофные микроорганизмы. З а в а р з и н Г. А. М., «Наука», 1972 г.

Литотрофные микроорганизмы получают энергию для своей жизнедеятельности от окисления неорганических веществ и имеют большое значение в круговороте веществ в природе. В книге дается подробная характеристика водородных, сульфатовосстанавливающих, метанобразующих, нитрифицирующих, серных и тионовых бактерий, и она может служить справочным руководством для микробиологов и работников смежных специальностей.

Табл. 1. Рис. 62. Библ. 39 стр.

Ответственный редактор
академик А. А. ИМЩЕНЕЦКИЙ

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемая вниманию читателя книга написана на основе курса, который автор читал на кафедре биологии почв Московского университета. Литотрофные организмы, окисляющие неорганические вещества, являются одним из важнейших геохимических агентов. С их деятельностью в природе связано образование и разрушение полезных ископаемых, они осуществляют важные этапы круговорота минеральных элементов. Литотрофы могут приносить серьезный вред, разрушая строительные материалы и вызывая коррозию металлического оборудования, так как образуют агрессивные химические вещества. В то же время деятельность некоторых из них может быть использована для выщелачивания руд. Для исследователей, работающих в области сравнительной биологии, литотрофные организмы важны прежде всего как удобные модели, помогающие уяснить многообразие функций живых существ.

Термин «литотрофия» более точно отражает тип питания этих организмов, чем традиционные термины «хемосинтез» и «хемоавтотрофия», потому что многие железобактерии, серобактерии, метанобразующие бактерии не способны к автотрофному существованию. Хотя литотрофным бактериям регулярно посвящаются обзоры, в литературе отсутствует сводка по этим организмам. Это обстоятельство и побудило автора подготовить книгу. Разумеется, она не претендует на то, чтобы заменить обзоры и дать исчерпывающую библиографию, потому что такая полнота нужна специалистам в узкой области, обязанным знать литературу по оригиналам. Книга рассчитана на менее подготовленного читателя и поэтому начинается с главы, описывающей хемолитотрофный обмен. Остальные главы, посвященные отдельным группам микроорганизмов, могут быть прочитаны независимо одна от другой. Чтобы избежать перегрузки книги излишними ссылками, затрудняющи-

ми чтение, в каждой главе приведены основные обзоры, содержащие исчерпывающую библиографию за соответствующий промежуток времени. Материалы, имеющиеся в доступных русских изданиях, изложены наиболее кратким образом.

Рукопись книги была прочитана А. А. Имшенецким, С. П. Кузнецовым, Е. Н. Мишустинным, М. В. Ивановым, Е. Н. Кондратьевой, замечания которых были с благодарностью приняты.

Свой труд автор посвящает светлой памяти Б. Л. Исаченко, много сделавшего для выяснения роли литотрофных бактерий в природе.

ХЕМОЛИТОТРОФНЫЙ ОБМЕН

ОТКРЫТИЕ ХЕМОСИНТЕЗА

В истории науки редко бывают такие случаи, когда раздел ее был бы так полно и исключительно связан с именем одного человека, как хемосинтез связан с именем С. Н. Виноградского. К этому нужно добавить, что открытие нового физиологического типа питания организмов Виноградским вслед за открытием анаэробноза Пастером послужило основанием для представления о необычайной физиологической специализации бактерий, которое легло в основу современной сравнительной биохимии. Будучи внешне чисто экспериментальным фактом, открытие хемосинтеза имело большое значение в истории идей, которое далеко выходит за рамки собственно микробиологии. Поэтому Виноградский, наряду с Пастером и Бейеринком, может считаться не только основателем общей микробиологии, но к нему восходят и многие идеи современной биологии.

История изучения специфических физиологических типов питания, свойственных микроорганизмам, проходила ряд характерных этапов, которые легко проследить на примерах изучения нитрифицирующих, сульфатовосстанавливающих, метанобразующих, окисляющих соединения серы бактерий. Этапы эти следующие.

К первой половине XIX века было установлено, что ряд важных для геологии химических превращений на поверхности Земли протекает и в настоящее время. Это такие процессы, как образование нитратов в почве, горючих газов и сероводорода в водоемах. Они идут в определенных условиях, например, образование метана приурочено к разложению органических веществ в болотах, образование сероводорода идет в эстуариях рек и т. д.

Быстрое развитие химии и прежде всего агрохимии сделало приемлемой мысль, что большинство этих превращений обусловлено химическими реакциями, причем ученые, предлагавшие соответствующие реакции, часто не утруждали себя проверкой, могут ли они идти в реальных природных условиях. Отзвуки этого течения дошли и до нашего времени, хотя экспериментальная проверка таких гипотез очень проста: нужно только сопоставить ход процесса в двух пробах, одна из которых оставлена неизменной, а в другой живые существа тем или иным способом убиты.

Опыты, установившие биологическую природу разнообразных процессов, происходящих в природе, были в основном закончены в 70—80-х гг. прошлого века. Оказалось, что образование сероводорода, селитры, окисление водорода и многие другие процессы не идут в простерилизованных образцах. Под влиянием работ Пастера по брожениям и его спора с Либихом агентами, вызывающими эти процессы, в большинстве случаев стали считать бактерии. Открытие анаэробноз Пастером показало, что микроорганизмы могут обладать необычными для высших организмов функциями. Становилось очевидно, что роль микроорганизмов в природе исключительно велика. Однако несмотря на то, что Пастер доказал, что брожения вызываются специфическими микроорганизмами, несмотря на успехи медицинской микробиологии, открывавшей одного за другим возбудителя заболеваний, в общей микробиологии долго господствовало мнение, что специфические процессы вызываются совокупной деятельностью неспецифической микрофлоры в специфических условиях (см. Г. А. Надсон, 1903). Это мнение основывалось прежде всего на отсутствии чистых культур литотрофных микроорганизмов. Культивирование в жидкой среде и сейчас представляет значительные трудности для выделения организма. Метод изолирования отдельных колоний и «триада Коха» не могли быть применены к возбудителям специфических процессов в природе: эти организмы не росли на желатине, применявшейся для выделения чистых культур.

Следующий этап наступил после введения в практику Виноградским и Бейеринком метода элективных культур. Оба основателя современной общей микробиологии были гениальными экспериментаторами, очень неохотно обсуждавшими общетеоретические вопросы: их эксперименты говорили сами за себя.

В книге, посвященной литотрофам, необходимо кратко остановиться на истории открытия этих организмов, так как концепции Виноградского имеют более общее значение, чем установление частных фактов, и продолжают оставаться актуальными и сейчас. Виноградский начал работу над серо- и железобактериями в 1884 г. в лаборатории Де-Бари, имея целью выяснить, действительно ли свойственна широкая морфологическая изменчивость, плеоморфизм, пилчатый бактериям или же то, что принимали за плеоморфный вид, на самом деле представляет смесь мономорфных видов. Для решения вопроса Виноградский не пошел стандартным путем, который выработали школы Пастера и Коха, а применил свой строго индуктивный путь, начав с наблюдения за микрокультурами на предметном стекле под контролем глаза, как это он делал в своей дипломной работе в лаборатории А. С. Фаминцина. Метод Виноградского позволил ему с такой точностью установить систематику серобактерий, что она сохранилась до нашего времени лишь с некоторыми дополнениями.

Наблюдая за серобактериями, Виноградский убедился, что для развития им необходим сероводород, в присутствии которого в клетках накапливалась сера, а в отсутствие — исчезала. Это позволило Виноградскому сделать вывод, что сера является запасным веществом и что «окисление серы серобактериями, сопровождающееся образованием серной кислоты, эквивалентно по энергетике дыхательному акту» (Виноградский, 1952, стр. 47). Таким образом, в 1887 г. была открыта литотрофия. Виноградский сознавал, что «с точки зрения принципов

современной микробиологии результаты этой работы, полученной с так называемыми смешанными культурами, могли показаться ошибочными, не заслуживающими внимания, могли навлечь на себя критику» (там же, стр. 47). Действительно, до сих пор наблюдения такого типа рассматриваются лишь как указание на вероятность процесса, но не доказательство его.

Доказательство автотрофного усвоения углекислоты микроорганизмами, окисляющими неорганические вещества, было получено Виноградским в 1890—1892 гг. при исследовании нитрификаторов, потому что были выполнены два требования, отсутствовавшие в его предыдущих работах: 1) получена чистая культура организма, 2) произведены количественные химические определения потребляемого неорганического субстрата и образованного органического углерода. Такой тип питания получил название хемосинтеза. Работы Виноградского, вместе с работами его современника голландского ученого Бейеринка, легли в основание общей микробиологии, хотя сам Виноградский вскоре надолго прекратил исследовательскую работу, так как его назначили заведующим отделом общей микробиологии Института экспериментальной медицины в Петербурге. Для ученого его склада характера исследовательская и административная деятельность оказались взаимноисключающими.

У Виноградского почти не было учеников, но школа ученого — это не его личные ученики и сотрудники, а тот круг идей, который он ввел в науку и которому последовали другие. Убежденный и последовательный мономорфист, что отнюдь не исключает признания морфологической изменчивости и циклов развития, Виноградский перенес эти взгляды и в область физиологии. Он считал, что в природе именно специфические организмы обуславливают геохимически важные процессы. Эта концепция и составляет фундамент общей микробиологии.

Источник получения энергии для организма в наибольшей степени определяет возможность его развития. Если внести в среду только один используемый исследуемым организмом субстрат, то развитие посторонних организмов ограничено. Такая избирательная среда называется селективной.

Минеральная среда с единственным окисляемым неорганическим веществом источником энергии: соединениями серы, водородом, аммиаком или нитритами была тем средством, с помощью которого выделены все хемоавтотрофы. Все они сравнивались с одним стандартом — нитрифицирующими бактериями — все они оказались принадлежащими к одному и тому же типу облигатных автотрофов. Исследователи не замечали, что методика не позволяла выделить литотрофные организмы, которые нуждались в органических веществах как факторах роста. После обнаружения специфического возбудителя химического процесса остальные организмы, в слабой степени способные к реакции восстановления или окисления соединений серы, водорода, образования нитратов, переставали привлекать внимание. Микробиологическому изучению хемоавтотрофов на следующем этапе способствовало то исключительное значение, которое эти организмы имеют в круговороте веществ в биосфере. Имя В. И. Вернадского должно быть поставлено в первом ряду тех ученых, чьи идеи определили направление развития этой области общей микробиологии. Вернадский развил представление о том, что в поверхностных слоях Земли — биосфере — основными агентами, определяющими превращение и концентрацию химических элементов, являются живые существа. Группа геохимиков и почвоведов, работавших в России одновременно с Вернадским, разработала это направление. Однако в отличие от Вернадского, который рассматривал организмы как специфические концентраторы химических веществ, Б. Л. Псащенко, с именем которого связано развитие геологической микробиологии, рассматривал микроорганизмы не как концентраторы, а как специфические катализаторы химических реакций. Вследствие строгой специфичности многих хемоавтотрофов и сравнительно хорошо изученной геохимии тех неорганических веществ, которые они используют в своем обмене, были разработаны вполне четкие представления об участии хемоавтотрофов в круговороте таких элементов, как азот и сера. Роль гетеротрофов в круговороте веществ вследствие разнообразия организмов и соединений, на которые они воздействуют, представляется сейчас гораздо менее отчетливой.

Следующим крупным этапом в изучении хемосинтеза следует считать работы Мейергофа (Meuergohf, 1916, 1917a, b), который использовал нитрифицирующие бактерии для доказательства единства биохимических механизмов у всех живых существ. Сравнивая нитрификацию и дыхание, он показал, что оба процесса одинаково подавляются ингибиторами и проявляют много сходного. Вывод Виноградского, что анаэробная окислительная эквивалентная дыхательному акту, нашел свое подтверждение и с точки зрения биохимических механизмов. Эта работа Мейергофа послужила прообразом тех многочисленных биохимических исследований, которые получили широкое распространение начиная с 40-х годов. Значительная часть этих экспериментальных исследований не имела другой цели, как доказать, что и столь необычные физиологически организмы, как хемоавтотрофы, подчиняются общим законам.

Изучение ферментных систем автотрофной ассимиляции углекислоты и переноса электрона выявило основные биохимические механизмы хемоавтотрофов, которые достаточно подробно изучены у представителей всех основных групп этих микроорганизмов. С общепромышленной точки зрения, наибольший интерес представляют те, по-видимому, минимальные изменения биохимического аппарата, которые позволяют приспособить универсальный механизм к выполнению специфической функции. Для современного поколения микробиологов хемоавтотрофы по своему ферментативному аппарату более «обычные» организмы, чем многие гетеротрофы. Специфичность обмена хемоавтотрофов находит сейчас свое объяснение не только в особенностях качественного набора ферментов, но и в особенностях регуляции обмена этих организмов в целом.

Итак, в настоящее время элементарные процессы, обуславливающие специфичность хемоавтотрофов, изучены сравнительно полно как для внутренних механизмов обмена, так и для процессов, характеризующих отношение организма к внешней среде. Одна из центральных проблем биологии — это изучение закономерностей возникновения многообразия из простых элементарных явлений. «*Многообразие из единства*» — вот тот тезис, доказательством которого в биологии лучше всего могут служить хемоавтотрофы.

Физиологический тип хемоавтотрофов был описан Виноградским в 1890 г. с исчерпывающей точностью в следующих тезисах (Виноградский, 1952, стр. 169): «Органическое вещество на земном шаре образуется при деятельности живых существ не только в процессе фотосинтеза, но и в процессе хемосинтеза... В итоге возбуждатель нитрификации представляется мне обладающим примечательными свойствами, позволяющими рассмотреть его как новый в науке физиологический тип. Свойства эти сводятся к следующему: 1) развитие в чисто минеральной среде в присутствии неорганического вещества, способного окисляться; 2) вся жизнедеятельность теснейшим образом связана с наличием этого вещества, каким в случае нитрификации является аммиак; 3) окисление этого вещества является единственным источником энергии; 4) отсутствие потребности в органическом питании как в источнике пластического материала и энергии; 5) неспособность

разлагать органические вещества, их присутствие лишь тормозит развитие организмов; б) единственным источником углерода является ассимиляция углекислого газа в процессе хемосинтеза».

Хемосинтезирующие бактерии постоянно привлекали внимание микробиологов и почти ежегодно публикуются обзоры, посвященные этой своеобразной физиологической группе микроорганизмов (Кузнецов, 1948; Умбрейт, 1954; Заварзин, 1964; Доман, Тихонова, 1965; Романова, 1968; Baas-Becking, Parks, 1927; van Niel, 1943, 1954; Fry, Peel, 1954; Lees, 1955, 1960; Engel, 1959; Starkey et al., 1962; Senez et al., 1962; Kelly 1967c; Gundersen, 1968; Peck, 1968), которые позволяют проследить за развитием знаний в области хемоавтотрофии.

ТИПЫ ПИТАНИЯ

Каждый вид организмов обладает специфическими биополимерами — белками и нуклеиновыми кислотами. Специфичность этих соединений доказывается как химическим определенным их состава, так и установленным их комплементарности: иммунохимически для белков и определенным гомологичности для нуклеиновых кислот. Синтезируются эти соединения из универсальных для всего живого аминокислот, азотистых оснований, сахаров с использованием энергии макроэргических фосфорных связей. Следовательно, многообразие химического взаимодействия организма со средой сводится к способу получения, во-первых, аминокислот, азотистых оснований и других «строительных блоков» — мономеров, во-вторых, необходимой для образования полимеров энергии. Изучением этого многообразия и занимается физиология питания микроорганизмов.

Минимальной биологической единицей, сохраняющей свою специфичность, является вирусная нуклеиновая кислота. Для своего воспроизведения она нуждается не только во внешних мономерах и макроэргических соединениях, но и в рибосомальном аппарате хозяина. Такой тип питания называется *паратрофным*; воспроизведение организма полностью зависит от поставляемых другим организмом субстратов. Необходимость использования чужого рибосомального аппарата обуславливает обязательное внутриклеточное развитие существ с этим типом питания. Внутриклеточное развитие в свою очередь требует совместимости незащищенной нуклеиновой кислоты паратрофа с клеткой хозяина. Отсюда — строгая специфичность большинства внутриклеточных паразитов к виду и даже штамму хозяина. Защита биополимеров паратрофа от воздействия хозяина требует прежде всего появления барьера проницаемости в виде мембраны. Это обуславливает в свою очередь необходимость собственного рибосомального аппарата. Биологические аспекты типов питания организмов этой группы, близких микоплазмам и риккетсиям, изложены Моулдером (1965). Нали-

чие барьера проницаемости ограничивает и проникновение макроэргических фосфорных соединений. Чтобы расширить выбор атакуемых объектов, организм должен обладать и собственным энергетическим аппаратом. Действительно, внутриклеточный паразит бактерий *Vdelovibrio*, атакующий широкий набор форм, имеет собственный энергетический аппарат и способен к существованию вне клетки хозяина. Это означает уже возможность перехода от паразитного к *гетеротрофному* способу питания. Гетеротрофные организмы не зависят непосредственно от других организмов: они используют обезличенные продукты их жизнедеятельности. Наиболее сложными пищевыми потребностями обладают организмы, развивающиеся в биологических субстратах, таких, как молоко, навоз, трупы животных, или же в составе сложных устойчивых биологических сообществ с развитыми симбиотическими и метабиотическими взаимоотношениями. Наименьшую зависимость от других организмов обнаруживают те гетеротрофы, которые способны расти на каком-нибудь единственном органическом веществе из большого набора, как, например, бактерии из рода *Pseudomonas*. Такие гетеротрофы должны обладать способностью преобразовывать исходный субстрат во все необходимые мономеры. Это означает, что окисление субстрата должно проходить через ряд промежуточных ступеней, из которых хотя бы одна совместима с системой взаимных превращений мелких молекул и приводит к образованию мономеров. Сама эта система обмена мелких молекул может быть достаточно однотипной для различных живых организмов, если она составлена из обратимых или циклических подсистем. Она получила название амфиболизма. Центральное место в обмене мелких молекул занимает цикл органических кислот. Поскольку у гетеротрофных организмов строительные блоки извлекаются при деградации окисляемого субстрата, энергетическое и конструктивное направления обмена у этих организмов объединены.

Наибольшей автономности питания достигают организмы, которые создают органическое вещество из неорганического соединения углерода — углекислоты. В соответствии с независимостью своего питания от жизнедеятельности других организмов они получили название *автотрофов* — «самостоятельно питающихся». Очевидно, что механизм превращения углекислоты в органические соединения может быть одинаковым у всех организмов с таким типом питания: это система автотрофной ассимиляции углекислоты. Очевидно далее, что путь превращения энергетического субстрата не связан у них общими метаболитами с конструктивным обменом. Многообразие автотрофных организмов обусловливается теми энергетическими реакциями, которые они осуществляют. Если в этих реакциях окисляется внешний неорганический донор электрона, то организмы называются *литотрофами*. Если же донор электрона образуется в результате возбуждения хлорофилла светом, то организм обладает *фототрофным* питанием.

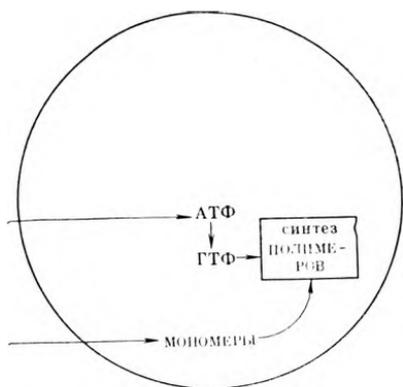


Схема 1. Обмен паратрофа

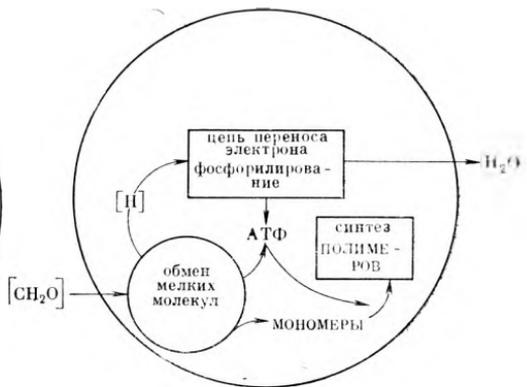


Схема 2. Обмен гетеротрофа

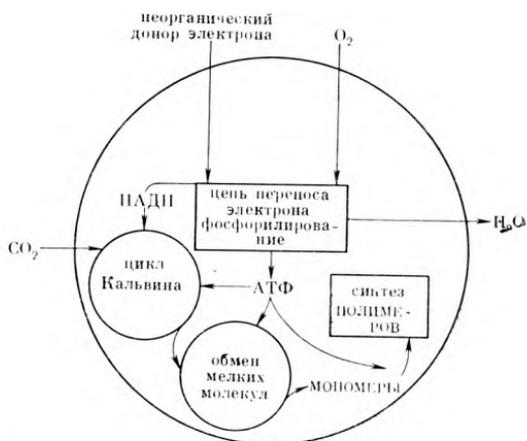


Схема 3. Обмен хемотротрофа

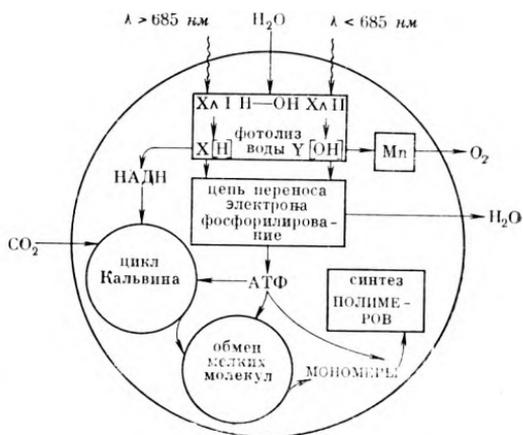


Схема 4. Обмен фотолитотрофа

Такая система типов питания позволяет расположить в ряд по возрастающей сложности внутренних ферментных систем все организмы (схемы 1—4). При этом один фланг займут паратрофы, а противоположный — автотрофы.

При описании типов питания микроорганизмов употребляется терминология, предложенная в 1946 г. на симпозиуме в Колд Спринг Харбор. Рассматриваются следующие типы питания (*трофии*): по отношению к источнику энергии — химическому (*хе*) или световому (*фото*); по отношению к источнику углерода — углекислоте (*авто*) или органическому веществу (*гетеро*); по отношению к донору электрона — органическому (*органо*) или же неорганическому (*лито*) веществу (см. ниже).

Обозначения способов питания (трофии)

Признак	Терминология, предложенная на симпозиуме в Колд Спринг Харбор (1946 г.)	Традиционные названия
<i>Источник энергии</i>		
живой организм	Паратрофия	Внутриклеточный паразитизм
химическая реакция	Хемотрофия	
фотохимическая реакция	Фототрофия	Фотосинтез
<i>Донор электрона</i>		
неорганический	Литотрофия	Аноргоксидация Хемосинтез Фотосинтез
органический	Органотрофия	Гетеротрофия
<i>Источник углерода для построения клеток</i>		
углекислота	Автотрофия	Автотрофия
органические вещества	Гетеротрофия	Гетеротрофия

Комбинации этих терминов позволяют описать большинство типов питания; например, фотоорганотрофия соответствует типу питания несерных пурпурных бактерий. Однако полные термины, например, рассматриваемые в этой книге — хемолитоавтотрофия и хемолитогетеротрофия, — употребляются редко, и обычно говорят сокращенно о литотрофах, автотрофах или гетеротрофах. Интересен тот факт, что всем возможным типам питания, образованным комбинациями этих терминов, соответствуют реально существующие микроорганизмы.

Наряду с приведенной терминологией распространена традиционная. В противоположность фотосинтезу Виноградский назвал микроорганизмы, способные строить свое тело в темноте из углекислоты, хемосинтезирующими, а процесс — хемосинтезом. Для обозначения окисления неорганических веществ он употреблял тер-

мин «аноргоксидация». Пифеферу принадлежит применение терминов «автотроф» и «гетеротроф» для организмов, строящих свое тело соответственно из углекислоты и органических соединений. Наконец, в старой литературе иногда употребляли термин «прототроф» для обозначения организмов с первичным, независимым от других типом питания. В современной литературе этот термин используют для обозначения микроорганизмов, не нуждающихся в витаминах или других факторах роста, употребляя его как синоним термина «ауксоавтотроф».

Организмы, способные переходить от одного типа питания к другому, в частности от автотрофии к гетеротрофии, как, например, водородные бактерии, называют *миксотрофами*.

Изложенные представления удобно иллюстрировать схемами 1—4, поясняющими взаимоотношения ферментных систем организма. Мы можем различить следующие крупные системы.

1. Система синтеза биополимеров, включающая редупликацию нуклеиновых кислот и синтез белка на рибосомах (схема 1). В наиболее чистом виде эта система осуществляется у паратрофов. Выход в среду и способность заражать другие особи организма-хозяина вызывает необходимость синтеза некоторых энзиматических и структурных белков. У бактерий система синтеза указанных биополимеров морфологически локализована в нуклеоиде и в рибосомах.

2. Система обмена мелких молекул — амфиболизм. Продуктом ее являются строительные блоки для синтеза биополимеров (схема 2). Центральным энзиматическим механизмом амфиболизма является цикл органических кислот, от которого идут ответвления на синтез аминокислот. Ферменты этой системы обычно располагаются в цитоплазме. Среди микроорганизмов существуют очень широкие вариации в отношении способности синтеза строительных блоков, но все недостающие мономеры организм должен получать готовыми из среды как факторы роста.

3. Система энергетического обмена. Продуктом являются макроэргические фосфорные соединения. Система работает, осуществляя окислительно-восстановительные химические реакции за счет находящихся в среде акцепторов и доноров электрона. Она разделяется на две подсистемы: во-первых, перенос электрона и, во-вторых, фосфорилирование. Ферменты энергетического обмена, как правило, локализованы на мембранном аппарате.

У автотрофных организмов система обмена мелких молекул дополняется: 4. Системой автотрофной ассимиляции углекислоты, локализованной в цитоплазме (схема 3).

У фототрофных организмов система энергетического обмена дополняется: 5. Системой фотосинтетических пигментов, локализованных на мембранном аппарате (схема 4).

Между всеми этими системами существуют определенные связи, которые обуславливают развитие организма.

Рассмотрим сначала механизм обмена гипотетического хемоавтотрофа и посмотрим, как сказывается на этой схеме использование специфического субстрата.

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА

Необходимую для своего существования энергию микроорганизмы получают от окислительно-восстановительной реакции, катализируя ее посредством ферментативного аппарата, который во многом специфичен для каждого вида бактерий. Если реакция служит для организма источником энергии, то обычно она протекает в несколько ступеней, хотя бы одна из которых сопряжена с реакцией образования универсального переносчика энергии — АТФ. Если АТФ не образуется, реакция не может служить источником энергии для биосинтеза. Окислителем в большинстве реакций, осуществляемых литотрофами, служит кислород. Система переноса электронов от субстрата к кислороду в высокой степени унифицирована у разных организмов, представляя собой механизм синтеза воды (Ленинджер, 1966, Скулачев, 1969). Наибольшим разнообразием она отличается у бактерий (Гельман и др., 1966).

Процесс переноса электрона включает следующие этапы: 1. Окисление субстрата с переносом электрона на внутренний акцептор клетки. 2. Перенос электрона по дыхательной цепи микроорганизма. 3. Закрепление освобождающейся энергии в биологически доступной форме АТФ. 4. Перенос электрона на внешний акцептор (окислитель) и возвращение цепи в исходное состояние. 5. Повторное окисление или окончательная стабилизация окисленного продукта.

Очевидно, что первый и последний этапы специфичны для каждого окисляемого вещества. Центральным событием в процессе является образование АТФ.

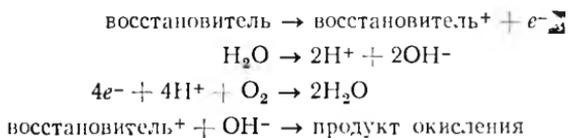
АТФ в клетке образуется в процессе фосфорилирования, которое бывает двух типов: субстратное и окислительное. При субстратном фосфорилировании происходит внутримолекулярное перераспределение энергии химических связей между молекулой субстрата и присоединенным к ней фосфатным остатком, за которым следует перенос фосфатного остатка на АДФ с образованием богатой энергией АТФ. Молекула субстрата превращается в соединение, более бедное энергией. Процесс субстратного фосфорилирования не обязательно требует участия структурных компонентов.

Окислительное фосфорилирование происходит при переносе электронов от окисляемого субстрата к окислителю по цепи переносчиков электронов, закрепленных в структурном образовании — мембране. Точный механизм окислительного фосфорилирования остается невыясненным, хотя очевидно, что он обусловлен: 1) окислением специфических переносчиков электрона, перепад потенциа-

лов между которыми соответствует по величине энергии, необходимой для образования АТФ; 2) наличием ненарушенной ниже определенного предела структуры. Морфологически окислительное фосфорилирование локализовано у высших организмов в митохондриях, у бактерий — в цитоплазматической мембране и мембранных образованиях.

Независимо от механизма на образование 1 моля АТФ термодинамически требуется свободная энергия порядка 10 ккал, что соответствует разнице потенциалов $\sim 0,2$ в при переносе двух электронов.

В функционировании митохондрий и эквивалентных им структур бактерий происхождение электронов имеет второстепенное значение. Основным параметром, определяющим деятельность этого аппарата, является потенциал донора и акцептора электрона. В зависимости от этого потенциала в перенос электрона включаются те или иные компоненты цепи переноса электрона. Химическая реакция, которую осуществляет цепь переноса электрона, представляет собой синтез воды из водорода (электрона) — восстановителя и кислорода воздуха — окислителя:



С образованием воды сопряжен синтез фосфорилированного соединения, которое служит затем переносчиком энергии в клетке. Связь между этими двумя реакциями не является жесткой; они могут разобщаться под влиянием физиологических условий, регулирующих обмен организма, или под действием веществ-разобщителей в биохимических опытах. Окисленный восстановитель получает свой кислород в независимой реакции из других молекул воды. Окисление субстрата с включением молекулярного кислорода в продукт окисления происходит под действием оксигеназ и, насколько известно, не связано с образованием АТФ. Таким образом, синтез воды является основной реакцией окислительного фосфорилирования и по происхождению кислорода в продукте окисления можно судить, служит ли эта реакция для энергетических целей клетки. Субстратное фосфорилирование в жизни литотрофов имеет меньшее значение.

Структурной основой дыхательного аппарата бактерий признается одинарная липопротеидная мембрана толщиной 75—80 Å. Она расположена между клеточной стенкой и цитоплазмой, являясь цитоплазматической мембраной. От цитоплазматической мембраны отходят внутрь клетки мембранные образования различной сложности, имеющие форму многократно упакованных складок или трубок, называемые мезосомами или ламеллами, смотря по

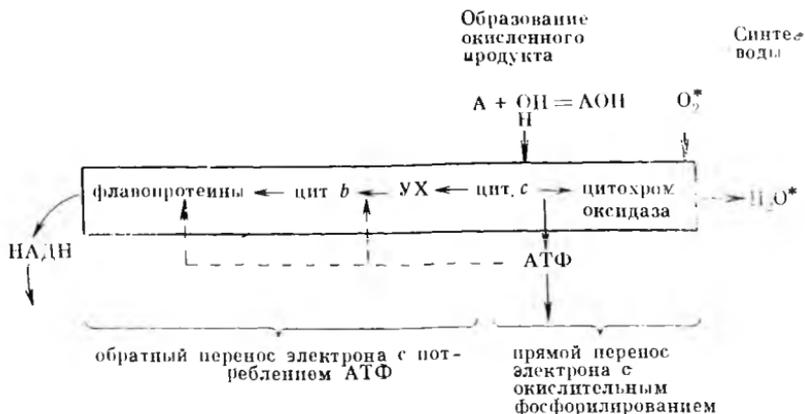


Схема 5. Перенос электрона у литотрофов

форме. Мезосомы открыты в сторону пространства между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной и увеличивают площадь соприкосновения цитоплазмы с пространством, находящимся за клеточной мембраной. Между скоростью дыхания и развитием мембранного аппарата жесткой корреляции нет. Это объясняется тем, что цитоплазматическая мембрана бактерий полифункциональна и несет не только ферменты дыхательной цепи. Мезосомы, например, участвуют в делении клетки.

Бактериальные мембранные образования не ограничены от цитоплазмы, что приводит к прямому взаимодействию метаболитов с дыхательной цепью. Регуляция работы дыхательной цепи у бактерий выражена слабее, чем в митохондриях. В отличие от митохондриальной цепи переноса электрона с постоянным качественным и количественным набором компонентов у бактерий наблюдается большое разнообразие состава дыхательной цепи. Вместе с тем бактерии реагируют на изменение условий окружающей среды синтезом новых компонентов дыхательной цепи, приспособлявая ее к новым условиям. Как и в митохондриях, любой субстрат бактериальной цепи способен восстановить все компоненты цепи. Это указывает, что цепь функционирует как единое целое.

В состав цепи переноса электрона включаются следующие основные компоненты (схема 5).

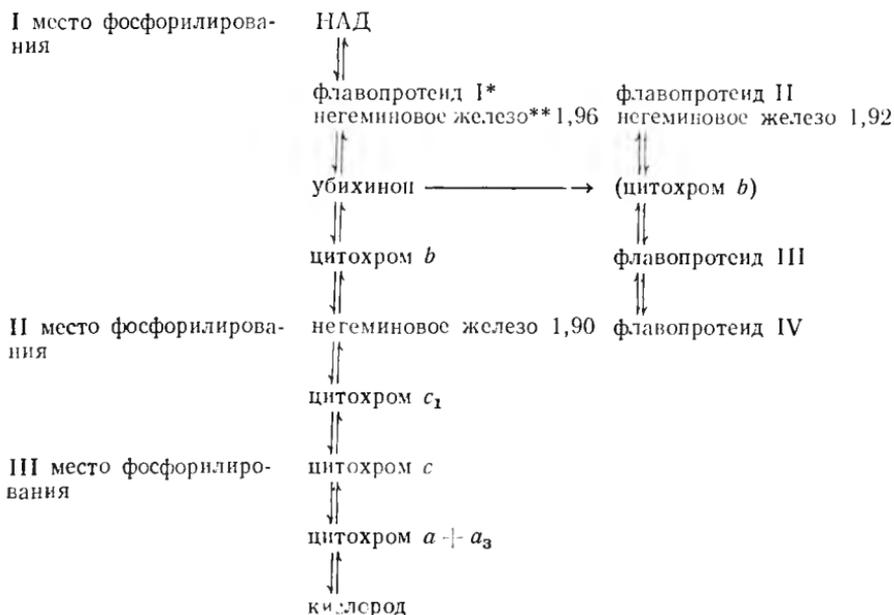
Первым переносчиком электрона служат никотинамиддинуклеотиды (НАД и НАДФ).

Далее следуют флавиновые ферменты (ФП), которые передают электрон на цитохромную систему. Растворимые флавиновые ферменты могут образовывать самостоятельную цепь, передавая электрон на кислород. В этом случае они не участвуют в окислительном фосфорилировании. Перенос электрона от флавинов идет, по-видимому, через убихиноны (УХ) и витамин К. Далее следуют цитхро-

мы групп *b*, *c*, *a*. Состав цитохромной системы бактерий широко варьирует. Особенно велико разнообразие терминальных оксидаз, несмотря на то, что они взаимодействуют с одним и тем же субстратом — молекулярным кислородом.

В электронпереносящей цепи участвуют так же железосодержащие белки (Hall, Evans, 1969). Они содержат железо и кислотолабильную неорганическую серу в эквивалентном количестве, обычно имеют очень низкий потенциал около $-0,42$ в, дают сигнал ЭПР около $1,94$ гс. Восстановленная и окисленная формы имеют характерный спектр. Типичным представителем их является ферредоксин. Особое значение эти белки имеют для анаэробных организмов, где они восстанавливаются гидрогеназой, и для фотосинтезирующих, где восстановление происходит на свету. Железосодержащие белки с флавопротенидом, например ксантиноксидаза, содержат также молибден и могут принимать несколько электронов на молекулу. Эти же ферменты восстанавливают пнитрит, гидроксил-амин, цитохром *c*, участвуют в восстановлении сульфата. В митохондриях железосодержащие белки образуют комплексы НАД-редуктазы, сукцинатдегидрогеназы, убихинон-цитохром *c* редуктазы.

Окислительное фосфорилирование в митохондриях сопрягается с переносом электрона в трех местах, указанных на следующей схеме (Lardy, Ferguson, 1969):



* Флавопротениды: I — НАДН-дегидрогеназа; II — сукцинатдегидрогеназа; III — электронпереносящий флавопротенид; IV — ацил-КоА-дегидрогеназа.

** Негеминное железо означает железосодержащие белки с соответствующим сигналом электронного парамагнитного резонанса в гауссах.

Окислительное фосфорилирование у бактерий выяснено менее полно. Оно отличается от митохондриального сравнительно низким выходом АТФ на пару перенесенных на кислород электронов, меньшей чувствительностью к разобщителям, иной системой регуляции. Трудность экспериментального изучения окислительного фосфорилирования у бактерий, помимо обычных определений отношения Р О в бесклеточных препаратах, заставляет прибегать при количественных расчетах к таким физиологическим показателям, как урожай биомассы на моль синтезированного АТФ ($Y_{\text{АТФ}}$) (Stouthamer, 1969).

Энергетический обмен литотрофов удобно рассматривать по аналогии с электрохимической реакцией. Это позволяет использовать уже имеющийся аппарат и готовые расчеты. С электродом, на котором происходит восстановление субстрата, для аэробных организмов сопоставляется цитохромоксидаза. Реакция соответствующего полуэлемента может быть записана:

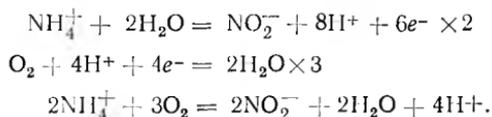


Второй электрод представлен реакцией неорганического донора электрона, в которой электроны передаются в цепь переноса электрона микроорганизма обычно на уровне цитохрома с.

Принимается следующее написание реакций:

1. Пусть происходит реакция: $\text{NH}_4^+ = \text{NO}_2^-$
2. Уравниваем О с H_2O : $\text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O} = \text{NO}_2^-$
3. Уравниваем Н с H^+ : $\text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O} = \text{NO}_2^- + 8\text{H}^+$
4. Уравниваем заряды с e^- : $\text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O} = \text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ + 6e^-$

Полученная реакция представляет реакцию донора электрона с цепью переноса электрона микроорганизма. Энергетический выход вычисляем, складывая реакции донора и акцептора. Приведем к общему знаменателю коэффициенты при e^- и складываем:



Энергию вычисляем, подставляя из таблиц значения энергии образования μ° , кал (см., например, Гаррелс, Крайст, 1968).

Такой метод расчетов позволяет установить также зависимость реакции от потенциала и концентрации водородных ионов. Для этого рассматривают уравнение равновесия

$$E_0 = E_0^0 + \frac{0,0591}{n(e^-)} (\text{H}^+) \text{pH} - \frac{0,0591}{n(e^-)} \log \frac{\text{ox}}{\text{red}}$$

где E_0 — потенциал при равновесии; E_0^0 — потенциал при стандартных условиях (25° , активность 1 г-моль/л, фугативность 1 атм), который вычисляется по уравнению химических реакций из значений

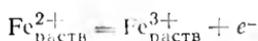
$$E_0^0 = \frac{\sum \nu \mu^0}{n23060};$$

n — изменение валентности.

Например:

$$\text{Fe}_{\text{раств}}^{2+} = -20360 \text{ кал}$$

$$\text{Fe}_{\text{раств}}^{3+} = -2530 \text{ кал}$$



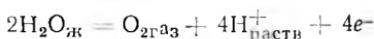
$$E_0^0 = \frac{\mu_{\text{Fe}^{3+}}^0 - \mu_{\text{Fe}^{2+}}^0}{23060} = \frac{-2530 - (-20360)}{23060} = 0,771 \text{ в}$$

$$E_0 = 0,771 + 0,0591 \lg \frac{(\text{Fe}^{3+})}{(\text{Fe}^{2+})}$$

$$\text{H}_2\text{O}_{\text{ж}} = -56690 \text{ кал}$$

$$\text{H}_{\text{раств}}^+ = 0 \text{ кал}$$

$$\text{O}_{2\text{газ}} = 0 \text{ кал}$$



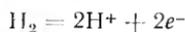
$$E_0^0 = -\frac{4\mu_{\text{H}^+}^0 + \mu_{\text{O}_2}^0 - 2\mu_{\text{H}_2\text{O}_{\text{ж}}}^0}{4 \cdot 23060} = \frac{0 + 0 + 2 \cdot 56690}{4 \cdot 23060} = 1,228 \text{ в}$$

$$E_0 = 1,228 - 0,0591 \text{ pH} +$$

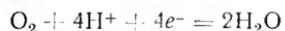
$$+ 0,0148 \log p\text{O}_2$$

Соответствующие расчеты для большинства обсуждаемых здесь литотрофов приводятся ниже.

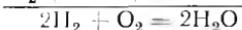
Hydrogenomonas



$$E_0 = 0,000 - 0,0591 \text{ pH} - 0,0295 \log p\text{H}_2$$



$$E_0 = 1,228 - 0,0591 \text{ pH} + 0,0147 \log p\text{O}_2$$



$$\Delta G^0 = -113380 \text{ кал}$$

Thiobacillus thioparus



$$E_0 = 0,252 - 0,0665 \text{ pH} + 0,0074 \lg \frac{(\text{SO}_4^{--})}{(\text{HS}^-)}$$

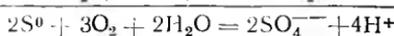


$$\Delta G^0 = -183360 \text{ кал}$$

Thiobacillus thiooxidans

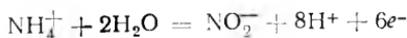


$$E_0 = 0,357 - 0,0788 \text{ pH} + 0,0098 \log (\text{SO}_4^{--})$$

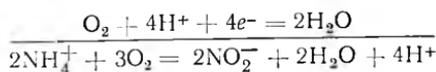


$$\Delta G^0 = -241300 \text{ кал}$$

Nitrosomonas



$$E_0 = 0,897 - 0,0788\text{pH} + 0,0098 \log \frac{(\text{NO}_2^-)}{(\text{NH}_4^+)}$$

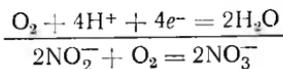


$$\Delta G^0 = -91\,800 \text{ кал}$$

Nitrobacter



$$E_0 = 0,835 - 0,0591\text{pH} + 0,0295 \log \frac{(\text{NO}_3^-)}{(\text{NO}_2^-)}$$

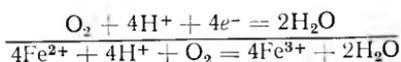


$$\Delta G^0 = -36\,360 \text{ кал}$$

Thiobacillus ferrooxidans



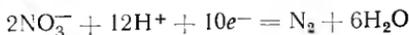
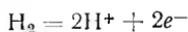
$$E_0 = 0,771 + 0,0591 \log \frac{(\text{Fe}^{3+})}{(\text{Fe}^{2+})}$$



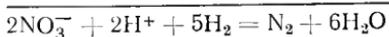
$$\Delta G^0 = -38\,280 \text{ кал}$$



Micrococcus denitrificans

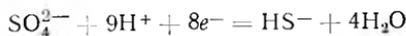
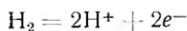


$$E^0 = 1,246 - 0,0709\text{pH} + 0,0059 \log \frac{(\text{NO}_3^-)^2}{\text{pN}_2}$$

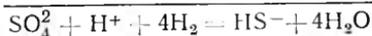


$$\Delta G^0 = -287\,280 \text{ кал}$$

Desulfovibrio

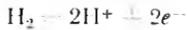


$$E_0 = 0,252 - 0,0665\text{pH} + 0,0074 \log \frac{(\text{SO}_4^{2-})}{(\text{HS}^-)}$$



$$\Delta G^0 = -46\,410 \text{ кал}$$

Methanobacterium



$$E_0 = 0,169 - 0,0591\text{pH} - 0,00741 \lg \frac{\text{pCO}_2}{\text{pCH}_4}$$



$$\Delta G^0 = -31\,380 \text{ кал}$$

Необходимые расчеты для неорганических соединений были сделаны Пурбэ (Pougarbaix, 1963), который приводит уравнения реакций, соответствующие им уравнения потенциалов и дает графическое изображение полей устойчивости. Особенно удобно пользоваться этим методом при изучении литотрофных микроорганизмов в связи с тем, что он широко применяется для описания полей устойчивости минералов (Гаррелс, Крайст, 1968). Литотрофные микроорганизмы могут развиваться в области устойчивости продуктов реакции. Субстрат реакции в этой области неустойчив, но приведенные уравнения ничего не говорят о том, с какой скоростью и каким путем он превращается в продукт. Микроорганизмы используют энергию окислительно-восстановительных реакций, ускоряя эти реакции с помощью своего ферментативного аппарата и направляя поток электронов через цепь переноса электрона. Очевидно, что бактерии конкурируют со спонтанным окислением субстрата, и потому быстро протекающие химические реакции оказываются для них плохим источником энергии. Катализируя реакцию превращения своего энергетического субстрата, литотрофные бактерии значительно изменяют физико-химическую обстановку в среде, вовлекая в цепь превращений ряд других соединений. Побочные реакции, связанные с деятельностью литотрофных бактерий, могут иметь существенное геохимическое значение. Представление о вероятных превращениях можно получить, сопоставляя области устойчивости минералов каждого элемента. Более детально методы расчета для природных ассоциаций минералов приведены у Гаррелса и Крайста (1968).

Литотрофные микроорганизмы используют в качестве источника энергии неорганические вещества, имеющие весьма различный потенциал. Этот потенциал определяет место вступления электронов субстрата в дыхательную цепь организма. У организмов, окисляющих водород, электроны с субстрата могут поступать, так же как у гетеротрофов, на уровне НАД. У нитрификаторов и железобактерий электроны поступают примерно на уровне цитохрома *c*, и разность потенциалов между субстратом и кислородом достаточна только для одного фосфорилирования. Это обуславливает большую нагрузку терминального участка цепи переноса электрона у данных организмов.

Большая потребность системы автотрофной ассимиляции углекислоты в энергии предполагает, что у хемоавтотрофов развита система фосфорилирования и соответственно дыхательная цепь. Если у гетеротрофных организмов $Y_{\text{АТФ}} = 10 \text{ г сухого веса/моль АТФ}$, то у автотрофов, исходя из уравнения ассимиляции углекислоты, можно ожидать величины, раз в 10 меньшей.

Следовательно, при той же скорости роста хемоавтотрофы должны обладать более высоким содержанием компонентов дыхательной цепи.

Кроме АТФ, система автотрофной ассимиляции углекислоты нуждается в поступлении восстановителя на уровне НАДН. У организмов, которые используют субстраты, не позволяющие восстанавливать непосредственно НАД, работает система обратного переноса электрона (см. схему 5).

Система обратного переноса электрона, обнаруженная при окислении янтарной кислоты митохондриями, представляет собой восстановление переносчика электрона с более отрицательным потенциалом переносчиком с более положительным потенциалом за счет использования энергии АТФ (или его предшественника). Таким образом, это процесс переноса электрона против термодинамического потенциала, идущий с затратой энергии. Обратный перенос электрона наблюдают спектрофотометрически по восстановлению НАД в НАДН при одновременном окислении цитохромов в присутствии АТФ. У литотрофных бактерий он был подробно изучен Алимом (Aleem, 1966a, b, c). Для большинства этих организмов обратный перенос электрона представляет существенную реакцию обмена, так как окисляемый субстрат способен восстановить только конечные переносчики цепи переноса электрона. Отсюда получается своеобразная работа цепи в двух направлениях: от места вступления субстрата до конечного акцептора цепь работает с образованием АТФ, а от места вступления субстрата до восстановления НАД — с потреблением АТФ. Естественно, что это резко отражается на количественном соотношении переносчиков электрона: у нитрификаторов и железобактерий необычайно развит конечный участок цепи и имеются лишь небольшие концентрации тех цитохромов, которые обеспечивают обратный перенос (рис. 1, а, б).

Необходимость ограничить возможное использование НАДН чисто синтетическими целями и предотвратить его обратное окисление привело к своеобразной регуляции НАДН-оксидазы у литотрофных бактерий. По мнению Смита и др. (Smith et al., 1967), блокирование реакции окисления НАДН служит не только для сохранения восстановителя, но и ограничивает окисление органических веществ.

Функционирование системы обратного переноса требует дополнительного расхода окисляемого субстрата и соответственно увеличения мощности дыхательной цепи.

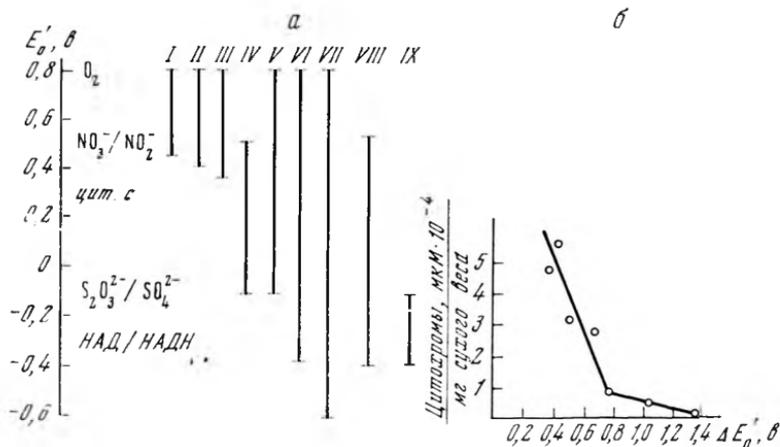


Рис. 1. Зависимость содержания цитохромов у литотрофных бактерий от разности потенциалов донора и акцептора электрона (Лисенкова, 1967)

a — разность потенциалов донора и акцептора электрона:

I — *Nitrosomonas*; *II* — *Nitrobacter*; *III* — *Thiobacillus ferrooxidans*; *IV* — *Thiobacillus denitrificans*; *V* — *Thiobacillus* sp. sp.; *VI* — *Hydrogenomonas*; *VII* — органотрофные аэробы; *VIII* — *Micrococcus denitrificans*; *IX* — *Desulfovibrio*; *б* — содержание суммы цитохромов *b* и *с* у бактерий в зависимости от разности потенциалов донора и акцептор

Сравнительное изучение цитохромной системы хемоавтотрофов и гетеротрофов (Лисенкова, 1967) подтвердило справедливость этих предположений. Хемоавтотрофные бактерии отличаются исключительно высоким содержанием цитохрома *c*, которое в 6—10 раз превышает его содержание у гетеротрофов. Даже митохондрии и частицы электропереносящей цепи имеют меньшее содержание этого цитохрома. Содержание цитохрома *b* у хемоавтотрофов примерно одного порядка с гетеротрофами, это связано, по-видимому, с тем, что у хемоавтотрофов цитохром *b* участвует в обратном переносе электрона.

Как видно из рис. 1, концентрация цитохромов в клетках микроорганизмов находится в обратной зависимости от энергии, получаемой при окислении субстрата. Количественное распределение цитохромов также соответствует ожидаемому: максимальное содержание цитохромов *c* и *a* наблюдается у *Nitrobacter* и *Thiobacillus ferrooxidans*, у которых только этот участок цепи переносит электрон от субстрата к кислороду.

Суммарное действие электрон-переносящей цепи можно оценить по потреблению кислорода на единицу сухого веса организма. Имеющиеся данные показывают, что у хемоавтотрофов электрон-

переноса цепь работает исключительно напряженно (Лисенкова, 1967):

Организм	Мкл O ₂ /мг сухого веса/час	Организм	Мкл O ₂ /мг сухого веса/час
Гетеротрофы	40—100	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	108—150
<i>Acetobacter</i> , <i>Azotobacter</i>	1000—4000	<i>Thiobacillus</i> 70S	520
<i>Nitrosomonas</i>	350	<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	180
<i>Nitrobacter</i>	500	<i>Thiobacillus thiooparus</i>	406
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	1300—1570		

Итак, особенности переноса электрона у литотрофных микроорганизмов обусловлены в первую очередь следующими отличиями их от организмов, использующих органические вещества:

1. Автотрофные микроорганизмы вынуждены расходовать дополнительное количество энергии на ассимиляцию углекислоты, и их энергетические затраты на создание единицы сухого веса значительно выше, чем у гетеротрофных микроорганизмов.

2. При литотрофном способе существования микроорганизмы должны ограничить возможность окисления в энергетических целях эндогенного органического вещества.

3. Использование неорганических доноров электрона с положительным потенциалом обуславливает вступление электронов не в начале цепи переноса электрона на уровне НАД, а в ее середине, ограничивая число возможных фосфорилирований.

4. Необходимость получения для ассимиляции углекислоты восстановителей с более отрицательным потенциалом, чем окисляемый субстрат, требует развитой системы обратного переноса электрона и восстановления НАД за счет АТФ.

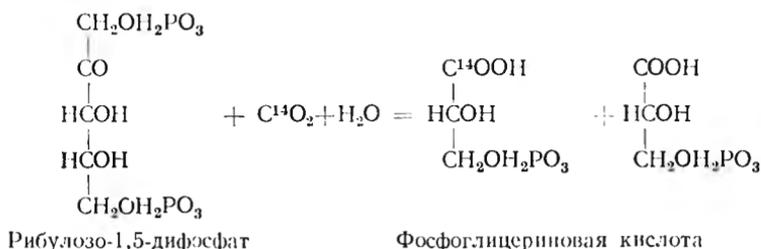
АВТОТРОФНАЯ АССИМИЛЯЦИЯ УГЛЕКИСЛОТЫ

Ферментативная система автотрофной ассимиляции углекислоты представляется весьма сходной почти у всех автотрофных организмов за исключением некоторых анаэробов. Последовательность реакций была установлена в 1957 г. работами Кальвина с сотрудниками (Calvin, Bassham, 1962) при изучении фиксации радиоактивной углекислоты зелеными одноклеточными водорослями. Эта система реакций получила название восстановительного рибулозодифосфатного цикла, восстановительного пентозофосфатного цикла, фотосинтетического цикла, цикла Кальвина. Сразу же после опубликования этой схемы реакции цикла Кальвина были обнаружены у хемоавтотрофных бактерий и признаны универсальным биохимическим механизмом, характеризующим автотрофный способ существования. Схема Кальвина представляет собой пример типичной циклической последовательности реакций мелких молекул, которые присутствуют в каталитических количествах. Цикличность меха-

низма обеспечивает регенерацию акцептора углекислоты и, таким образом, в отличие от нециклических механизмов карбоксилирования, не требует поступления извне дополнительных углеродных соединений. В цикле участвуют фосфорилированные соединения, и это ограждает систему от помех извне: присутствующие в среде и в клетке органические вещества, чтобы вмешаться в течение цикла, должны сначала подвергнуться фосфорилированию. С другой стороны, дефосфорилирование сразу же уводит вещества из сферы действия цикла и направляет на синтез строительных блоков.

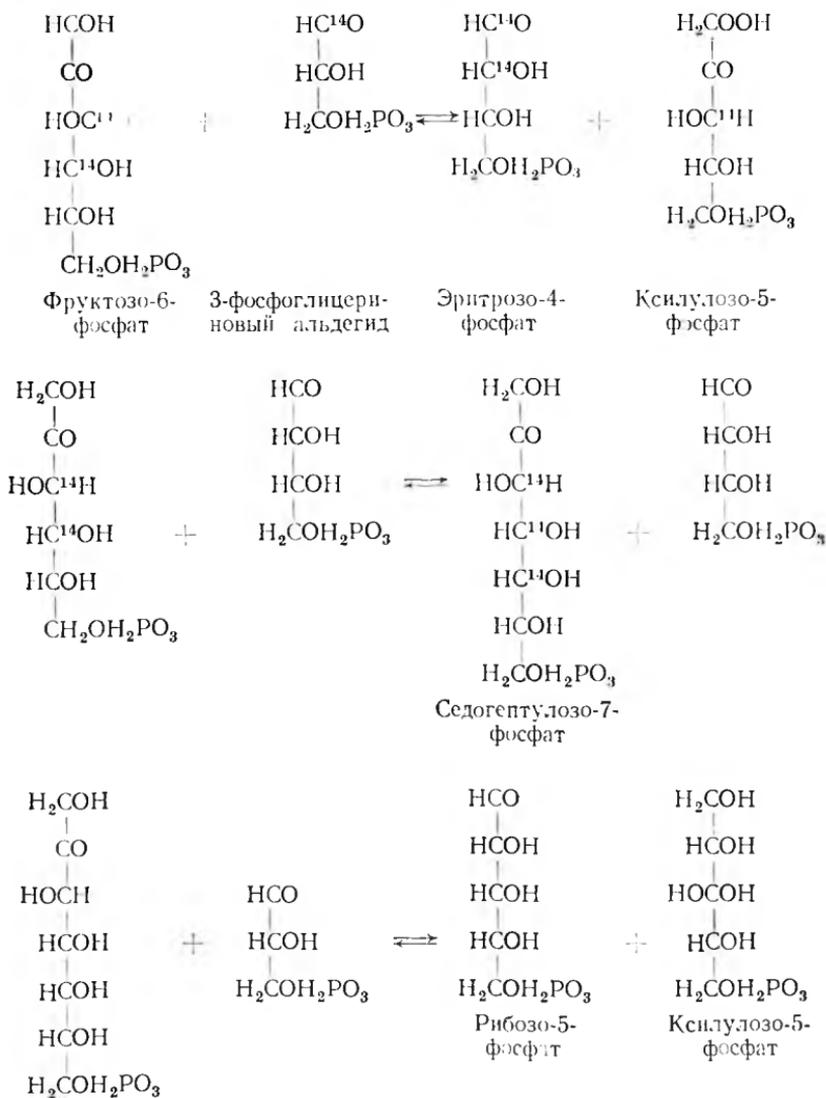
Большинство реакций восстановительного пентозофосфатного цикла сходно с превращениями веществ в других системах, прежде всего в окислительном пентозофосфатном цикле. Направление цикла в сторону ассимиляции углекислоты обеспечивается минимальным числом реакций, свойственных только автотрофам. Поскольку и окислительный и восстановительный пентозофосфатный циклы имеют сходные метаболиты, то пути превращения этих метаболитов в строительные блоки могут быть сходны и у автотрофных и у гетеротрофных организмов. Специфика обмена будет сказываться больше на его регуляции, чем на качественном составе ферментативного аппарата. Отсюда возникает возможность построения метаболической карты, которая в общих чертах применима к большинству автотрофных организмов (схема 6).

Поступающая в клетку (схема 6, реакция 1) углекислота под действием специфического фермента карбоксилазы рибулозо-1,5-дифосфата (карбоксиднемутазы, реакция 2) соединяется с рибулозодифосфатом и быстро превращается в карбоксил первого стабильного продукта автотрофной ассимиляции углекислоты — 3-фосфоглицериновой кислоты:



Дальнейшие реакции цикла сходны с реакциями гликолитического пути и окислительного пентозофосфатного цикла. Фосфоглицераткиназа (НФ 2.7.2.3) фосфорилирует фосфоглицериновую кислоту с использованием АТФ (схема 6, реакция 3). Триозофосфатдегидрогеназа (НФ 1.2.1.13) восстанавливает кислоту в альдегид, используя восстановленные никотинамидденидинуклеотиды, НАДН у бактерий и НАДФН у растений (реакция 4). Триозофосфатизомераза (НФ 5.3.1.1) катализирует установление равновесия между фосфоглицериновым альдегидом и фосфодоксиацетоном

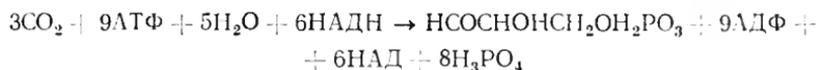
(реакция 5), из которых альдолаза (НФ 4.1.2.7) синтезирует фруктозодифосфат (реакция 6), который превращается во фруктозо-6-фосфат (реакция 7). Дальнейшие реакции катализируются действием транскетаолазы (НФ 2.2.1.1) и трансальдолазы (НФ 2.2.1.2), которые устанавливают равновесие образовавшихся продуктов с рибозо-5-фосфатом и ксилулозо-5-фосфатом (реакции 8,9,10,11). Эти реакции обуславливают распределение меченого углерода углекислоты в углеродном скелете образующихся соединений в соответствии со схемами:



Поскольку остальные реакции цикла не влияют на перераспределение метки по углеродному скелету, то все трехуглеродные соединения должны иметь метку в C₁, фруктозодифосфат — в C₃ и C₄, седогептулозофосфат в C₃, C₄, C₅, рибулоза — в C₁, C₂, C₃ по реакции 11 и дополнительно в C₃ из ксилулозы по реакциям 8 и 11. Экспериментальная проверка подтвердила это распределение и для фотоавтотрофов и для хемоавтотрофов.

Регенерация акцептора углекислоты в восстановительном пентозофосфатном цикле осуществляется изомеризацией фосфонентоз (реакции 12,13) в рибулозо-5-фосфат. Образовавшийся рибулозо-5-фосфат подвергается фосфорилированию специфическим для автотрофов ферментом фосфорилирующей киназой (НФ 2.7.1.19) с использованием АТФ и образованием рибулозо-1,5-дифосфата (реакция 14). На этом цикл замыкается и регенерируется акцептор углекислоты.

Как видно из приведенной схемы, фиксация углекислоты сама по себе не требует энергии, но регенерация субстрата идет с использованием восстановителя (реакция 4) и энергии в виде АТФ (реакции 3 и 14). Ассимиляция одного моля углекислоты сопровождается использованием трех молей АТФ (на образование рибулозо-1,5-дифосфата один моль и на фосфорилирование фосфоглицериновой кислоты два моля) и двух молей НАДН (на восстановление двух молей образовавшейся фосфоглицериновой кислоты в альдегид). Суммарная реакция цикла для образования фосфотриозы имеет следующие коэффициенты



Из суммарной реакции цикла видно, что непрерывное вовлечение углекислоты в обмен автотрофа может осуществляться при поступлении извне энергии АТФ и восстановителя НАДН. Все остальные соединения образуются во время действия цикла. Следовательно, от энергетического обмена автотрофа поступают лишь восстановитель и энергия, транспортируемые соответствующими переносчиками АТФ и НАДН. Системы энергетического и конструктивного обмена у автотрофов не имеют других общих метаболитов. Поэтому взаимосвязь между этими двумя потоками реакций может регулироваться уровнем АТФ и НАДН в клетке.

Доказательством существования рибулозодифосфатного цикла у организма должно, по мнению Квайля (Quayle, 1961), служить установление следующих фактов.

1. Фосфоглицериновая кислота — первый продукт ассимиляции CO₂, а распределение меченой углекислоты по углеродному скелету соответствует предсказываемому циклом.
2. Последовательность реакций носит циклический характер.
3. В организме присутствуют все ферменты, необходимые для действия цикла.

Цикл Кальвина у хемоавтотрофов впервые установили Трудингер (Trudinger, 1955, 1956) в Англии и Обер, Мило, Мийе (Aubert

et al., 1956, 1957a, b, c) во Франции. Объектом исследования в обоих случаях служил *Thiobacillus denitrificans*. Впоследствии методика исследований стала стандартной и была повторена со многими организмами. Суспензию бактерий в свежей среде инкубировали в присутствии меченого бикарбоната. После различного времени инкубации бактерии убивали, быстро экстрагировали кипящим спиртом и экстракт хроматографировали на бумаге. С помощью радиоавтографии устанавливали положение меченых соединений и определяли количество радиоактивного углерода.

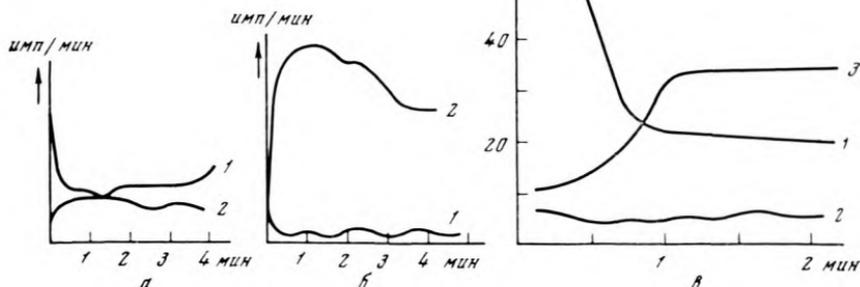
Идентификация образующихся соединений обнаруживает фосфорные эфиры сахаров, участвующих в рибулозодифосфатном цикле. Рассматривая кинетику включения углекислоты в меченые соединения (рис. 2), можно установить, что при коротких экспозициях большая часть углекислоты содержится в фосфоглицериновой кислоте, а затем начинают накапливаться фосфаты сахаров. Следовательно, фосфоглицериновая кислота является первым стабильным продуктом ассимиляции $C^{14}O_2$.

Циклический характер автотрофной ассимиляции углекислоты удалось показать, лишая организм либо восстановителя, либо углекислоты (Aubert et al., 1957b, c). В первом случае весь запас рибулозо-1,5-дифосфата превращался в фосфоглицериновую кислоту (рис. 2, а), во втором — накапливался рибулозо-1,5-дифосфат (рис. 2, б).

Ферментативное исследование фиксации углекислоты основывается на изучении карбоксилирования в бесклеточных экстрактах. В качестве акцептора углекислоты служит либо рибулозо-1,5-дифосфат, либо рибозо-5-фосфат, НАДН и АТФ. В последнем

Рис. 2. Кинетические кривые фиксации $C^{14}O_2$ *Thiobacillus denitrificans* (Aubert et al., 1957b, c)

а — клетки лишены тиосульфата; б — клетки лишены углекислоты; в — нормальный ход кривых в присутствии тиосульфата и CO_2 ; 1 — фосфоглицериновая кислота; 2 — рибулозодифосфат; 3 — гексозо-6-фосфат

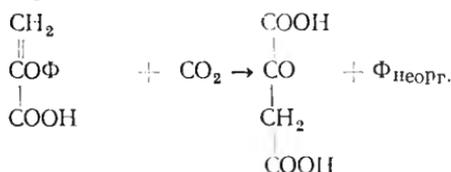


случае в экстракте предполагается активное действие не только карбоксидисмутазы, но и ряда ферментов: фосфорилбулокиназы и изомераз. В отсутствие АТФ рибозо-5-фосфат быстро превращается в смесь фосфосахаров, демонстрируя обратимость пути от рибозо-5-фосфата до фосфоглицеринового альдегида (схема 6, реакции 6—13).

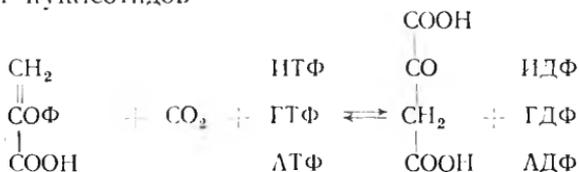
За истекшие годы автотрофная фиксация углекислоты была изучена практически у всех культивируемых хемоавтотрофов и показано, что у этих организмов 90% углекислоты включается через цикл Кальвина. Пока нет оснований полагать, что у хемоавтотрофов вместо цикла Кальвина функционирует какой-либо иной путь автотрофной ассимиляции углекислоты.

Кроме основного пути вовлечения углерода углекислоты через цикл Кальвина у автотрофов функционируют и другие карбоксилирующие ферменты, которые участвуют в синтезе важных для клетки метаболитов без потери углекислоты. Литература по этим ферментам сведена в обзоре Романовой (1968). Наибольшее значение имеют системы карбоксилирования фосфоенолпирируиноградной кислоты (ФЕП):

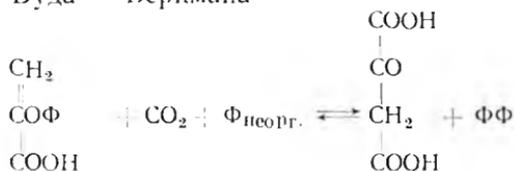
1. ФЕП-карбоксилаза необратимого действия (НФ 4.1.1.31), катализирующая реакцию



2. Карбоксикиназа ФЕП (НФ 4.1.1.32) обратимая, требующая присутствия нуклеотидов

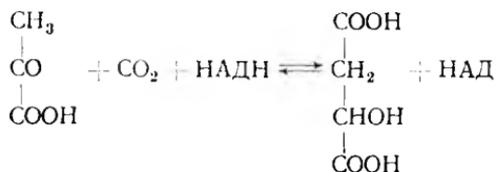


3. ФЕП-карбокси-*транс*-фосфориллаза, фермент, катализирующий реакцию Вуда — Веркмана



Эти реакции ведут от ФЕП к шагелюужесуеисой кислоте. Кроме того, возможно карбоксилирование нефосфорилированной пиро-

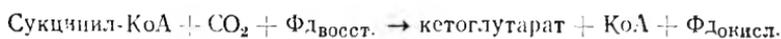
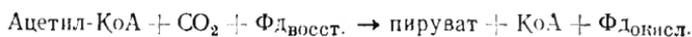
виноградной кислоты с участием «малик-энзима» (НФ 1.1.1.40):



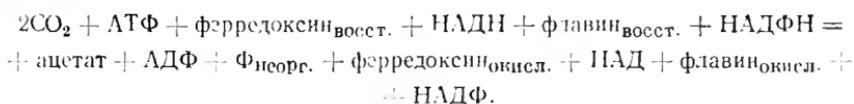
Реакции указанного типа приводят к быстрому включению углерода C^{14}O_2 в компоненты цикла Кребса и образованию аминокислот: глутаминовой и аспарагиновой, которые вместе с пировиноградной, уксусной, янтарной, яблочной, фумаровой, лимонной, оксималяной появляются примерно через 1 мин. экспозиции. ФЕП-карбоксилаза обнаружена у тионовых бактерий, где ей приписывается значительная роль, у нитрифицирующих и водородных бактерий.

Кроме разобранного типа ассимиляции углекислоты у фотосинтезирующих бактерий было обнаружено значительное включение углекислоты при росте на ацетате. Ферментные препараты из *Chlorobium thiosulphatophilum* фиксируют CO_2 на ацетил- и сукцинилкоферменте А, образуя соответственно пируват и кетоглутарат.

Обе реакции, катализируемые пируватсинтазой и кетоглутаратсинтазой, идут с участием восстановленного ферредоксина (ФД):



Действие этих ферментов позволяет функционировать восстановительному циклическому механизму (Evans et al., 1966), в котором происходит фиксация четырех молекул углекислоты путем обращения цикла Кребса и образуется щавелевоуксусная кислота (схема 7). Суммарная реакция восстановительного цикла органических кислот:



В последнее время уделяют внимание также так называемой С-4 фиксации, при которой меченый углерод углекислоты появляется сначала не в фосфоглицериновой кислоте, а в дикарбоксильных четырехуглеродных кислотах. По сути дела это реакция транспорта углекислоты через реакцию карбоксилирования фосфоэнолпирувата к рибулозодифосфату; окончательная ассимиляция происходит в обычном восстановительном пентозофосфатном цикле.

Исторический интерес представляет так называемая запаздывающая фиксация углекислоты. Исследуя образование АТФ тионо-

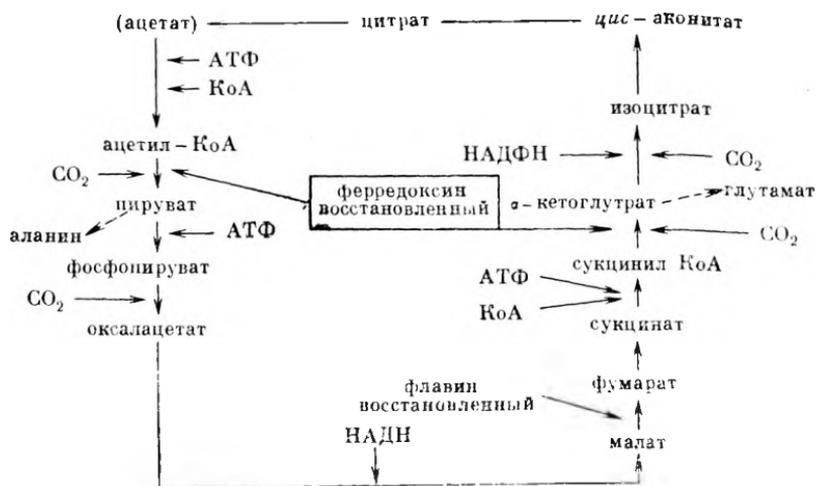


Схема 7. Восстановительный цикл карбоновых кислот (Evans et al., 1966)

выми бактериями, Фоглер и Умбрейт (Vogler, Umbreit, 1942) нашли, что во время окисления серы в отсутствие CO_2 неорганический фосфат потребляется клеткой. Если затем в анаэробных условиях предоставить клетке возможность ассимилировать углекислоту, то углекислота используется, а фосфат выделяется в среду. Было предположено, что клетки запасают макроэргические фосфорные соединения, за счет которых происходит фиксация углекислоты. Последующие работы подтвердили, что с помощью чувствительных изотопных методов можно уловить слабую фиксацию углекислоты, но количественно она несравнимо меньше той, которая была показана Фоглером и Умбрейтом (Baalsrud, Baalsrud, 1952; Umbreit, 1954; Newburgh, 1954; Remer, 1957; Kanai et al., 1961).

Наиболее четкие результаты, полученные с водородными бактериями, показали, что клетки *Hydrogenomonas facilis*, предварительно инкубированные в атмосфере гремучего газа и перенесенные затем в анаэробные условия, фиксировали $8 \cdot 10^{-9}$ моля $\text{CO}_2/\text{мг}$ сухого веса по сравнению с $1 \cdot 10^{-9}$ моля $\text{CO}_2/\text{мг}$ сухого веса у клеток, выдерживавшихся в аэробных условиях. Вся поглощенная углекислота фиксировалась за первую минуту контакта. Вещество, ответственное за фиксацию углекислоты, очень лабильно и быстро разрушалось.

Таким образом, предположение о накоплении в клетке значительного запаса макроэргических соединений несостоятельно. Кроме того, накапливающиеся в отсутствие углекислоты акцепторы присутствуют в клетке в каталитических количествах, и их запас может обеспечить лишь очень короткую фиксацию углекислоты.

СИНТЕЗ МОНОМЕРОВ ХЕМОАВТОТРОФАМИ

Принимается как само собой разумеющееся, что синтез мономеров хемоавтотрофами не отличается от путей синтеза этих соединений у гетеротрофных микроорганизмов. Поскольку хемоавтотрофы могут расти в чисто минеральной среде, то, следовательно, они способны синтезировать все необходимые для своего роста вещества. В этом отношении они не отличаются существенно от гетеротрофов, использующих простые органические вещества как единственный источник углерода. Из рассмотрения схемы 6 видно, что среди ранних продуктов ассимиляции углекислоты могут появляться такие аминокислоты, как глутаминовая, аспарагиновая, аланин, серин. Они могут служить исходными соединениями для синтеза других аминокислот и азотистых оснований в соответствии с метаболическими путями, хорошо выясненными для гетеротрофов. Углеводные компоненты получают в восстановительном пентозофосфатном цикле. Липидные соединения могут быть получены в превращениях жирных кислот, следующих за фосфоэнолпируватом.

Своеобразие хемоавтотрофов состоит в том, что требующий большой затраты энергии процесс усвоения углекислоты вынуждает организмы очень экономно расходовать углеродсодержащие соединения. Распределение меченных по углероду соединений у хемоавтотрофов и определение активности ферментов показали, что эти организмы осуществляют превращения веществ внутри клетки по обычным путям метаболизма и обладают необходимыми для этого ферментами. Оставалось тогда неясным, почему хемоавтотрофные организмы не только не могут усваивать органические вещества для поддержания своей жизнедеятельности, но в некоторых случаях эти вещества, как известно начиная с работ Виноградского, оказывают подавляющее действие.

Исходя из представления о полноценном механизме внутриклеточного обмена, предполагали, что у хемоавтотрофов органические вещества не поступают внутрь клетки. В некоторых случаях представление об избирательной проницаемости может быть и справедливо, но для многих органических веществ с помощью радиоактивной метки было показано, что они поступают в клетку у различных хемоавтотрофов (Rittenberg, 1969). Включение органических веществ происходило параллельно росту и требовало одновременного окисления неорганического субстрата как источника энергии. Вместе с тем некоторые вещества, как например фенилаланин у *Thiobacillus neapolitanus*, вызывали резкое торможение роста. Эти вещества не подвергались разложению в организме с выделением углекислоты, а включались в белки и нуклеиновые кислоты либо непосредственно, либо после некоторых превращений по обычным путям биосинтеза, например, пролин и аргинин образовывались из глутаминовой кислоты, аденин и гуанин — из глицерина. Избыточное включение фенилаланина в белки *Thiobacillus* и приводило к

подавлению роста этой аминокислотой (Kelly, 1967a). Таким образом, общий ответ на вопрос, почему органические вещества подавляют иногда рост хемоавтотрофов, заключается в том, что в этом случае они нарушают регуляцию автотрофного обмена.

После того как было показано, что автотрофные организмы обладают многими ферментами, обеспечивающими превращение метаболитов по тем же путям обмена, которые свойственны и гетеротрофам, возник вопрос о механизмах, которые играют роль клапанов и предотвращают разложение ассимилированного углерода. Работы по изучению ассимиляции меченых органических соединений в обмене хемоавтотрофов привели к установлению четкой гипотезы биохимических основ облигатной автотрофии (Smith et al., 1967). Изучение распределения метки из меченых органических соединений между компонентами цикла Кребса показало, что у некоторых строгих автотрофов этот цикл разорван после α -кетоглутаровой кислоты, и вместо цикла имеются две цепи биосинтетических реакций. Эту функцию цикла у строгих хемоавтотрофов и отражает накопление глутаминовой и аспарагиновой кислот как конечных продуктов первого этапа биосинтеза (Kelly, 1967c). Такие предшественники аминокислот, как ацетат, включаются не во все аминокислоты, и распределение метки при этом показывает, что не все превращения по циклу Кребса возможны, и, таким образом, цикл разорван. Вероятным местом разрыва является реакция превращения α -кетоглутаровой кислоты в янтарную. Прямые определения активности ферментов показали, что фермент, катализирующий это превращение, отсутствует у облигатных автотрофов. Цикл трикарбоновых кислот функционирует как чисто синтетический механизм. Утечка энергии устраняется так же отсутствием у облигатных автотрофов НАДН-оксидазы. Многим автотрофам приходится получать восстановитель для синтетических реакций через обратный перенос электрона. Основным потребителем НАДН становится тогда рибулозодифосфатный цикл. Отсутствие НАДН-оксидазы понижает уровень НАД в клетке и ограничивает возможность окисления органических веществ. Таким образом, по этой гипотезе биохимическим основанием облигатной автотрофии служит дефект ферментативного механизма.

Гипотеза (Smith et al., 1967) побудила исследовать активность ферментов цикла Кребса и НАДН-оксидазы практически у всех хемоавтотрофов. НАДН-оксидаза была обнаружена у многих из них, а ферменты цикла Кребса имели такую же активность не только у автотрофов, но и у гетеротрофов, например, у *E. coli*. Следовательно, у автотрофов имеются и более тонкие механизмы регуляции, возможно, различные у представителей разных групп.

Синтез нуклеиновых кислот и белка у хемоавтотрофов пока не изучен и поэтому нет оснований думать, что он отличается от установленного для других бактерий (Спирин, Гаврилова, 1968).

Большое внимание было уделено синтезу запасных веществ

хемоавтотрофами. Под запасными веществами бактериальной клетки понимают вещества, которые накапливаются в богатой питательной среде и расходуются, когда клетка попадает в бедную среду. Эндогенный обмен в клетке не обязательно обеспечивается только запасными веществами: при голодании происходит быстрое разрушение компонентов, участвующих преимущественно в синтетических реакциях, таких как некоторые ферментативные белки, рибосомальная РНК. У литотрофов следует различать специфические запасные вещества — серу в клетках серобактерий — и обычные, как, например, полимер β -оксимасляной кислоты, широко распространенный у всех аэробных бактерий.

Первые работы Виноградского с серобактериями позволили ему установить тип обмена этих организмов по природе их запасного вещества. Опыты Виноградского были поставлены по той логической схеме, которая применяется до сих пор для установления функционирования компонента клетки в качестве запасного вещества. Виноградский (1952) наблюдал за накоплением серы в клетках нитчатых серобактерий в присутствии окисляемого субстрата — сероводорода и потреблением ее в среде, лишенной сероводорода. Точно такие же наблюдения, но сопровождающиеся количественным химическим анализом, применяются и теперь. Сера у серобактерий действительно является запасным веществом. Наблюдения Виноградского над динамикой серы в клетках были подтверждены на *Beggiatoa*, *Thiothrix* (Bahr, Schwartz, 1957), *Thioploca* (Wislouch, 1912), *Achromatium* (Devide, 1954), *Thiovulum* (La Riviere, 1963).

Своеобразный эндогенный обмен наблюдается у *Nitrosomonas*. Бемеке (Bönicke, 1939) исследовал обмен нитрифицирующих бактерий, полностью использовавших источники азота в среде, и нашел, что они продолжали потреблять кислород со скоростью, составлявшей $\frac{1}{100}$ от нормальной. Тщательно отмытые от среды клетки *Nitrosomonas* в течение нескольких суток продолжают выделять в среду нитрит, источником которого могут быть только внутриклеточные запасы азотистых веществ (Рубан, Заварзин, 1955). Добавление убитых клеток не увеличивало выделения нитрита. С прекращением выделения нитрита культура оказывалась нежизнеспособной. Явление это находит объяснение в том, что клетки *Nitrosomonas* сравнительно богаты азотистыми веществами (Рубан, 1961). Известно, что при голодании происходит разрушение нуклеиновых кислот и выброс в среду азотистых соединений, которые могут служить субстратом нитрификации. У *Nitrobacter* такого явления не наблюдается.

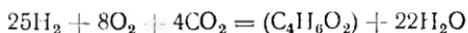
Широко распространенными углеродсодержащими запасными веществами (Wilkinson, 1963) автотрофных бактерий являются полисахариды и полимер оксимасляной кислоты («жировые гранулы»). Путь синтеза полимера оказался аналогичен тому, который был установлен у гетеротрофных организмов (Doudoroff, Stamer, 1952, Merrick, Doudoroff, 1961).

Накопление указанного полимера у водородных бактерий происходит при недостатке в среде азота. После исчерпания азота синтез белка прекращается, но мутность продолжает расти. Увеличение сухого веса клеток происходит за счет синтеза поли- β -оксимасляной кислоты, которая может буквально переполнять клетку, достигая 70% от ее веса. На электронных микрофотографиях срезы водородных бактерий заполнены прозрачными для электронного пучка гранулами полимера, окруженными тонкой белковой мембраной.

Механизм синтеза полимера оксимасляной кислоты у водородных бактерий был детально исследован Шлегелем и сотр. (Hirsch et al., 1963; Gottschalk, 1964). При фиксации $C^{14}O_2$ суспензией *Hydrogenomonas* в фосфатном буфере в атмосфере гремучего газа происходит образование меченых компонентов рибулозодифосфатного цикла, кроме того, заметная часть активности была в уксусной и оксимасляной кислотах. Дегградация образовавшегося полимера показала равномерное включение изотопа в углеродный скелет. В бесклеточных экстрактах были найдены фосфоглицератмутаза (НФ 2.7.5.3), фосфопируватгидратаза («енолаза», НФ 4.2.1.11), пируваткиназа (НФ 2.7.1.40), действующие по схеме:



Образование ацетил-КоА из пирувата по этому пути ведет к потере $1/3$ ассимилированной углекислоты. Установлено (Gottschalk, 1964), что в отсутствие усвояемого азота накопление углерода идет примерно на 30% медленнее. Суммарное уравнение синтеза β -оксимасляной кислоты водородными бактериями:



Процесс требует следующих затрат энергии:



Использование полимера оксимасляной кислоты осуществляется под воздействием внеклеточных и внутриклеточных деполимераз. Исследование внеклеточного разложения полимера псевдомонадами (Delafield et al., 1965) показало, что из 400 штаммов 39 способ-

ны к внеклеточному гидролизу полимера. Все эти организмы потребляли, кроме поли- β -оксимасляной кислоты, оксипутират, малат, пируват, ацетат, но не лактозу, мальтозу, целлобиозу или крахмал и все они накапливали полимер внутриклеточно, как запасное вещество. Среди организмов, разлагающих полимер β -оксимасляной кислоты, оказались и водородные бактерии *Hydrogenomonas facilis* и *H. pantotropha*.

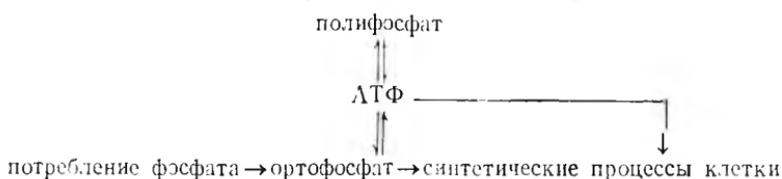
Полимер оксимасляной кислоты может служить у водородных бактерий субстратом эндогенного дыхания. Клетки *Hydrogenomonas*, богатые полимером, сохраняли высокий уровень эндогенного дыхания, в то время как клетки, бедные им, быстро снижали потребление кислорода. Запас полимера в клетках предохраняет от разрушения белки, по исчерпанию его в среде начинает появляться аммиак из белковых соединений, однако на выживаемость клеток содержание полимера не оказывает влияния. Добавление источника азота в среду вызывает увеличение потребления кислорода на 60—80% и увеличение содержания азота в клетках, указывая на возможность использования полимера оксимасляной кислоты для синтеза белка.

Контроль над потреблением полимера может осуществляться двояким образом: или лимитирующей реакцией является деполимеризация, или же реакция лимитируется дыхательной цепью. В клетках *Hydrogenomonas* имеется внутриклеточная деполимеразы, действие которой на интактные гранулы полимера многократно усиливается добавлением трипсина (Нирре, 1967). С другой стороны, в полном соответствии с данными для митохондрий использование внутриклеточного субстрата и, следовательно, эндогенное дыхание многократно усиливается под действием разобщителей, таких как диинитрофенол, метиленовая синь (Нирре, 1967). Отсюда следует, что оба контрольных механизма использования полимера могут иметь значение. В присутствии водорода окисление полимера оксимасляной кислоты сильно задерживается.

К неорганическим запасным веществам можно отнести и полифосфаты. Накопление гранул полифосфата («метахроматина») в клетках бактерий давно известно из цитологических наблюдений. На ультратонких срезах гранулы полифосфата обнаруживаются в виде весьма электронноплотных округлых образований и отмечены у большинства хемоавтотрофов. Количественный анализ показывает, что полифосфаты могут составлять значительную часть фосфорных соединений клетки (в %): *Thiobacillus thiooxidans* — 61 (Barker, Kornberg, 1954), *Nitrobacter* — 38 (Butt, Lees, 1960), *Hydrogenomonas* — 30 (Schlegel, Kaltwasser, 1961).

Подробно физиологическую роль полифосфатов у водородных бактерий исследовал Кальтвассер (Kaltwasser, Schlegel, 1959; Kaltwasser et al., 1962; Kaltwasser, 1962). Если рост *Hydrogenomonas* Н-20 происходит при лимитированном содержании фосфора в среде (1,9 мг/л), то по исчерпанию его рост прекращался. Перенесен-

ные в среду с высоким содержанием фосфора клетки быстро поглощали фосфат, достигая стационарного состояния уже через 20 мин., если находились в аэробных условиях. В анаэробных условиях, когда было исключено окисление водорода и эндогенных запасных веществ, фосфат в клетку не включался. Продуктом включения фосфора в клетку были полифосфаты, содержание которых увеличивалось от 0,2 до 1 мг/г сухого веса. Добавление источника азота приводило к включению фосфора в нуклеиновые кислоты. По истечении внешнего источника фосфора для синтеза нуклеиновых кислот использовались полифосфаты. Таким образом, полифосфаты являются типичным запасным веществом. Полимеризация фосфата позволяет поддерживать нормальную внутриклеточную концентрацию фосфора. Кальтвассер (Kaltwasser, 1962) предложил следующую схему обмена полифосфата у водородных бактерий:



ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ОБМЕНА

Как было показано на гетеротрофных организмах, количество веществ тела клетки, образуемых на 1 моль АТФ, синтезированного в процессе окисления субстрата ($Y_{\text{АТФ}}$), является величиной приблизительно постоянной и соответствует 10 г сухого веса/моль АТФ.

У аэробных микроорганизмов в качестве хорошего приближения можно принять, что 60% углерода органических соединений используется для построения клетки, а 40% выделяется в виде углекислоты (Raupе, 1970). У анаэробов принимается обычно, что источником углерода служат иные вещества, чем сбраживаемый субстрат. Урожай аэробных гетеротрофных бактерий составляет 3,14 г веса клеток на доступный электрон, что соответствует коэффициенту использования свободной энергии около 60%.

У хемоавтотрофных бактерий значительное количество АТФ расходуется в процессе ассимиляции углекислоты. Суммарное уравнение ассимиляции углекислоты дает соотношение 9 молей АТФ и 6 молей НАДН для синтеза из углекислоты каждого моля трехуглеродного мономера. Отсюда следует, что автотрофы должны затрачивать примерно в 3—10 раз больше энергии на синтез единицы сухого веса, чем гетеротрофы.

Виноградский (1952) в первых же своих опытах с нитрифицирующими бактериями в 1890 г. установил, что ассимиляция 1 мг углерода происходит при окислении 35,4 мг азота, что равно 96 мг азо-

тистой кислоты. Вскоре Мейергоф (Meyerhof, 1916, 1917a, b) нашел, что отношение количеств окисленных соединений азота у *Nitrobacter* и у *Nitrosomonas* примерно обратно пропорционально отношению количества тепла, выделяемого при реакциях окисления и, следовательно, эффективность использования энергии примерно одинакова. Мейергоф провел прямой калориметрический опыт и нашел хорошее совпадение с расчетной величиной. По его определениям нитрификаторы закрепляли примерно 5% теплоты реакции в виде теплоты образования веществ клеточного тела.

Впоследствии было произведено много термодинамических расчетов эффективности использования окисления субстрата автотрофными микроорганизмами. Баас-Беккинг и Паркс (Baas Beeking, Parks, 1927) положили в основу расчета не теплоту образования, а свободную энергию. Их расчеты были основаны на данных, полученных в стационарных культурах. В общем получилось, что коэффициент использования свободной энергии гетеротрофами составляет около 30%, а у автотрофов — в среднем 7%.

Термодинамические расчеты имеют большое значение для ориентировочной оценки возможности использования той или иной реакции в жизнедеятельности микроорганизма, но необходимо учитывать, что, насколько известно, организмам доступна только энергия окислительно-восстановительной реакции, а не реакций кристаллизации, растворения и т. д. Не вся свободная энергия может быть использована организмом, а только та, которая закрепляется в форме универсального переносчика энергии — АТФ.

Бактериальную культуру только в первом приближении можно считать неизменяющейся в процессе роста. Многократные определения использования свободной энергии у хемоавтотрофов показали, что, как правило, соотношение между окисленным субстратом и ассимилированным углеродом закономерно изменяется по мере развития культуры, причем изменения могут иметь размах от 30 до 3% (Hofman, Lees, 1952; Ляпкина, 1958).

Условия, в которых находится организм, метод определения в краткосрочных или длительных опытах — все это сильнее всего образом сказывается на результатах. Определения величины урожая в зависимости от скорости роста были сделаны для типовых бактерий *Thiobacillus* (Hempfling, Vishniac, 1967). Оказалось, что в проточной культуре величина Y непостоянная и закономерно изменяется.

Уместно напомнить вывод Лебедева, сделанный более полувека назад для хемосинтеза водородных бактерий (Лебедев, 1910, стр. 47): «Величина респирационного коэффициента зависит от возраста культуры и сильно уклоняется в обе стороны от среднего коэффициента за весь период культуры. Конечно, возраст культуры сам по себе не может иметь никакого влияния на респирационный коэффициент, но с возрастом связано то или иное соотношение ассимиляционных и энергетических процессов, и преобладающий

в данном возрасте культуры процесс будет оказывать наибольшее влияние на респирационный коэффициент...».

Рост хемоавтотрофных организмов подчиняется тем же закономерностям, что и рост любых других бактерий. Основные положения теории роста разработаны Моно (Monod, 1942, 1950), однако впоследствии было сделано много попыток уточнить ее.

Микроорганизмы могут развиваться в среде, образуя гомогенно распределенную суспензию или агрегаты в виде колоний, ценобиев и т. п. Рост в виде агрегатов с трудом поддается математическому анализу, хотя биологические преимущества такого типа роста для некоторых условий очевидны.

Рассмотрим процесс использования чистой культурой организма питательного субстрата в определенном объеме среды. Допустим, что соблюдаются такие условия, при которых рост организма ограничен только потреблением субстрата.

В общей форме очевидно, что скорость увеличения биомассы микроорганизмов (или любой пропорциональной ей величины) в единице объема среды в данных условиях пропорциональна уже имеющемуся количеству организмов:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x_0, \quad (1)$$

где $\frac{dx}{dt}$ — скорость роста, x — концентрация микроорганизмов, t — время, а μ — коэффициент пропорциональности, удельная скорость роста. Интегрируя при $t=0$, $x=x_0$, получаем $\ln x - \ln x_0 = \mu t$, откуда удельная скорость роста вычисляется по формуле

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{x}{x_0} = \frac{1}{t} \cdot 2,3 (\log x - \log x_0) \quad (2)$$

Размерность μ обычно час⁻¹. Иногда для расчетов применяется время удвоения концентрации микроорганизмов, которое равно

$$g = \frac{0,693}{\mu} \text{ час.}$$

Потенцируя (2), получаем

$$e^{\mu t} \frac{x}{x_0}; \quad x = x_0 e^{\mu t}$$

Фаза роста, в которой сухой вес бактерий увеличивается экспоненциально, называется фазой экспоненциального роста.

Если каждое последующее поколение микроорганизмов совершенно идентично предыдущему (что справедливо далеко не для всех условий), на создание определенного количества вещества клеток затрачивается определенное количество субстратов:

$$\frac{dx}{dt} = -y \frac{ds}{dt}, \quad (3)$$

где s — концентрация субстрата, а y — постоянная, константа урожая. Знак минус означает потребление субстрата. Из (3) следует, что график отношения концентрации микроорганизмов к концентрации использованного субстрата представлен прямой линией, тангенс угла наклона которой равен y , константе урожая. Она может быть вычислена или графически или методом наименьших квадратов. На самом деле величина $-y$ непостоянная.

Моно предположил и подтвердил экспериментально, что между удельной скоростью роста и концентрацией субстрата имеется гиперболическое соотноше-

ние, аналогичное уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s}, \quad (4)$$

где μ_{\max} — константа, представляющая максимальную скорость роста; K_s — константа насыщения, численно равная концентрации субстрата, при которой $\mu = 1/2 \mu_{\max}$.

Вычисление этих величин производится методом Ланувера—Берка.

Из (4) имеем:

$$\mu K_s + \mu s = \mu_{\max} s$$

Делим на $\mu s \mu_{\max}$ и получаем

$$\frac{K_s}{s \mu_{\max}} + \frac{1}{\mu_{\max}} = \frac{1}{\mu}$$

Зависимость $1/\mu$ от $1/s$ дает возможность вычислить величины K_s и μ_{\max} либо графически, как на рис. 3, либо методом наименьших квадратов.

Решение уравнения Моно приводит к S-образной кривой, на которой отсутствует фаза задержки роста. Согласно (3) имеем

$$\frac{dx}{dt} = -y \frac{ds}{dt}.$$

Интегрируем, полагая начальные условия $t=0, x=x_0, s=s_0$

$$\int_{s_0}^s ds = \int_{x_0}^x -y dx$$

Из (4)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s} \quad \text{и из (1)} \quad \mu = \frac{dx}{x dt}$$

получаем:

$$\frac{dx}{x dt} = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s}.$$

Подставляем значение

$$s = s_0 + yx_0 - yx.$$

$$\frac{dx}{x dt} = \mu_{\max} \frac{s_0 + yx_0 - yx}{K_s + s_0 - yx + yx_0}$$

Разделяем переменные

$$\mu_{\max} dt = \frac{K_s + s_0 - yx + yx_0}{s_0 + yx_0 - yx} \cdot \frac{dx}{x}$$

Разделив числитель правой части на $s_0 - yx + x_0$, приводим к виду, удобному для интегрирования $\mu_{\max} dt = \frac{K_s}{s_0 yx + yx_0} \cdot \frac{dx}{x} + \frac{dx}{x}$

Интегрируем от 0 до t и от x_0 до x

$$\begin{aligned} \int_0^t \mu_{\max} dt &= \int_{x_0}^x \frac{K_s}{s_0 - yx + yx_0} \cdot \frac{dx}{x} + \int_{x_0}^x \frac{dx}{x} \\ \mu_{\max} t &= \frac{K_s}{s_0 + yx_0} \ln \frac{x}{s_0 + yx_0 - yx} - \frac{K_s}{s_0 + yx_0} \ln \frac{x}{s_0 + yx_0 - yx} + \\ &+ \ln x - \ln x_0 = \frac{K_s}{s_0 + yx_0} [\ln x - \ln (s_0 + yx_0 - yx) - \ln x_0 + \ln s_0] + \\ &+ \ln \frac{x}{x_0} = \frac{K_s}{s_0 + yx_0} \ln \frac{x}{x_0} + \ln \frac{x}{x_0} - \frac{K_s}{s_0 + yx_0} \ln \frac{s_0 + yx_0 - yx}{s_0}. \end{aligned}$$

Окончательно:

$$\mu_{\max} t = \frac{K_s \cdot s_0 + yx_0}{s_0 + yx_0} \ln \frac{x}{x_0} = \frac{K_s}{s_0 + yx_0} \ln \frac{s_0 - yx_0 - yx}{s_0}$$

Условия, для которых вычислено уравнение Моно, не учитывают изменения состава биомассы во время роста культуры. Между тем хорошо известно, что состав биомассы, взятой в разные моменты роста, неодинаков. Во время роста культуры имеют место процессы регуляции обмена, синтеза преимущественно тех или других компонентов. В сложной системе сопряженных химических реакций, осуществляемых клеткой, скорости отдельных реакций устанавливаются таким образом, чтобы обеспечить максимальную скорость всей разветвленной цепи реакций. Химические компоненты биомассы, занимающие определенное положение относительно друг друга в системе синтезов, как например, в последовательности нуклеиновые кислоты — белки — запасные вещества, закономерно изменяют свою концентрацию в процессе роста. Исследования математической модели структурированного роста, учитывающей эти отношения между компонентами биомассы, показали, что изменения их концентрации не требуют включения специальных регуляторных механизмов, а автоматически следуют из математических закономерностей (Ramkrishnan et al., 1967). Структурированная модель бактериального роста хорошо описывает образование фазы задержки роста и изменения в составе биомассы (рис. 4). Изменение концентрации различных компонентов в клетках водородных бактерий происходит в соответствии с описанными закономерностями

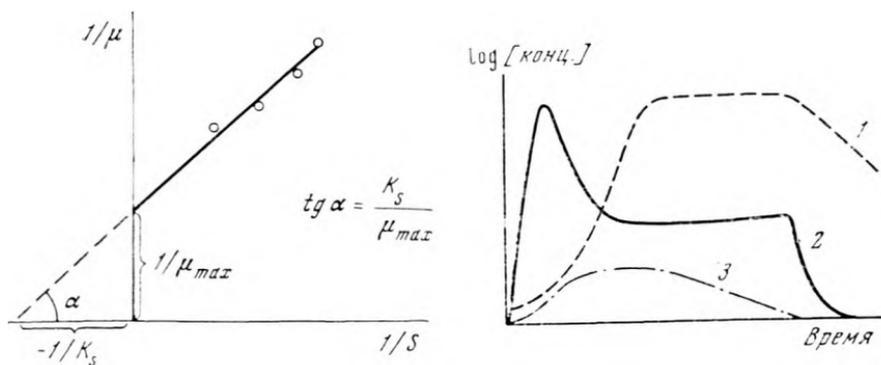


Рис. 3. Определение констант скорости роста микроорганизмов методом обратных величин

Рис. 4. Математическая структурированная модель роста бактерий (Ramkrishnan et al., 1967)

1 — $G + D + P$; 2 — $G/(G + D + P)$; 3 — $P/(G + D + P)$; G — часть биомассы, ответственная за синтез, например, нуклеиновые кислоты и соответствующие ферменты; D — остальная биомасса, например, структурные компоненты; P — запасные вещества

ми (Веденина, 1968). Существенно при этом отметить, что водородные бактерии расходуют не субстрат — концентрация водорода и кислорода в газовой фазе поддерживается постоянной — а постепенно заполняют объем пространства, из которого к ним диффундируют газы.

Таким образом, физиологические опыты показывают, что состав клеток микроорганизмов и степень сопряжения энергетических и биосинтетических реакций могут сильно варьировать. Различные ферментные системы оказываются в значительной степени автономными, и в зависимости от состава среды хемоавтотрофы осуществляют разные процессы:

Компоненты среды					Характеристика процесса
O ₂	H ₂	CO ₂	PO ₄ ⁻³	NH ₄ ⁺	
+	-	-	-	-	Эндогенное дыхание
+	+	-	-	-	«Холостое» окисление
+	+	+	-	-	Синтез углеродсодержащих запасных веществ
+	+	+	+	-	Синтез углеродсодержащих запасных веществ и полифосфатов
+	+	+	+	+	Экспоненциальный рост

У большинства микроорганизмов не наблюдается системы дыхательного контроля, обеспечивающей прекращение потребления субстрата в отсутствие использования АТФ (Гельман и др., 1966). В отмытых суспензиях нитрифицирующих и тионовых бактерий отсутствие углекислоты не влияет на скорость потребления кислорода. При этом происходит так называемое «холостое» окисление. Следует отметить, что приготовление отмытой суспензии может существенно повлиять на обмен организма. Так, у *Nitrosomonas* (Ермаченко, 1967) центрифугирование снижает скорость окисления субстрата в 3—4 раза, а промывание — еще в 2 раза по сравнению с величинами, наблюдаемыми в растущей культуре.

Хорошо выраженная система дыхательного контроля была обнаружена у водородных бактерий Шлегелем. Водородные бактерии окисляют водород в присутствии углекислоты в 4 раза быстрее, чем без нее (Schlegel, Bartha, 1961; Bartha, 1962). Разобчители типа динитрофенола не ускоряют использования водорода, хотя у этих же организмов стимулируют окисление внутриклеточных запасов полимера оксимасляной кислоты. Значительное увеличение скорости окисления достигается лишь при применении шуптирующих искусственных переносчиков водорода, таких как метиленовая синяя. Вместе с тем в присутствии углекислоты метиленовая синяя не увеличивает скорости потребления водорода. Шлегель (Schlegel, 1966) полагал, что окисление водорода жестко сопряжено с образованием АТФ. «Холостое» окисление, возможно, обусловлено компонентами, не сопряженными с фосфорилированием. Клетки *Hyd-*

rogenomonas H-16 содержали 0,7 мг АТФ/г биомассы в условиях «холодного» окисления. Эта величина снижалась на 30% в присутствии углекислоты.

Поскольку для экспоненциального роста требуется наиболее полное сочетание факторов, то естественно, что при разного рода нарушениях обмена, вызванных как неполноценностью, так и воздействием экстремальных факторов, в первую очередь выключается синтез белков и нуклеиновых кислот, что влечет за собой несбалансированный рост.

В условиях сбалансированного роста бактерий регуляция ферментативных процессов осуществляется с помощью двух основных контрольных механизмов. Биосинтетические (анаболические) пути находятся под контролем конечного продукта последовательности реакций, а на катаболические (энергетические) пути влияние оказывает энергетический заряд клетки. Для организмов с органогетеротрофным типом питания, к которому относится громадное большинство бактерий, характерно объединение конструктивных и энергетических путей в реакциях амфиболизма. Это понятие, введенное Девисом (Davies, 1961), оказалось очень полезным. К амфиболизму относят гликолиз, гексозомонофосфатный путь, глюконогенез и цикл трикарбоновых кислот. Амфиболизм приводит к образованию углеродных скелетов таких соединений, как щавелевоуксусная, фосфоенолпировиноградная кислоты, которые служат предшественниками мономеров в клетке. В реакциях амфиболизма образуются также вещества, окисляемые для получения энергии. Такая двойная роль реакций амфиболизма привела к тому, что бактерии выработали тонкие механизмы контроля и координации этих реакций, причем у прокариот конкретные механизмы очень разнообразны.

Генетический контроль путем репрессии и дерепрессии синтеза ферментов у литоавтотрофов изучен очень слабо, хотя известно, что такие изменения происходят как во время роста культуры, когда изменяется активность системы автотрофной ассимиляции углекислоты, так и при переходе миксотрофных организмов с одного субстрата на другой. Однако эти данные имеют чисто описательный характер. Аллостерический контроль над амфиболическими реакциями осуществляется, во-первых, с помощью торможения конечным продуктом метаболического пути ферментов, находящихся в начале этого пути; во-вторых, с помощью веществ, служащих индикатором энергетического состояния клетки, таких как НАД и АТФ. Первый тип регуляции свойствен биосинтетическим реакциям, второй — энергетическим (Sanwal, 1970). Основные данные по механизмам контроля были получены на *E. coli*, в то время как большинство других организмов осталось еще не изученными, и относительно их имеются лишь разрозненные данные.

Амфиболические реакции у автотрофов служат в основном для нужд конструктивного обмена и, если быть точным, автотрофы

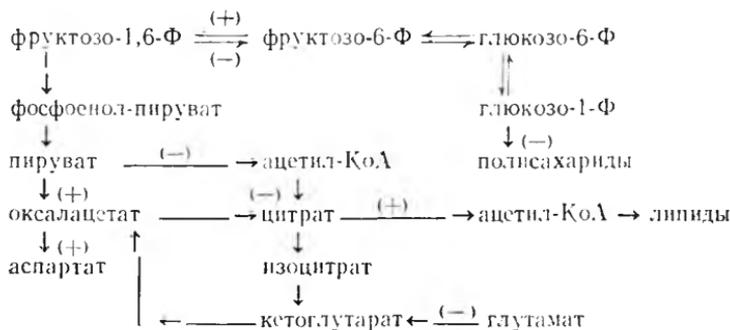
отличаются от большинства гетеротрофов (исключение составляют, может быть, метилотрофы и некоторые анаэробы) именно тем, что амфиболизм в строгом смысле слова у них отсутствует. Тем не менее многие механизмы контроля реакции одинаковы.

Общими компонентами конструктивных и энергетических реакций у литоавтотрофов являются НАД и АТФ. Содержание их в клетке литотрофных бактерий значительно изменяется в зависимости от условий. Так, у водородных бактерий, содержащих 1,2 $\mu\text{моль}$ НАД+НАДН на 1 г биомассы, соотношение НАДН/НАД меняется от 0,78 в атмосфере чистого водорода до 0,32 в смеси водорода, кислорода и углекислоты (Algen, 1966). Как установлено на энтеробактериях, НАДН ингибирует у этих организмов фосфоенолкарбоксихиназу, цитратсинтазу, малатдегидрогеназу и «малик-энзим». У водородных бактерий высокая концентрация НАДН подавляет фруктозо-6-фосфатдегидрогеназу и активирует рибулозо-5-фосфаткиназу, направляя обмен организма в русло биосинтетических реакций.

Более подробно выяснен у литоавтотрофов механизм аденилатного контроля. Для описания энергетического состояния клетки Аткинсон (Atkinson, 1969) предложил понятие энергетического заряда

$$\frac{\text{АТФ} + 1/2 \text{АДФ}}{\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}},$$

представляющего внутриклеточные концентрации компонентов аденилатной системы. Высокий энергетический заряд клетки подавляет реакции вовлечения метаболитов в катаболические пути и стимулирует анаболические, как показано на схеме соответственно знаками (—) и (+):



У литоавтотрофных бактерий под контролем аденилатной системы находится процесс автотрофной ассимиляции углекислоты. Низкий энергетический заряд клетки подавляет активность фосфорилбулоккиназы. АМФ действует на фосфорилбулоккиназу, являясь ее аллостерическим негативным эффектором, но не действует на карбоксилазу рибулозодифосфата у тионовых бактерий (Johnson, Peck,

1965; Johnson, 1966; Gale, Beck, 1966; Mayeux, Johnson, 1967). В бесклеточных препаратах водородных бактерий обычно подавлена реакция ассимиляции углекислоты в присутствии НАДН и АТФ, но идет реакция ассимиляции с рибулозодифосфатом.

Мы можем представить следующую схему обмена гипотетического хемоавтотрофа (схема 8).

В энергетическом обмене этого организма происходит окисление гидратированного субстрата А, причем кислород воды (или фосфата) появляется в окисленном продукте. Электрон (водород) субстрата восстанавливает переносчики цепи переноса электрона, например цитохром с. Окисление цитохрома цитохромоксидазой сопровождается окислительным фосфорилированием с образованием АТФ. Окисление цитохромоксидазы осуществляется в системе синтеза воды за счет молекулярного кислорода. Окисленная цитохромоксидаза вновь вступает в цикл переноса электрона. Система переноса электрона находится в частичках цитоплазматической мембраны. Восстановление переносчиков, лежащих слева от места вступления электрона субстрата в цепь, происходит в системе обратного переноса электрона, в которой идет реакция, обратная фосфорилированию, и расходуется АТФ, образованный при синтезе воды. Конечным продуктом обратного переноса электрона

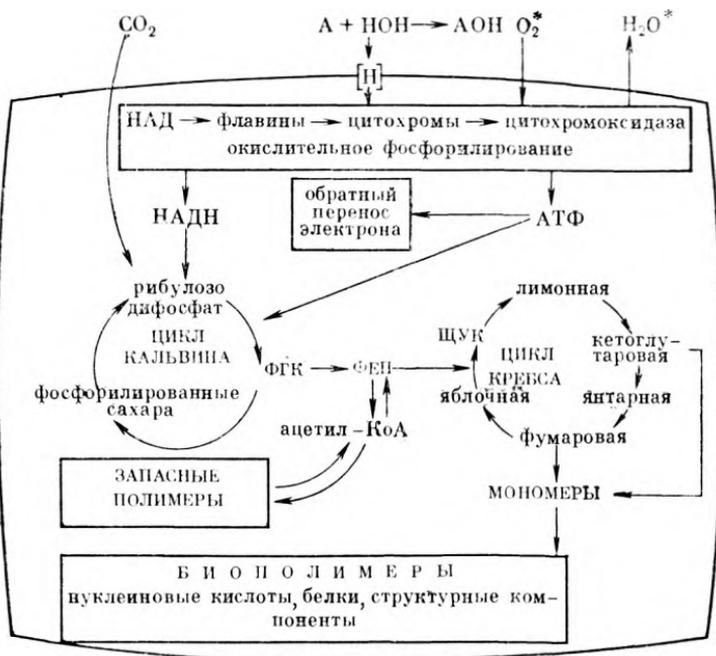
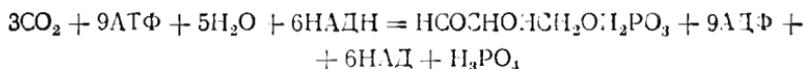


Схема 8. Обмен хемоавтотрофа

является НАДН, который может быть перенесен к местам использования в конструктивных реакциях. Окисление субстрата контролируется не только доступностью акцептора и донора электрона, но и находится под дыхательным контролем: ограничение доступности АДФ и неорганического фосфата подавляет скорость энергетического обмена. Таким образом, на входе системы энергетического обмена хемолитотрофа имеются окисляемый субстрат, окислитель (кислород), неорганический фосфат, на выходе — поступающие в среду окисленный продукт и восстановленный в воду кислород, НАДН и АТФ, поступающие в конструктивный обмен.

В конструктивном обмене происходит ассимиляция углекислоты в цикле Кальвина, основным продуктом которого является фосфоглицериновая кислота (ФГК). Из нее образуется фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП), которая может карбоксилироваться и поступает в обмен мелких молекул. Функционирование цикла Кальвина требует затраты энергии и восстановителя и идет по уравнению



Это уравнение определяет соотношение между конструктивным и энергетическим обменом у хемоавтотрофов. На входе конструктивного обмена хемоавтотрофов имеются углекислота, НАДН и АТФ. Регуляторную функцию осуществляет соотношение АТФ/АДФ. Вне зависимости от абсолютной концентрации АТФ ассимиляция углекислоты подавляется, если отношение становится меньше единицы.

Обмен мелких молекул автотрофов построен на основе реакций, известных для гетеротрофов, но так как в обычном цикле Кребса происходит декарбоксилирование и окисление, которые привели бы к дисбалансу между конструктивным и энергетическим обменом, имеет место ряд изменений. Метаболиты цикла Кребса быстро отвлекаются на синтез аминокислот, в первую очередь аспарагиновой и глутаминовой, что должно задерживать нормальное функционирование цикла. Декарбоксилирование α -кетоглутаровой кислоты подавлено. Подавлена активность сукцинатоксидазы (*Nitrobacter*). Иногда отсутствует окисление компонентов цикла через систему НАДН-оксидазы. Все эти особенности приводят к тому, что в цикле появляются открытые цепи реакций, ведущие к мономерам. Литогетеротрофные микроорганизмы способны нормально использовать мономеры, находящиеся в среде, литоавтотрофы не обладают эффективной регуляцией обмена, и избыток того или иного мономера в среде ведет к его несбалансированному включению. Относительно особенностей системы синтеза биополимеров — нуклеиновых кислот, ферментных белков, структурных компонентов — сведений нет. У факультативных автотрофов синтез

адаптивных ферментов литотрофного обмена, цикла Кальвина и цикла Кребса находится под генетическим контролем.

Синтез запасного углеродсодержащего вещества — поли-β-оксимасляной кислоты — и ее использование происходят в общем так же, как у гетеротрофов.

ЛИТЕРАТУРА

- Веденина И. Я. 1968. Автотрофная ассимиляция углекислоты водородными бактериями *Hydrogenomonas eutropha* Z-1. М., Канд. дисс.
- Виноградский С. Н. 1952. Микробиология почвы. М., Изд-во АН СССР.
- Гаррелс Р. М., Крайст Ч. Л. 1968. Растворы, минералы, равновесия. М., «Мир».
- Гельмин Н. С., Лукоянова М. А., Островский Д. Н. 1966. Дыхательный аппарат бактерий. М., «Наука».
- Доман Н. Г., Тихонова Н. Г. 1965. Некоторые проблемы энергетики микроорганизмов — литотрофов. — Успехи совр. биол., **60**, 238.
- Гермаченко В. А. 1967. Рост и развитие *Nitrosomonas europaea*. М. Канд. дисс.
- Заварзин Г. А. 1964. Хемосинтез и аноргоксидация. — Успехи микробиол., **1**, 30.
- Кузнецов С. И. 1948. Проблемы автотрофии у микроорганизмов. — Микробиол., **17**, 307.
- Лебедев А. Ф. 1910. Исследование хемосинтеза у *Bacillus hydrogenes*. Одесса. Ленинджер А. 1966. Митохондрия. М., «Мир».
- Лисенкова Л. Л. 1967. Сравнительное количественное изучение цитохромов хемосинтезирующих и гетеротрофных микроорганизмов. М. Канд. дисс.
- Ляликowa Н. Н. 1958. Изучение процесса хемосинтеза у *Thiobacillus ferrooxidans*. — Микробиол., **27**, 556.
- Моудер Д. 1965. Биохимия внутриклеточного паразитизма. М., «Мир».
- Нидсон Г. А. 1903. Микроорганизмы как геологические деятели. СПб.
- Омелянский В. Л. 1925. Пути развития микробиологии в России. — В кн.: Избр. труды, **2**, 38, 1953. М., Изд-во АН СССР.
- Романова А. К. 1968. Биологическое карбоксилирование при фото- и хемосинтезе. — Успехи биол. химии, **9**, 265.
- Рубан Е. Л. 1961. Физиология и биохимия нитрифицирующих микроорганизмов. М., Изд-во АН СССР.
- Рубан Е. Л., Заварзин Г. А. 1955. Остаточная нитрификация у *Nitrosomonas*. — Докл. АН СССР, **104**, 144.
- Скулачев В. П. 1969. Аккумуляция энергии в клетках. М., «Наука».
- Спирин А. С., Гаврилова Т. П. 1968. Рибосома. М., «Наука».
- Умбрейт В. 1954. Значение автотрофности для сравнительной физиологии. — В кн.: Физиология бактерий. Веркман Ч. и Вильсон П. (ред.), стр. 445. М., ИЛ.
- Ahrens J. 1966. Über die Komponenten des Elektronentransport-Systeme bei *Hydrogenomonas* H-16. Diss. Göttingen.
- Aleem M. I. H. 1966a. Generation of reducing power in chemo-synthesis. II. Energy linked reduction of pyridine nucleotides in the chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*. — Biochim. et biophys. acta, **113**, 216.
- Aleem M. I. H. 1966b. Generation of reducing power in chemosynthesis. III. Energy linked reduction of pyridine nucleotides in *Thiobacillus novellus*. — J. Bacteriol., **91**, 729.
- Aleem M. I. H. 1966c. Biochemistry of bacterial chemosynthesis. — IX Internat. Congr. Microbiol., Moscow, p. 160.
- Atkinson D. E. 1969. Regulation of enzyme function. — Annual Rev. Microbiol., **23**, 47.
- Aubert J., Milhaud G., Millet J. 1956. Metabolism du carbone dans la chimioautotrophie. I. Mode d'incorporation de l'anhydride carbonique. — C. R. Acad. sci., **242**, 2059.

- Aubert J., Milhaud G., Millet J. 1957a. La métabolisme du carbon dans la chimioautotrophe. II. Fixation de l'anhydride carbonique sur l'acide phosphoenolpyruvique. — C. R. Acad. sci., **244**, 398.
- Aubert J., Milhaud G., Millet J. 1957b. L'assimilation de l'anhydride carbonique par les bactéries chimioautotrophes. — Ann. Inst. Pasteur, **92**, 115.
- Aubert J., Milhaud G., Millet J. 1957c. L'assimilation de l'anhydride carbonique par les bactéries chimioautotrophes. Ann. Inst. Pasteur, **92**, 679.
- Baalsrud K., Baalsrud K. S. 1952. The role of phosphate in CO₂ assimilation of thiobacilli. — In: Phosphorus metabolism, v. 2. McElroy and Glass (Eds), p. 544.
- Baas Becking L. G. M., Parks G. S. 1927. Energy relation in the metabolism of autotrophic bacterien. — Physiol. Rev., **7**, 85.
- Buhr H., Schwartz W. 1957. Vergleichende Untersuchungen an farblosen fädigen Schwefelmikroben und anderen hormogonalen Cyanophyceen. — Biol. Zbl., **76**, 185.
- Barker H. A., Kornberg A. 1954. The structure of the adenosine triphosphate of *Thiobacillus thiooxidans*. — J. Bacteriol., **68**, 655.
- Bartha R. 1962. Physiologische Untersuchungen über den chemo-lithotropen Stoffwechsel neu isolierter *Hydrogenomonas* Stämme. — Arch. Mikrobiol., **41**, 313.
- Bömeke H. 1939. Beiträge zur Physiologie nitrifizierende Bakterien. — Arch. Mikrobiol., **10**, 385.
- Butt W. D., Lees H. 1960. The biochemistry of nitrifying organisms. 7. The phosphate compounds of *Nitrobacter* and the uptake of orthophosphate by the organism. — Canad. J. Biochem. and Physiol., **38**, 1295.
- Calvin M., Bassham J. A. 1962. The photosynthesis of carbon compounds. N. Y., Acad. Press.
- Davies B. D. 1961. The teleonomic significance of biosynthetic control mechanisms. — Cold Spring Harbour Sympos. Quant. Biol., **26**, 1.
- Delajfield F. P., Doudoroff M., Palleroni N. J., Lusty C. J., Contopoulou R. 1965. Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by pseudomonads. — J. Bacteriol., **90**, 1455.
- Devide Z. 1954. Investigations on the cell of colourless sulphur bacteria. — Arch. pharmac. Jugosl., **4**, 147.
- Doudoroff M., Stanier R. Y. 1952. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. — Nature, **183**, 1440.
- Engel H. 1959. Die chemoautotrophen Bakterien im Licht der modernen Forschung. — Zbl. Bakteriol. II. Abt. **113**, 1.
- Evans M. C. W., Buchanan B. B., Arnon D. I. 1966. A new ferredoxin dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **55**, 928.
- Eyring H., Boyce R., Spikes J. 1960. Thermodynamics of living systems. — In: Comparative biochemistry, v. 1. M. Florkin and H. Mason (Eds), p. 15.
- Fry B. A., Peel J. L. (Eds). 1954. Autotrophic microorganisms. — 4-th Sympos. Soc. Gen. Microbiol. London.
- Gale N. J., Beck J. V. 1966. Competitive inhibition of phosphoribulokinase by AMP. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., **24**, 792.
- Gale N. J., Beck J. V. 1967. Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. — J. Bacteriol., **94**, 1052.
- Gottschalk G. 1964. Die Biosynthese der Poly- β -Hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. — Arch. Mikrobiol., **47**, 225.
- Gottschalk G. 1965. Die Verwertung organischer Substrate durch *Hydrogenomonas* in Gegenwart von molekularem Wasserstoff. — Biochem. Z., **341**, 260.
- Gundersen K. 1968. The formation and utilization of reducing power in aerobic chemoautotrophic bacteria. — Z. allg. Mikrobiol., **8**, 445.
- Hall D. O., Evans M. C. W. 1969. Iron-sulphur proteins. — Nature, **223**, 1342.

- Hempfling W. P., Vishniac W. 1967. Yield coefficients of *Thiobacillus neapolitanus* in continuous culture. — J. Bacteriol., **93**, 874.
- Hippe H. 1967. Abbau und Wiederverwertung von Poly- β -Hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* II-16. — Arch. Mikrobiol., **56**, 248.
- Hirsch P., Georgiev G., Schlegel H. G. 1963. CO₂-Fixierung durch Knallgasbakterien. III. Autotrophe und organotrophe CO₂ Fixierung. — Arch. Mikrobiol., **46**, 79.
- Hofman T., Lees H. 1952. The biochemistry of nitrifying organisms. 2. The free energy efficiency of *Nitrosomonas*. — Biochem. J., **52**, 140.
- Johnson E. J. 1966. Occurrence of adenosine monophosphate inhibition of carbone dioxide fixation in extracts of *Thiobacillus thioparus*. — Arch. Biochem. and Biophys., **114**, 178.
- Johnson E. J., Peck H. D. 1965. Coupling of phosphorylation and carbone dioxide fixation in extracts of *Thiobacillus thioparus*. — J. Bacteriol., **89**, 1041.
- Kaltwasser H. 1962. Die Rolle der Polyphosphate in Phosphatstoffwechsel eines Knallgasbakteriums (*Hydrogenomonas* Stamm II-20). — Arch. Mikrobiol., **41**, 282.
- Kaltwasser H., Schlegel H. G. 1959. Nachweis und quantitative Bestimmung der Polyphosphate in wasserstoffoxydierenden Bakterien. — Arch. Mikrobiol., **34**, 76.
- Kaltwasser H., Vogt G., Schlegel H. G. 1962. Polyphosphat-synthese während der Nitrat-Atmung von *Micrococcus denitrificans* Stamm II. — Arch. Mikrobiol., **44**, 259.
- Kanai R., Miyachi S., Takamiya A. 1961. Fixation of carbone dioxide in *Hydrogenomonas facilis* as induced by preliminary oxyhydrogen reaction. — Arch. Mikrobiol., **40**, 196.
- Kelly D. P. 1967a. Influence of amino acids and organic antimetabolites on growth and biosynthesis of the chemoautotroph *Thiobacillus neapolitanus* strains C — Arch. Mikrobiol., **56**, 91.
- Kelly D. P. 1967b. The incorporation of acetate by the chemoautotroph *Thiobacillus neapolitanus* strain C. — Arch. Mikrobiol., **58**, 99.
- Kelly D. P. 1967c. Problems of autotrophic microorganisms. — Sci. Progr., **55**, 31.
- Kelly D. P. 1968. Fluoroacetate toxicity in *Thiobacillus neapolitanus* and its relevance to the problem of obligate chemoautotrophy. — Arch. Mikrobiol., **61**, 59.
- Kelly D. P. 1969a. Regulation of chemoautotrophic metabolism. I. Toxicity of phenylalanine to thiobacilli. — Arch. Mikrobiol., **69**, 330.
- Kelly D. P. 1969b. Regulation of chemoautotrophic metabolism. II. Competition between amino acids for incorporation into *Thiobacillus*. — Arch. Mikrobiol., **69**, 343.
- Kelly D. P. 1969c. Regulation of chemoautotrophic metabolism. III. DAHP synthetase in *Thiobacillus neapolitanus*. — Arch. Mikrobiol., **69**, 360.
- Lardy H. A., Ferguson S. M. 1969. Oxidative phosphorylation in mitochondria. — Annual Rev. Biochem., **38**, 991.
- La Riviere J. W. M. 1963. Cultivation and properties of *Thiovulum majus* Hintze. — In: Sympos. Marine Microbiol. C. Oppenheimer (Ed.). Illinois, C. Thomas Publ., p. 61.
- Lees H. 1955. Biochemistry of autotrophic bacteria. London, Butterworth.
- Lees H. 1960. Energy metabolism in chemolithotrophic bacteria. — Annual Rev. Microbiol., **14**, 83.
- Mayeux J. V., Johnson E. J. 1967. Effect of adenosine monophosphate, adenosine diphosphate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide on adenosine triphosphate dependent carbone dioxide fixation in the autotroph *Thiobacillus neapolitanus*. — J. Bacteriol., **94**, 409.
- Merrick J. M., Doudoroff M. 1961. Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in bacteria. — Nature, **189**, 890.
- Meyerhof O. 1916. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. I. Die Atmung des Nitratbildners. — Pflügers Arch. ges. Physiol., **164**, 353.

- Meyerhof O. 1917a. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. II. Beeinflussungen der Atmung des Nitratbildners durch chemische Substanzen. — Pflügers Arch. ges. Physiol., **165**, 229.
- Meyerhof O. 1917b. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. III. Die Atmung des Nitritbildners und ihre Beeinflussung durch chemische Substanzen. — Pflügers Arch. ges. Physiol., **166**, 240.
- Monod J. 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, Hermann et Cie.
- Monod J. 1950. La technique de culture continue: théorie et applications. — Ann. Inst. Pasteur, **79**, 390.
- Newburgh R. W. 1954. Phosphorylation and chemosynthesis by *Thiobacillus thiooxidans*. — J. Bacteriol., **68**, 93.
- Parder A. 1954. Free energy and metabolism. — In: Chemical pathways of metabolism, v. 1, 1.
- Payne W. J. 1970. Energy yields and growth of heterotrophs. — Annual Rev. Microbiol., **24**, 17.
- Peck H. D. 1968. Energy coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria. — Annual Rev. Microbiol., **22**, 489.
- Pourbaix M. 1963. Atlas d'équilibres électrochimiques à 25° C. — Paris, Gauthier-Vilars.
- Quayle J. K. 1961. Metabolism of C₁ compounds in autotrophic and heterotrophic microorganisms. — Annual Rev. Microbiol., **15**, 119.
- Ramkrishnan D., Fredrickson A. G., Tsuchiya H. M. 1967. Dynamics of microbial propagation: Models considering inhibitors and variable cell composition. — Biotechnol. and bioengng., **9**, 129.
- Remer E. 1957. Das Problem der Nitritoxydation mit nachträglicher CO₂ Assimilation bei *Nitrobacter winogradskiy*. — Arch. Mikrobiol., **27**, 125.
- Rittenberg S. C. 1969. The role of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. — In: Advances of Microbial Physiol., **3**, 159.
- Sanwal B. C. 1970. Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria. — Bacteriol. Revs., **34**, 20.
- Schlegel H. G. 1966. Physiology and biochemistry of Knallgas-bacteria. — Advances Compar. Physiol. and Biochem., 185.
- Schlegel H. G., Bartha R. 1961. Hemmungsanalytische Versuche zum Rückkopplungseffekt bei *Hydrogenomonas*. — Z. Naturforsch., **16b**, 777.
- Schlegel H. G., Gottschalk G. 1962. Poly- β -hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion and Biosynthese. — Angew. Chem., **74**, 342.
- Schlegel H. G., Gottschalk G. 1965. Verwertung von Glukose durch eine Mutante von *Hydrogenomonas H-16*. — Biochem. Z., **341**, 249.
- Schlegel H. G., Kaltwasser H. 1961. Veränderungen des Polyphosphatgehaltes während des Wachstums von Knallgasbakterien unter Phosphatmangel. — Flora (Jena), **1510**, 259.
- Senez J. C., Nason A., Mortenson L. E., Ormerod J. C., Gest H., Peck H. D. 1962. Symposium on metabolism of inorganic compounds. — Bacteriol. Revs., **26**, 14.
- Smith A. J., London J., Stanier R. Y. 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue green algae and thiobacilli. — J. Bacteriol., **94**, 972.
- Starkey R. L., Umbreit W. W., Clayton R. K., Lees H., Vishniac W., Trudinger P. A. 1962. Symposium on autotrophy. — Bacteriol. Revs., **26**, 142.
- Stouthamer A. H. 1969. Determination and significance of molar growth yields. — In: Methods in microbiology, v. 1. J. R. Norris a. D. W. Ribbons (Eds). N. Y., Acad. Press, p. 629.
- Trudinger P. 1955. Phosphoglycerate formation from pentose phosphate by extracts of *Thiobacillus denitrificans*. — Biochim. et biophys. acta, **13**, 581.
- Trudinger P. 1956. Fixation of carbone dioxide by the strict autotroph *Thiobacillus denitrificans*. — Biochem. J., **64**, 274.
- Trudinger P. A., Kelly D. P. 1968. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide

- oxidation by *Thiobacillus neapolitanus* and *Thiobacillus* strain C. — J. Bacteriol., **95**, 1962.
- Umbreit W. 1954. Phosphorylation and CO₂ fixation in the autotrophic bacterium *Thiobacillus thiooxidans*. — J. Bacteriol., **67**, 387.
- Van Niel C. B. 1943. Biochemical problems of the chemoautotrophic bacteria. — Physiol. Rev., **23**.
- Van Niel C. B. 1954. The chemoautotrophic and photosynthetic bacteria. — Annual Rev. Microbiol., **8**, 105.
- Vogler K. G., Umbreit W. W. 1942. Studies on the metabolism of autotrophic bacteria. III. The nature of the energy storage material active in the chemosynthetic process. — J. gen. Physiol., **26**, 157.
- Wilkinson J. J. 1963. Carbon and energy storage in bacteria. — J. gen. Microbiol., **32**, 171.
- Wislouch S. M. 1912. *Thioploca ingrika* nov sp. — Ber. Dtsch. bot. Ges., **30**, 470.

ВОДОРОДНЫЕ БАКТЕРИИ

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ

Окисление молекулярного водорода кислородом воздуха было обнаружено Соссюром в 1838 г. Соссюр отмечал, что водород образуется при разложении органических веществ, но в атмосфере не накапливается. Следовательно, существует процесс, в котором молекулярный водород используется. В опытах с почвой Соссюр показал, что водород и кислород исчезают из газовой смеси в отношении 2 : 1, т. е. водород окисляется до воды. Иммендорф в 1892 г. (Immendorf, 1892) установил, что процесс окисления имеет биологическую природу: хлороформ уничтожал способность почвы окислять водород.

Агент, вызывающий окисление водорода, был обнаружен элективным методом Виноградского почти одновременно Казерером (Kaserer, 1906) и Лебедевым (Nabokich, Lebedeff, 1906; Lebedeff, 1907). Этим агентом оказались бактерии, мелкие подвижные палочки, способные расти в атмосфере гремучего газа за счет ассимиляции углекислоты в процессе хемосинтеза или гетеротрофно на органических средах. Организмы получили название собственно водородных, или Knallgasbakterien (бактерии гремучего газа).

Почти в то же время Никитинский (Nikitinski, 1907) нашел, что сточная жидкость потребляет водород в анаэробных условиях, и, следовательно, окислителем водорода может быть иное вещество, чем кислород. Микроорганизмы, окисляющие водород анаэробно, составляют специальную группу и будут рассмотрены отдельно (глава 3).

Первые исследователи водородных бактерий собрали весьма ценные данные относительно многообразия форм этих организмов, их способности и к автотрофному и гетеротрофному росту, изучили газообмен. Опубликованная в 1910 г. в Одессе книга Лебедева «Исследование хемосинтеза у *Bacillus hydrogenes*» содержит, в частности, обсуждение таких вопросов, как непостоянство константы урожая у автогровов, независимость процессов окисления водорода и ассимиляции углекислоты («холостое» окисление), одновременное окисление водорода и органического вещества. Модифицированная среда Казерера до сих пор применяется для выделения водородных бактерий.

После этих первых работ, выяснивших в общих чертах физиологию водородных бактерий, наступил длительный перерыв. Культивирование в чашках под колпаками с гремучей смесью делало водородные бактерии нежелательными обитателями микробиологических лабораторий. Немногочисленные работы этого времени посвящались главным образом изучению перехода этих организмов от автотрофного к гетеротрофному существованию и обратно (Grohman, 1924; Ruhland 1924; Lee, Umbreit, 1940; Kluuyver, Manten, 1942; Lascells, Still, 1946).

В начале 50-х годов общий интерес к изучению хемоавтотрофных организмов заставил обратить внимание и на водородные бактерии. На них были подтверждены основные закономерности, установленные для других хемоавтотрофов (Беляева, 1950; Schatz, 1952; Schlegel, 1953; Atkinson, 1955). Исследования этого периода привели к выделению нескольких штаммов водородных бактерий, которые росли в лаборатории значительно лучше других хемоавтотрофов (Schatz, Bovell, 1952; Packer, Vishniac, 1955).

Следующий этап был обусловлен разработкой методов культивирования водородных бактерий, которые позволяли получать урожай этих организмов с такой же легкостью, как гетеротрофов.

Водородные бактерии оказались наиболее удобной моделью для изучения не только хемоавтотрофии, но и ряда общих закономерностей биохимии микроорганизмов. Академический интерес к ним проявился в появлении большой серии диссертаций, рассматривающих различные стороны обмена этих организмов. В ряде стран опубликованы исчерпывающие обзоры (Repaske, 1966; Schlegel, 1966; Имшенецкий, 1967; Савельева, Заварзин, Веденниа, 1971).

Практический интерес к водородным бактериям возник в связи с возможностью использовать их в космических кораблях и других объектах, требующих создания замкнутой экологической системы. Идея заключалась в том, чтобы сочетать физико-химическую и биологическую регенерацию атмосферы. Водород, выделяемый при электролизе воды, потребляется водородными бактериями, а избыточный кислород и биомасса бактерий могут использоваться космонавтом (Ворошии, Поллюда, 1967; Chapman et al., 1963; Schlegel, 1964; Bongers, 1964; Schlegel, 1970; Schlegel et al., 1969).

Обнадеживающие результаты, полученные при культивировании водородных бактерий, побудили рассматривать их как потенциальный источник белка из одноклеточных организмов, который можно использовать в кормовых и, может быть, даже в пищевых целях. Наиболее вероятным источником водорода и кислорода в таком производстве может служить электролиз. Сравнительно с другими хемоавтотрофными организмами водородные бактерии растут необычайно быстро и накапливают большую биомассу. С физиологической точки зрения водородные бактерии — микроорганизмы с газовым питанием — обладают характерными особенностями роста.

К водородным бактериям относятся организмы, способные расти за счет энергии реакции окисления молекулярного водорода кислородом и отличающиеся от всех других организмов, способных окислять водород или улучшать свой рост в присутствии водорода, тем, что для них реакция окисления водорода может служить единственным источником энергии. Морфологически гидрогеномонады относятся к неспоросным подвижным палочкам. Все до сих пор известные представители этой группы способны не только к литотрофному росту за счет окисления водорода, но и к органотрофному росту, легко переходя от одного типа питания к другому.

Среди организмов, окисляющих водород, наиболее подробно изучены *Hydrogenomonas tropha*, *H. facilis*, *Micrococcus denitrificans*. Последний способен также к денитрификации и будет рассмотрен самостоятельно.

ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СИСТЕМАТИКА ВОДОРОДНЫХ БАКТЕРИЙ

Водородные бактерии легко выделяются из самых различных природных источников. Наиболее благоприятным материалом для выделения являются образцы почвы, ила, сточных вод там, где происходит разложение органических веществ с образованием водорода. Накопительную культуру получают на жидкой минеральной среде. При культивировании в статических условиях преимущество получают организмы, образующие пленку. Они перехватывают поступающие из атмосферы газы, и жидкость под пленкой остается прозрачной. При культивировании с перемешиванием такие культуры дают хлопья и обычно низкий урожай. Часто пленка содержит много липидных включений. Организмы с диффузным ростом получают преимущество, если с самого начала культивирование вести с перемешиванием.

Выделение чистой культуры проводят обычно в чашках с агаризованной минеральной средой, помещенных в эксикатор с газовой смесью. Как уже отмечалось, в этих условиях растут многие организмы, неспособные при дальнейших пересевах расти на чисто минеральных средах. Особенно часто среди них встречаются миксобактерии. Поэтому отдельную колонию водородных бактерий пересевают на жидкую минеральную среду в атмосфере гремучей смеси, а затем снова на плотные среды, добиваясь однородности колоний.

Критерием чистоты культуры служат однородная морфология колоний на различных питательных средах и однородная микроскопическая картина. Некоторые наиболее активные при автотрофном росте штаммы не используют сахара. Эти же штаммы хорошо растут на среде с форминатом как единственным источником углерода и энергии. Культуры водородных бактерий во влажных эксикаторах легко загрязняются, особенно миксобакте-

риями, поэтому за чистотой культуры необходимо тщательно следить.

Рост водородных бактерий в автотрофных условиях можно рассматривать как наиболее типичный пример роста организмов с газовым питанием, которые получают основные вещества из растворенных в воде газов. В отличие от таких организмов, как метанооксиляющие, водородные бактерии не образуют углекислоты, основной продукт их обмена — вода, токсических веществ водородные бактерии не выделяют. При выращивании организмов с газовым питанием растворение газов в воде представляет лимитирующий процесс. Считают, что густые суспензии поглощают газ быстрее, чем он успевает раствориться, и в результате возникает неравновесное состояние. Поступая с постоянной скоростью, обусловленной конструкцией культиватора и перемешиванием, водород и кислород будут обуславливать линейный характер роста культур водородных бактерий. После фазы задержки роста наступает короткая фаза экспоненциального роста, которая переходит в фазу линейного роста. Совершенно аналогичная картина наблюдается и у метанооксиляющих бактерий. Линейный рост в известном смысле более характеризует конструкцию установки, чем особенности микроорганизма.

Рост водородных бактерий в условиях перемешивания в непроточной культуре неоднократно описывался в литературе (Веденина, 1968; Schlegel et al., 1961; Schlegel, 1970). Все хорошо растущие штаммы водородных бактерий при культивировании в одинаковых условиях давали сходную картину. Различия между штаммами можно было установить лишь по второстепенным признакам: максимальной биомассе, соотношению нуклеиновые кислоты : белок : оксимасляная кислота. Эти различия во многом были связаны с накоплением запасных веществ.

Культивирование водородных бактерий имеет определенное своеобразие. В противоположность привычным бактериальным культурам субстрат постоянно поступает к клеткам из газовой фазы. В начале развития водородные бактерии требуют обычно пониженного содержания кислорода в газовой смеси для того, чтобы установился оптимальный для каждого штамма окислительно-восстановительный режим. По мере роста и увеличения плотности культуры давление кислорода в газовой фазе можно увеличивать примерно до 40%. Неравномерное потребление газов приводит к тому, что, например, при недостатке углекислоты происходит подщелачивание среды до pH 8,0 за счет использования растворенной углекислоты микроорганизмами. Подщелачивание среды при поглощении углекислоты уравнивается до некоторой степени потреблением аммиака. Для достижения максимальной скорости роста приходится часто менять атмосферу над жидкой средой. Обычно применяемая газовая смесь из 10% CO₂, 10—30% O₂ и 80—60% водорода в общем сбалансирована с потреблением газов.

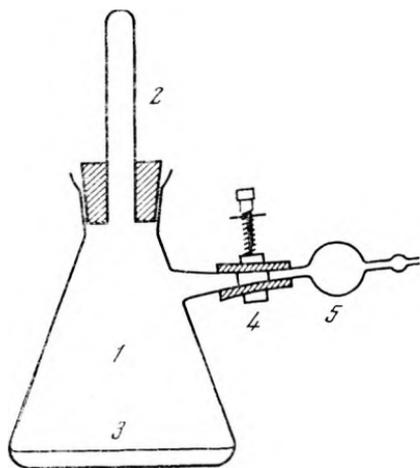


Рис. 5. Колба для культивирования микроорганизмов в определенной газовой атмосфере

- 1 — колба Бунзена, 250 мл;
- 2 — пробирка для измерения мутности, вставленная в резиновую пробку;
- 3 — 10—20 мл минеральной среды;
- 4 — винтовой зажим;
- 5 — фильтр для газов

Для сравнения различных штаммов, подбора среды и подобных задач, не требующих большой биомассы, удобнее всего пользоваться колбами Бунзена с вставленной в резиновую пробку пробиркой (рис. 5). Переверачивая колбу так, чтобы культура перелилась в пробирку, можно измерять мутность на обычных фотоколориметрах, не вскрывая колбы. В колбу объемом 300 см³ наливают менее 20 мл среды. Колба заполняется газовой смесью из газометра после откачки воздуха. Чтобы не подмокал ватный фильтр для газов, пережимают винтовым зажимом резиновую трубку между фильтром и колбой.

Для культивирования в лабораторных условиях в расчете на получение биомассы порядка 1—3 г сухого веса удобнее всего выращивание на магнитной мешалке с подсоединенным газометром (Schlegel et al., 1961). Хорошо растущие водородные бактерии дают в этих условиях урожай 3 ± 1 г/л. Обычно применяют круглую плоскодонную колбу, наполненную не выше половины минеральной средой, и магнит длиной 4—6 см с надетым на середину резиновым

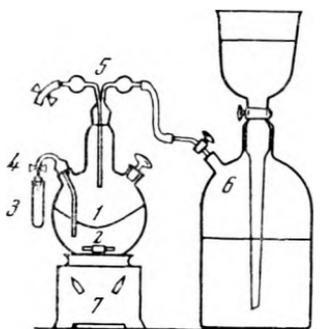


Рис. 6. Культивирование водородных бактерий на магнитной мешалке (Schlegel et al., 1961)

- 1 — колба на 2 л с 1 л минеральной среды;
- 2 — магнит диаметром 5 мм, длиной 60 мм с резиновым пояском;
- 3 — пробоотборник;
- 4 — зажимы;
- 5 — насадка с фильтрами для подачи газов и продувания;
- 6 — газометр с газовой смесью;
- 7 — магнитная мешалка ММ2

пояском, чтобы избежать истирания стекла. При перемешивании газы захватываются воронкой, доходящей до магнита, и разбираются им в виде пузырьков. Необходима регулярная смена газометров с газовой смесью (рис. 6).

Культивирование в больших масштабах требует специального оборудования и помещения.

Наибольшую плотность культуры — до 30 г/л удается достичь при продувании газами из баллонов с выбрасыванием отработанного газа в атмосферу (Schlegel, 1970). Циркуляция газов не дает возможности получить плотность выше примерно 10 г/л. Такие установки, предполагающие проточное культивирование и пополнение потребленных минеральных веществ и газов, дают в сутки 25 г сухого веса с 1 л полезного объема ферментера (Пономарев и др., 1969).

Интересной разновидностью является культивирование бактерий с внутренним электролизом (Schlegel, Lafferty, 1964). При этом водород и кислород получают электролизом минеральной среды, в которой развиваются бактерии. Преимуществом метода служит то, что водород и кислород получаются в растворенном виде, и отпадает барьер, связанный с переносом газов в жидкую фазу. Оптимальное соотношение образующихся газов достигают с помощью внешнего анода, кислород с которого уходит прямо в атмосферу. Недостатком этого метода является трудность совмещения оптимальных условий для электролиза и роста бактерий. Подобные процессы на платиновых электродах приводят к тому, что урожай остается низким, порядка 3 г/л. Для некоторых целей недостатки такого метода культивирования искупаются полной безопасностью установки.

Водородные бактерии развиваются в наиболее взрывоопасных пределах газовых смесей водорода и кислорода. Невзрывоопасными являются смеси, содержащие менее 5% одного газа в другом (рис. 7). При недостатке водорода рост бактерий чрезвычайно медленный. При недостатке кислорода некоторые штаммы растут хорошо, но скорость роста их так же недостаточна для промышленного применения.

По взрывоопасности водородные установки относятся к категории В-1 (Соловьев и др., 1966). Соблюдение соответствующих мер предосторожности необходимо и в лабораторной работе. В особенности следует помнить, что привычки микробиологов при пользовании открытым огнем для стерилизации петли, обжигания горла колбы совершенно неуместны при работе с водородными бактериями. Перед пересевом сосуды с культурой водородных бактерий следует тщательно продувать воздухом или инертным газом.

Систематика водородных бактерий находится в довольно неопределенном состоянии прежде всего потому, что неясно, можно ли рассматривать их как единую таксономическую группу. На основании физиологического свойства — способности окислять водород

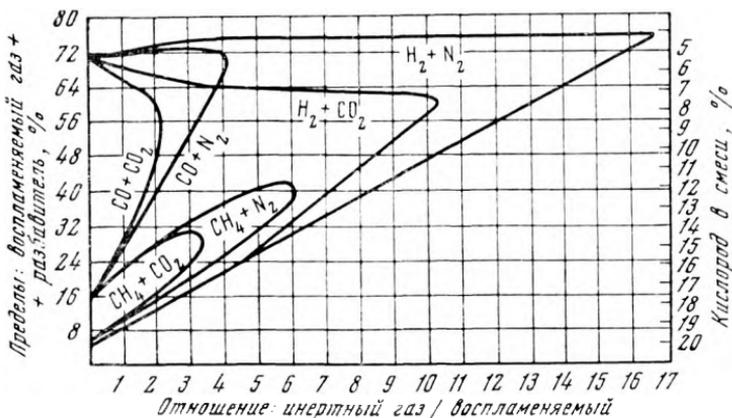


Рис. 7. Пределы воспламеняемости газовых смесей метана, водорода, угарного газа с кислородом (Lewis, von Elbe, 1951)

кислородом — все водородные бактерии были отнесены в род *Hydrogenomonas*. Эта систематика сохранилась до настоящего времени, причем те организмы, которые почему-либо не были отнесены к роду *Hydrogenomonas*, в определителе не попадали и ускользнули от внимания исследователей. Это относится к споровым палочкам *Bacillus pycnoticus* (Grohman, 1924), сравнительно медленно растущим за счет окисления водорода микобактериям и актиномицетам (Беяева, 1950, Hirsch, 1961).

Медленно растущие водородокисляющие микроорганизмы, такие как микобактерии и актиномицеты, исследовались в основном на агаризованных средах. В этом случае трудно быть уверенным, что рост идет действительно за счет водорода, так как многие организмы легко используют в таких условиях загрязнение агара или медленно разлагают агар. Поэтому необходим очень тщательный контроль. В настоящее время знание свойств водородных бактерий ограничено почти исключительно быстрорастущими штаммами. В противоположность Определителю Берги (Bergey, 1957), где сохраняется род *Hydrogenomonas*, Красильников (1949) исходил из принципа «морфологический род, физиологический вид» и распределил известные виды водородных бактерий по таким морфологическим группам, как псевдомонады. При систематизации водородных бактерий Савельева и Жилина (1968) сохранили род *Hydrogenomonas*, а Стеннер и Дудоров (Stanier et al., 1966; Davis et al., 1969, 1970) распределили водородные бактерии по тем родам гетеротрофных организмов, которые они напоминают по физиологии: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*.

Прямолинейное решение в пользу морфологического или физиологического рода вряд ли может быть признано бесспорным.



Рис. 8. *Hydrogenomonas pantotropha* Z-11

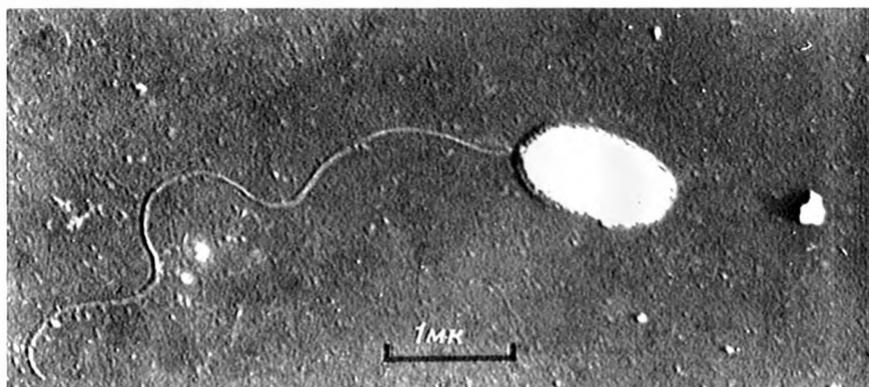


Рис. 9. *Hydrogenomonas facilis*

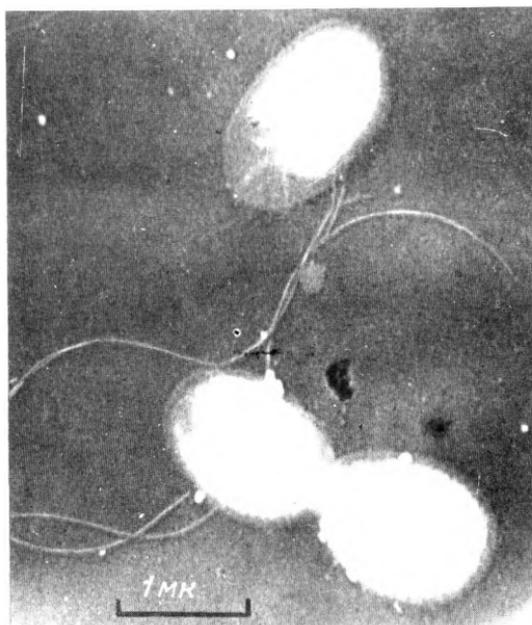


Рис. 10. Молодые клетки *Hydrogenomonas cutropha* Z-1, 18 час., МПД

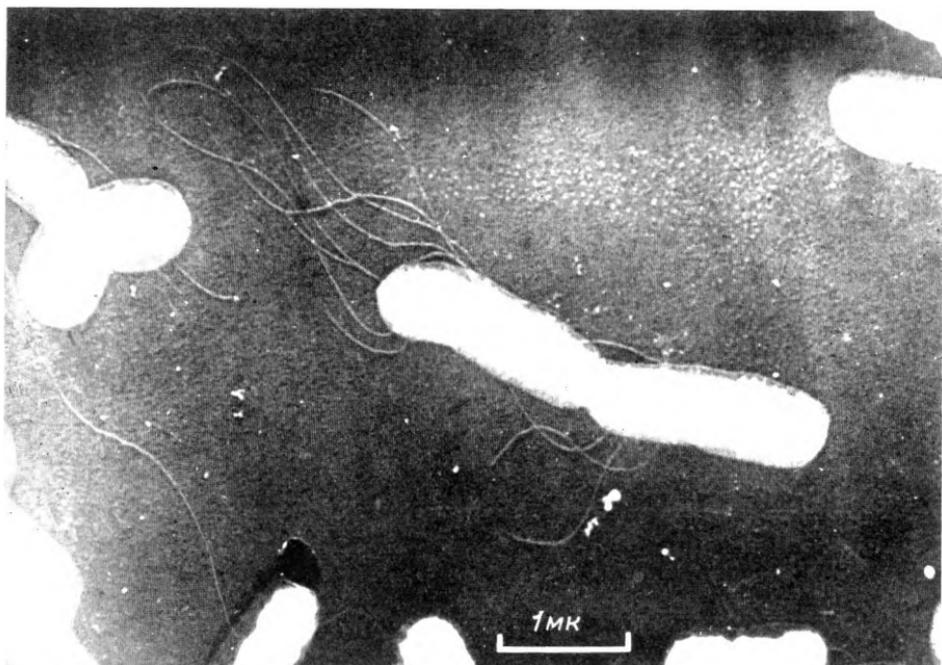


Рис. 11. Старые клетки *Hydrogenomonas cutropha* Z-1

Совершенно аналогичная ситуация имеется в систематике любой другой физиологической группы, например, метанобразующих бактерий, где устойчивость номенклатуры обуславливается традицией. Для водородных бактерий, в отличие от тионовых или нитрифицирующих, положение усугубляется тем, что они могут расти на органических средах и тогда, действительно, неотличимы от соответствующих гетеротрофов. Во всяком случае любое решение требует пересмотра всей систематики бактерий и последовательного применения принципа ко всем классифицируемым объектам. Систематика бактерий не может быть построена по образу и подобию систематики позвоночных животных и цветковых растений, так как у бактерий многие таксономические признаки сочетаются комбинаторно (Заварзин, 1969). Поэтому в фенотипической систематике бактерий, основанной на сходствах и различиях, в настоящее время разумнее всего исходить из практических потребностей, обеспечивающих надежную диагностику и устойчивую номенклатуру. В этом смысле сохранение рода *Hydrogenomonas* и хотя бы тривиального названия гидрогеномонады оправдано.

Более веским аргументом в пользу сохранения физиологических родов литотрофных организмов служит то обстоятельство, что в иерархии руководящих признаков, на которой основана современная система живых существ, автотрофия как тип питания есть признак более высокого ранга, чем детали морфологического строения, несмотря на то, что число ферментов, специфических для автотрофии, меньше, чем для пути окисления триптофана или другого органического вещества.

Все эти соображения и заставляют сохранять здесь и на протяжении всей книги номенклатуру физиологических родов, хотя недостатки ее очевидны.

Несомненно, что водородные бактерии изучены еще на недостаточном числе штаммов, и виды, которые кажутся сейчас хорошо обособленными, могут слиться.

Hydrogenomonas pantotropha Kaserer, 1906 (syn: *Pseudomonas pulleronii* Davis et al., 1970). Палочки 0,3—0,5×0,8—1,2 мк с закругленными концами. Клетки часто образуют агрегаты, активно подвижны за счет одного полярного жгутика, грамотрицательные, неспоровые (рис. 8). На минеральной агаризованной среде в атмосфере $H_2 : O_2 : CO_2$ образуют слизистые желтые колонии.

На жидкой минеральной среде рост диффузный. Время удвоения при культивировании, как на рис. 6, составляет около 4-х часов. Наилучший рост был получен при 75% H_2 , 15% O_2 , 10% CO_2 . В таких условиях примерно 50% веса клетки составляет белок и около 20% — полимер оксимасляной кислоты. Желатину не разжижает. Колонии на МПА и картофельном агаре желтые слизистой консистенции, на бульоне — пленка, слабая муть, осадок. Молоко не изменяет. Нитрит из нитрата не образует, не денитрифицирует,

не использует углеводы. Хорошо использует органические кислоты: муравьиную, янтарную, щавелевую, уксусную, молочную, фумаровую, пировиноградную, яблочную, бензойную. Аэроб. При выращивании на органических средах оптимум температуры около 28—30°.

Это наиболее распространенная водородная бактерия, часто выделяющаяся из воды и почвы.

По Дэвис (Davis et al., 1970), *P. falleronii* отличается от *P. flava* набором каротиноидов и неспособностью использовать углеводы. От *A. paradoxus* отличается жгутикованием, неспособностью использовать фруктозу, арабинозу, гистидин, пантотенат. Может расти по меньшей мере на 46 различных органических соединениях в качестве единственного источника углерода и энергии. ПЦ 66,8 мол. %.

Hydrogenomonas facilis Schatz et Bovell, 1952 (рис. 9). Палочки 0,7 × 2,0 мк при росте в автотрофных условиях, одиночные, в парах или в коротких цепочках. Имеет один-два полярных жгутика, оживленно подвижен. Грамотрицательный.

Колонии на агаре округлые, приподнятые, блестящие, беловатые, не флуоресцирующие. Желатину быстро разжижает, на бульоне образует муть и пленку, медленно подщелачивает молоко. Рост на картофеле обильный, не пигментированный. Не образует ни индола, ни сероводорода, ни ацетилметилкарбинола. Нитрат восстанавливает в нитрит, к анаэробному росту неспособен. На органической среде может расти в присутствии 100% кислорода.

Организм окисляет глюкозу, тирозин, лактат, янтарную, уксусную, пировиноградную, фумаровую, яблочную, щавелевоуксусную кислоты без периода адаптации. Кроме того, использует еще ряд органических веществ. При росте в органотрофных условиях часть энзиматической активности, необходимой для автотрофного роста, сохраняется. Переход от автотрофного к гетеротрофному росту не сопровождается отбором мутантов: все клетки способны к авто- и гетеротрофному росту.

В атмосфере гремучего газа на жидкой среде организм развивается в виде пленки, у некоторых штаммов очень массивной. Скорость роста и накапливаемая биомасса у штаммов этого вида относительно невелики. Организм преимущественно выделяется в неподвижных культурах, где развитие в виде пленки останавливает проникновение газов в глубину среды. При росте с перемешиванием способен образовывать хлопья.

Организм хорошо отличается от других гидрогеномонад как культуральными признаками, так и по специфическому фагу. К этому же виду принадлежат выделенные Жилиной (1970а) литогетеротрофные водородные бактерии. Гетеротрофные бактерии, сходные с *H. facilis*, отнесены Дэвис (Davis et al., 1970) к *Pseudomonas delafieldii*.

Hydrogenomonas eutropha Repaske, 1962 (syn. *Alcaligenes eutrophus* Davis et al., 1969). В эту группу объединяются штаммы, очень

сходные физиологически, но различающиеся по морфологии. ATCC 17697 — штамм, впервые выделенный Бовеллом, подробно описанный и названный Репаске (Repaske, 1962, 1966). Маленькая грам-отрицательная коккобацилла 0,7—1 мк. На плотной среде образует влажные приподнятые колонии бледного желтовато-коричневого цвета диаметром 2—5 мм. Клетки молодой культуры красятся равномерно, но с началом накопления запасных веществ окрашивается только отесненная к краям клетки цитоплазма. Ультратонкое строение, типичное для грам-отрицательных бактерий. Значительные мембранные образования отсутствуют. В атмосфере гремучего газа на качалке организм растет в виде гомогенной суспензии со временем удвоения 2,5 часа. В качестве азотистого питания может использовать соли аммония, нитрат, мочевины, в концентрации 0,019 М по азоту. Нитрат обуславливает меньшую скорость роста. Мочевина разлагается уреазой медленно и резких изменений рН не происходит. Оптимум рН 6,4—6,8. Температурный оптимум 30°. Организм очень чувствителен к доступности железа в среде и увеличивает скорость роста вплоть до концентрации железа 0,1 мг/л. Гетеротрофно растет на средах с глюкозой, солях органических кислот.

Физиологически сходные более крупные подвижные палочки штаммов Н-20, Н-1, Н-16, Z-1 относятся к наиболее быстро растущим гидрогеномоадам. Все эти организмы объединяются по чувствительности к общим бактериофагам, физиологическим и биохимическим признакам. Морфологически это палочка 0,8 × 1,5 мк, в молодой культуре большей частью одиночная или в парах, реже в коротких цепочках. Молодые клетки имеют один субтерминальный жгутик (рис. 10), более старые культуры содержат клетки с несколькими жгутиками, прикрепленными перитрихально (рис. 11). Форма и размеры клеток изменяются главным образом в связи с накоплением полимера β-оксимасляной кислоты, который может составлять до 70% веса клетки.

Колонии на агаре серые со слабо лопастными краями. На жидкой минеральной среде рост диффузный обильный со временем удвоения около 3 час.

При органотрофном росте штаммы этого вида окисляют преимущественно органические кислоты, в том числе муравьиную, и некоторые аминокислоты. Сахара используются плохо, за исключением фруктозы и у мутантных штаммов — глюкозы. Азотистые основания используются плохо.

Alcaligenes paradoxus Davis et al., 1969 включает автотрофный биотип I и гетеротрофный биотип II, напоминающий обычных обитателей сточных вод *Alcaligenes viscolactis*, *A. bookeri*. Это крупные слегка изогнутые палочки с перитрихальным жгутикованием. Колонии окрашены в желтый цвет каротиноидами. Организм использует практически все испытанные органические вещества. В атмосфере гремучей смеси культура *A. paradoxus* растет хорошо,

по легко лизируется (Заварзин, Жилина, 1971). Этот вид требует тщательного дальнейшего изучения.

Кроме этих основных видов гидрогеномнад было описано большое число различных микроорганизмов, способных осуществлять реакцию гремучего газа. Часть из них представляют водородные бактерии, приспособившиеся к развитию в экстремальных условиях.

Hydrogenomonas thermophilus McGee et al., 1967. Термофильный организм с оптимальной температурой 50°, рост отсутствовал при 20 и 60°, слабый рост при 30 и 40°. Мелкая грамотрицательная палочка 0,6×1,3 мк в парах, коротких цепочках или отдельно. Спор не образует, капсулы не имеет. Колонии на минеральной среде Репаске (авторы подчеркивают необходимость добавлять раствор соли Мора к среде непосредственно перед застыванием агара) мелкие плоские гладкие прозрачные. В статической культуре может расти при содержании кислорода 10—40%, но при перемешивании — не выше 10%. При росте на лактозо-глюкозо-сахарозо-пептонной среде происходило подщелачивание. На желатине, глюкозо-фосфатно-пептонной среде, лимонной кислоте роста не было. Нитриты из нитратов не образуются. Рост на триптофане без образования индола, сероводорода не образует.

Галофильные водородные бактерии, несомненно, существуют, но не были исследованы сколько-нибудь детально.

В кислой среде Ляликова отметила в культурах *Thiobacillus ferrooxidans* увеличение числа клеток в атмосфере гремучего газа, не исследуя этого вопроса детально (личное сообщение).

Кроме перечисленных, было описано несколько видов водородных бактерий, отличающихся своей чувствительностью к кислороду. В определителе включены виды *Hydrogenomonas flava* и *H. vitrea*, обнаруженные Никлевским (Niklewski, 1910). Эти организмы росли при концентрации кислорода меньше 8% и только в смешанных культурах. Повторение опытов Никлевского привело к заключению, что этими организмами были скорее всего миксобактерии, хорошо развивающиеся в таких условиях за счет медленного разложения агара. По описанию Никлевского, *H. vitrea* имеет палочки до 2 мк длиной, прикрепленные друг к другу слизью. Подвижности не наблюдалось. Колонии на агаре в атмосфере гремучего газа нежные, прозрачные по краям, со слабой флуоресценцией (призрирующие?) и желтым центром, углубленные в поверхность агара и распространяющиеся по поверхности. На жидкой среде они образовали пленку. *H. flava* представлял подвижную благодаря полярному жгутику палочку 1,5 мк. Колонии были мелкие блестящие, прикрепленные к субстрату. Эти клетки располагались одиночно между клетками *H. vitrea*. Впоследствии аналогичный организм был выделен и идентифицирован по признакам гетеротрофного роста как *Flavobacterium*. Авторы, исследовавшие культуру с такими признаками, приходили к выводу, что при росте на органических средах организм необратимо утрачивал спо-

способность к росту в атмосфере гремучего газа (Kluyver, Manten, 1942).

Hydrogenomonas flava под названием *Pseudomonas flava* был сохранен (Davis et al., 1970). По росту на сахарах он напоминает *P. saccharophila*, имеет близкий к нему состав азотистых оснований (ГЦ 67,3 мол. %) и отличающиеся от других видов каротиноиды. Микроорганизмы, соответствующие по своим признакам *H. vitrea*, были выделены Савельевой и Жилиной (1968) из очистных сооружений и сначала так и идентифицированы. Более тщательное исследование, однако, показало, что организмы обладают скользящим движением, а на крахмало-амниачном агаре образуют плодовые тела, свойственные миксобактериям рода *Archangium*. Рост на агаризованных средах варьировал: колонии либо расплзались под поверхностью агара, оставляя желтый центр в середине и просвечивающий ореол вокруг, либо образовывали яркне блестящие желтые колонии в небольшом углублении агара, видимом при косвенном освещении. Морфология организма была типичной для миксобактерий (Жилина, 1968). Организм обладал своеобразными каротиноидами.

Способность культуры использовать агар в качестве питательного субстрата заставила тщательно исследовать ее рост в жидких средах. На этих средах рост был плохо воспроизводим, иногда наблюдалась обильная муть, но следующий пересев был безуспешен. Очистка путем выделения колоний на плотных средах привела к культуре, которая оказалась неспособной к автотрофному росту. Это напоминает о сообщениях, что водородные бактерии теряют при культивировании на органических средах способность расти автотрофно. Некоторое время спустя, при исследовании СО-окисляющих микроорганизмов на чашках с агаром, были выделены белые диффузные врастающие колонии организма, который определен как *Polyangium fumosum* (Санжиева, 1970). Организмы этого типа регулярно обнаруживаются при посеве на чашки с агаром в атмосфере гремучего газа. Нет сомнения, что миксобактерии были описаны как водородные бактерии. Остается, однако, неясным, почему тщательная очистка культуры привела к потере способности расти под водородом. Не исключена возможность, что миксобактерия действительно росла в этих условиях в симбиозе с другими организмами, так как при посеве на чашке выростали типичные желтые колонии *Archangium*, но более вероятно, что миксобактерии являются спутниками водородных бактерий.

К числу других организмов, существование которых сейчас не признается, относится *Bacillus hydrogenes* (Лебедев, 1910), описание которого сделано недостаточно полно, чтобы идентифицировать культуру вновь. По Лебедеву *Bacillus hydrogenes* — мелкая палочка с полярными зернами 1,2—1,5 мк, выделенная в культуру на кремнекислом геле. Рост на жидкой среде в виде пленки, которая взползает по стенкам сосуда. Устойчив к нагреванию

до 60°. Колонии молочно-белого цвета, их форма нехарактерна. Желатину разжижает медленно. При посеве уколom растет на поверхности, а в глубине образует пузырьки газа. Способен к выделению газообразного азота. При гетеротрофном росте использует пептон, сахара, спирты, аспарагин, лейцин, органические кислоты. Оптимум роста при 25°, при 45° не растет. Выносит от 18,6 до 70% O₂. В настоящее время такого организма в культуре нет.

Упомянувшееся уже широкое разнообразие микроорганизмов, окисляющих H₂, принадлежащих к разным таксономическим группам, не ограничивается истинными бактериями. Однако при существующих методах выделения медленно растущие штаммы обычно не попадают в поле зрения исследователей. Штаммы с большой скоростью роста вытесняют их из накопительных культур. Слаборастущие под водородом организмы со временем теряют способность развиваться на минеральной среде по невыясненным причинам, и их принадлежность к водородным бактериям остается под сомнением. Некоторые из них, возможно, принадлежат к литогетеротрофным микроорганизмам, но существование их было установлено только недавно (Жилина, 1970а, б), а во многих случаях добавление органического вещества оказывалось безрезультатным (Савельева, Жилина, 1968).

Систематические исследования способности расти в атмосфере водорода и кислорода были проведены только с микобактериями и актиномицетами. Ряд микобактерий, окисляющих водород, был выделен Беляевой (1950): *Mycobacterium album*, *M. citreum*, *M. perugosum*, *M. fluorescens*, *M. salvarium*, *M. filiforme*, *M. mucosum*, затем — Фостером с сотрудниками при исследовании организмов, использующих углеводороды: *M. phlei*, *M. paraffinicum*, *M. fortuitum*, *M. marinum* (Dworkin, Foster, 1957); Хирш (Hirsch, 1961) из 32 исследованных штаммов микобактерий обнаружил способность расти в атмосфере гремучего газа у *Mycobacterium phlei*. Исключительно медленный рост обнаружен в этих условиях у актиномицетов: *Streptomyces autotrophicus* Takamiya, Tubaki, 1956 (syn. *Nocardia autotrophica* nov. comb. Hirsch, 1961), *Nocardia sarturnea*, *N. petroleophila*.

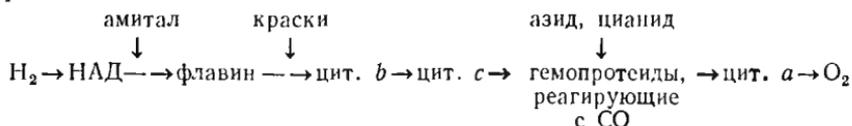
ОКИСЛЕНИЕ ВОДОРОДА

Перенос электрона у водородных бактерий осуществляется по полной цепи переносчиков, близкой по составу к митохондриальной.

В этой цепи было установлено функционирование следующих компонентов: НАД, флавопротеинов, убихинона-8, цитохромов *b*, *c*, *a*, *o*. Ферредоксин у водородных бактерий не был обнаружен (Ahrens, 1966).

Спектрофотометрическое исследование интактных клеток показало, что в присутствии водорода все наблюдаемые переносчики

электрона восстанавливаются (Packer, 1958) в соответствии с предполагаемой схемой, на которой помечены места действия ингибиторов:



У разных организмов наблюдалось варьирование терминальных оксидаз: одни авторы наблюдали реагирующие с CO гемопротосиды, которые были описаны как цитохром *o* (Packer, 1958; Repaske, 1966), другие обнаружили четкий пик цитохрома *a* (Ahrens, 1966; Лисенкова, 1967; Веденниа, 1968).

Первым ферментом цепи переноса электрона является гидрогеназа. К окислению водорода способны многие микроорганизмы, обладающие этим ферментом. В настоящее время различаются по меньшей мере три типа гидрогеназ, встречающихся у гетеротрофных микроорганизмов. Фермент водородных бактерий назван водороддегидрогеназой.

Из всех литоавтотрофов только водородные бактерии способны непосредственно восстанавливать НАД окисляемым субстратом — водородом, так как у всех остальных организмов субстрат имеет слишком положительный потенциал. Активирующий водород фермент находится у разных штаммов водородных бактерий в разных фракциях: растворимой и фракции частиц, оседающих при 100 000 *g*.

Растворимая гидрогеназа была выделена и очищена из *H. ruhlandii*. Фермент был специфичен для НАД и осуществлял гидрирование в β -положение. Значение констант Михаэлиса для разных препаратов составляло: для НАД $5,7 \cdot 10^{-4}$ — $6,6 \cdot 10^{-6}$ *M* и для H_2 $4,8 \cdot 10^{-4}$ — $7,6 \cdot 10^{-6}$ *M*. Фермент содержал железо, связанное с белком тиольной группой. Растворимая гидрогеназа, но требующая для своего действия ФМН и, возможно, других кофакторов, была обнаружена также у *H. eutropha* (Repaske, 1966). Дегидрогеназа водорода из *H. ruhlandii* отличается от других ферментов (Bernstein, Vishniac, 1959; Bone et al., 1963).

Связанную с частичками гидрогеназу нашли у штаммов *P. saccharophila*, *H. facilis*, *H. eutropha* Н-16 (Bone, 1960; Atkinson, McFadden, 1954; Eberhardt, 1966). У *Hydrogenomonas* Н-16 имелись обе дегидрогеназы — растворимая и связанная с частицами. Растворимая НАД-специфическая гидрогеназа из *H. eutropha* Н-16 была очищена в 45 раз и не содержала связанных пиридиннуклеотидов или флавинов. Она реагировала только с НАД; ни кислород, ни НАДФ, ни флавины, ни метиленовая синяя не могли служить акцептором электрона (Pfitzner et al., 1970). Расхождение с ранее опубликованными данными объясняется, вероятно, тем, что в присутствии каталитических количеств НАД происходит восстановление

ние ФМН, ФАД и метиленовой синей. Константа Михаэлиса по водороду была равна $1,9 \cdot 10^{-4}$ М, а половина максимальной скорости реакции достигалась при концентрации НАД $1,3 \cdot 10^{-4}$ М. Связанная с частицами гидрогеназа не восстанавливала добавленный извне НАД, акцепторами электрона для нее могли служить только кислород и метиленовая синяя. На окисление водорода частицами не влияли НАДФ, НАД, ФМН, ФАД, цитохром *c*. Окисление водорода этой фракцией лимитировалось скоростью потребления кислорода и ингибировалось цианидом $6 \cdot 10^{-3}$ М и окисью углерода (Eberhardt, 1966).

В связи с этим было высказано предположение, что растворимая и связанная с частицами гидрогеназа выполняют в клетке разные функции. Растворимая гидрогеназа образуется при гетеротрофном росте. Связанная с частицами гидрогеназа участвует в переносе электрона по дыхательной цепи и механизме окислительного фосфорилирования.

Исследование переноса электрона и окислительного фосфорилирования в бесклеточных экстрактах у разных штаммов водородных бактерий привело к несколько различающимся результатам. У *H. eutropha* ATCC 17697 восстановление цитохрома *c* осуществляла растворимая гидрогеназа. Экстракты быстро восстанавливали НАД, но медленно окисляли его. Нафтохиноны, витамины K_1 и K_2 , убихинон-10 не стимулировали процесс окисления НАДН, но оно резко усиливалось при добавлении менадиона (витамина K_3). Окисление цитохрома *c* у этого организма осуществляла фракция частиц, содержащая цитохром *o*, но не цитохромпероксидазу (Repaske, Lizotte, 1965; Repaske, 1966; Wittenberger, Repaske, 1961).

Бонжерс (Bongers, 1967) нашел, что в экстрактах *Hydrogenomonas* Н-20 в присутствии цианида продувание смеси кислородом или водородом приводит к изменениям только в спектре поглощения цитохрома *b*, но не *a*. Антимицин А, амитал, ротенон были неэффективными ингибиторами, что указывало на возможность пути переноса электрона, минующего НАД. Окислительное фосфорилирование в бесклеточных препаратах проходило с малой эффективностью: отношение Р/О составляло 0,2—0,7. На основании своих данных Бонжерс предложил схему переноса электрона, по которой образование АТФ происходит только на участке между водородом и цитохромом *b*. Однако $Y_{\text{АТФ}}$, возможный по схеме Бонжерса, ниже реально наблюдаемого (Федорова, 1970).

Исследование окислительного фосфорилирования у *H. eutropha* (Ishaque, Aleem, 1970) не подтвердило предположений Бонжерса об особом пути переноса электрона у водородных бактерий. В бесклеточных препаратах окисление добавленных субстратов дало высокое отношение образованного АТФ к поглощенному кислороду. Отношение Р/О было с водородом — 1,6; с НАДН — 1,8; с сукцинатом — 0,9; с аскорбатом — 0,63. Это указывает на то, что все три места фосфорилирования активны. Улавливание эндогенного

НАДН с помощью пируват-лактатдегидрогеназной ловушки значительно снижало и окислительное фосфорилирование и поглощение кислорода. Из этого следует, что НАД участвует в переносе электрона. У *H. eutropha* был обнаружен также АТФ-зависимый обратный перенос электрона. Ингибиторный анализ привел авторов к заключению, что у водородных бактерий существует и функционирует нормальная цепь переноса электрона с тремя местами фосфорилирования, изображенная на следующей схеме:

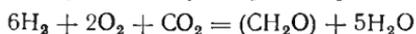


Около 60—70% переносится по прямому пути, но существует и шунт от НАД к цитохрому *b*, который может непосредственно окисляться кислородом в системах, заблокированных антимицином. В препаратах, заблокированных цианидом или азидом, электроны могут идти через цитохром *o*, но этот путь не связан с фосфорилированием. Сукцинат окисляется в основном через цитохром *b*, но может и через цитохром *c* оксидоредуктазу. Обратный перенос электрона начинается на уровне цитохромов *c* и *b*. И прямой и обратный перенос электрона, также как и окислительное фосфорилирование, чувствительны к ингибиторам, действующим на уровне первого и второго мест сопряжения.

В отсутствие углекислоты водородные бактерии поглощают водород и кислород в отношении 2 : 1 (Лебедев, 1910). Это соотношение позволило Лебедеву сделать вывод, что энергетический процесс идет независимо от процесса ассимиляции углерода и выражается уравнением $2\text{H}_2 + \text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O}$. Руланд (Ruhland, 1922) назвал этот процесс «холостым окислением».

Присутствие углекислоты в газовой смеси приводит к тому, что соотношение потребленных газов изменяется, причем избыток потребленного водорода примерно соответствует количеству потребленной углекислоты. Уже Лебедев (1910) установил, что отношение H_2/CO_2 меняется с возрастом культуры.

Впоследствии соотношение потребленных газов неоднократно проверялось и в большинстве случаев принимают $\text{H}_2 : \text{O}_2 : \text{CO}_2 = 6 : 2 : 1$, соответствующее суммарной реакции:



Это соотношение было определено Шатцем в аппарате Варбурга с суспензией *H. facilis*. Вводя через капиллярный отросток в сосуд последовательно кислоту, щелочь, пирогаллол, Шатц сумел определить в одном эксперименте потребление всех трех газов. Соотношение выдерживается и в растущей культуре (Schatz, 1952; Repaske, 1966; Schuster, Schlegel, 1967).

Ограничение роста водородных бактерий часто вызывается недостатком того или иного газа в газовой смеси. Чтобы исследовать клетки, находящиеся в условиях ограничения водородом или кислородом, Шустер (Schuster, Schlegel, 1967) использовал снабжение культур электролитически получаемыми газами. Регулирование количества газа, поступающего в культуру, достигалось тем, что анод был разделен на две пластины, одна из которых была вынесена в отдельный сосуд, соединенный с культиватором электролитическим ключом; выделяемый с поверхности этой пластины газ не поступал в культиватор. После того как потребление газа развивающейся культурой достигало уровня его поступления от электролизера, рост культуры ограничивался и становился линейным. Как показали измерения потребления газов суспензиями таких клеток, в них, независимо от того, был ли рост ограничен H_2 или O_2 , происходит разбавление ферментов дыхательной цепи, которые, видимо, не синтезируются вновь в таких клетках. Исключение составляет гидрогеназа, которая при ограничении водородом синтезируется в избыточном количестве. Недостаток кислорода приводит к избыточному синтезу запасного полимера оксимасляной кислоты с соответствующим повышением «эффективности использования свободной энергии», характеризуемой отношением H_2/CO_2 , и увеличением на 26—45% плотности культуры и константы урожая. Концентрация белка, однако, остается постоянной и при ограничении кислородом и при ограничении водородом, и, таким образом, сдвиги в перечисленных выше величинах отражают в основном один процесс — накопление запасного вещества. Недостаток водорода приводил к почти 6-кратному увеличению активности гидрогеназы, в то время как активность цитохромоксидазы изменялась лишь на 28%.

Очевидно, что соотношение потребляемых газов $6H_2 : 2O_2 : CO_2$ суммирует ряд происходящих в клетке процессов. Один из этих процессов — уже упомянутое холостое окисление, второй процесс — окисление, связанное с ассимиляцией углекислоты.

Можно написать следующие уравнения:

1. $4H_2 + 2O_2 = 4H_2O$ окисление водорода
 2. $2H_2 + CO_2 = (CH_2O) + H_2O$ ассимиляция углекислоты
- Сумма: $6H_2 + 2O_2 + CO_2 = (CH_2O) + 5H_2O$

Исходя из того, что у водородных бактерий обмен ориентирован на синтез органических соединений, O_2 используется для синтеза АТФ, а H_2 — для восстановления и O_2 и CO_2 , Федорова (1970)

рассчитала возможные урожаи: если потребление моля O_2 дает 2 моля АТФ, то соотношение потребленных газов $CO_2 : O_2 : H_2$ равно $1 : 2,9 : 8,5$. Если образуются 4 моля АТФ/моль O_2 , то отношение $1 : 1,44 : 5,6$; если 6 молей АТФ/моль O_2 , то $1 : 0,97 : 4,63$.

Исследуя скорость окисления водорода бактериями, Барта (Bartha, 1962) нашел, что добавление углекислоты в газовую смесь вызывает 4—5-кратное увеличение скорости потребления газа клетками, бедными запасными веществами. После использования добавленной углекислоты скорость потребления газа снова снижалась. Влияние углекислоты не обнаруживалось у клеток, богатых запасным углеродсодержащим веществом, а добавление органических источников углерода не заменяло углекислоту. Таким образом, у водородных бактерий был найден механизм дыхательного контроля: в отсутствие потребляющей энергии реакции — ассимиляции углекислоты — скорость окисления энергетического субстрата падает. У большинства хемоавтотрофов этот механизм регуляции не обнаружен. Водородные бактерии составляют исключение в этой группе потому, что только у них окисляемый субстрат может непосредственно включаться в конструктивный обмен.

Обычно регуляция скорости окисления субстрата клеткой осуществляется через изменение соотношения АТФ/АДФ (см. главу I). В отсутствие потребления АТФ соотношение увеличивается и окисление субстрата тормозится. Однако у водородных бактерий обычные разобщители, такие как динитрофенол, не действовали (Bartha, 1962), по-видимому, вследствие быстрой инактивации в присутствии водорода (Hirre, 1967). Так же как отсутствие углекислоты, дыхание угнетали яды, подавляющие рибулозодифосфатный цикл, например, моноодуксусная кислота. В отсутствие CO_2 дыхание стимулировали соединения, шунтирующие перенос водорода по нефосфорилирующему пути, такие как метиленовая синяя.

КОНСТРУКТИВНЫЙ ОБМЕН

Исследование ассимиляции углекислоты водородными бактериями показало, что включение углерода осуществляется через цикл Кальвина, который был подробно описан в главе I главным образом на примере водородных бактерий и повторно здесь не рассматривается. Автотрофная ассимиляция CO_2 была недавно подробно изучена Ведениной (1968) в нашей лаборатории.

Первым ферментом цикла Кальвина является карбоксилаза рибулозодифосфата. Активность фермента из *Hydrogenomonas Z-1* была порядка $0,14—0,16$ $\mu M CO_2/мин/мг$ белка. Константы Михаэлиса составляли $1 \cdot 10^{-2}$ M (по углекислоте) и $0,6 \cdot 10^{-3}$ M (по рибулозодифосфату). Низкое сродство основного фермента карбоксилирования не является результатом повреждения при обработке константа Михаэлиса по углекислоте для целых клеток *Hydrogenomo-*

нас имеет ту же по порядку величину 10^{-2} М, что и фермент в бесклеточном препарате. Следовательно, не происходит значительного повреждения фермента при разрушении клетки. Однако в бесклеточных препаратах организма не удается обнаружить активность фосфорibuлокиназы (Ромакова и др., 1970), отсутствие которой приводит к ненормально низкой фиксации $C^{14}O_2$ в присутствии АТФ и НАДН.

Сопоставление скоростей фиксации углекислоты изолированными из культуры клетками с бесклеточным препаратом показало, что активность фермента вполне достаточна, чтобы обеспечить включение углекислоты целыми клетками. Вместе с тем скорость ассимиляции углерода клетками, изолированными из растущей культуры, составляла в период интенсивного роста иногда всего 25% от величины включения углерода в развивающуюся культуру. Таким образом, приходится прийти к выводу, что в растущих клетках происходит значительная активация системы ассимиляции углекислоты, которая очень легко нарушается при самом осторожном отделении клеток от культуры. По-видимому, скорость ассимиляции углекислоты целой клеткой зависит от сопряженных реакций биосинтеза, отвлекающих продукты фиксации от цикла.

У водородных бактерий подробно удалось разобрать направление продуктов ассимиляции углекислоты на конструктивные цели. Уже среди ранних продуктов обнаруживаются серин, аспарагиновая кислота, яблочная, янтарная, фумаровая кислоты, затем аланин, лимонная, глутаминовая кислоты. Появление этих продуктов связано с образованием из фосфоглицериновой кислоты фосфоенолпировиноградной кислоты и ее последующими превращениями. Образование соединений цикла Кребса происходит при автотрофном росте водородных бактерий по нормальному направлению работы цикла: фторацетат, ингибитор аконитазы, подавляет образование глутаминовой кислоты и приводит к накоплению лимонной. Восстановительный цикл карбоновых кислот у этих организмов, по-видимому, не действует. Вступление фосфоенолпировиноградной кислоты в цикл трикарбоновых кислот осуществляется и через образование щавелевоуксусной кислоты карбоксилатной необратимого действия.

При развитии водородных бактерий происходит, как показали Веденниа (1968) и Савельева (1968), закономерное изменение содержания основных компонентов клетки (рис. 12, 13). Рост водородных бактерий в стационарной культуре отчетливо разделяется на следующие фазы: фазу задержки роста, короткую фазу экспоненциального роста, за которой наступает длительная фаза линейного роста. Концентрация нуклеиновых кислот в культуре достигает постоянного уровня в фазу экспоненциального роста, которая заканчивается снижением скорости синтеза белка. С достижением постоянной концентрации белка в культуре начинает увеличиваться содержание поли- β -оксимасляной кислоты, которая продолжает

линейно возрастать до тех пор, пока она не составит около 70% сухого веса клеток.

Две основные системы клетки — переноса электрона и ассимиляции углекислоты — так же закономерно сменяют друг друга в процессе развития культуры. Максимальная удельная скорость фиксации углекислоты приходится на фазу экспоненциального роста, круто возрастая вначале и медленно снижаясь затем по мере синтеза белков. Концентрация цитохромов в клетке начинает возрастать после того, как был достигнут максимум в удельной активности ферментов ассимиляции углекислоты, и возрастает вплоть до конца фазы экспоненциального роста, за которой начинается разбавление.

Таким образом, развитие культуры водородных бактерий представляет закономерную смену событий, и «структурированность биомассы» выражена у этих организмов очень отчетливо.

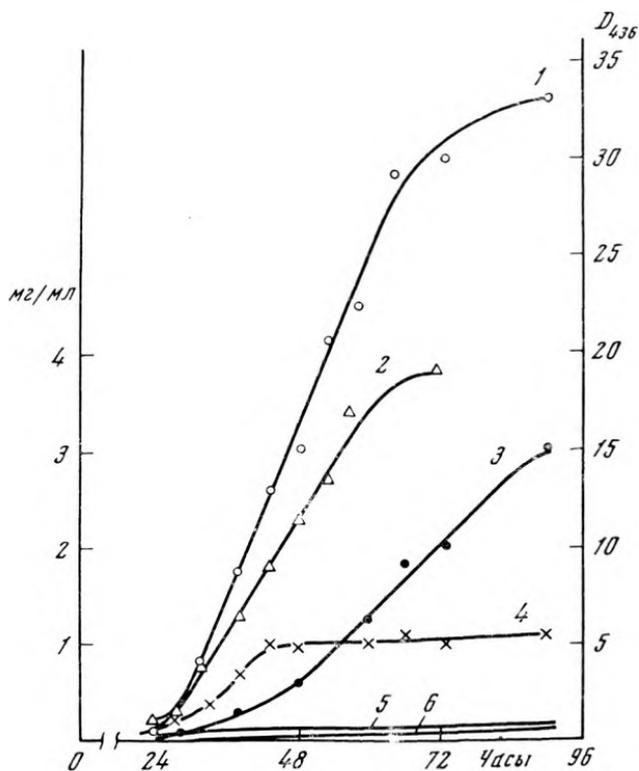


Рис. 12. Содержание основных компонентов клетки (в мг/мл) при автотрофном росте *Hydrogenomonas eutropha* Z-1 в установке, показанной на рис. 6 (Веденина, 1968)

1 — единицы оптической плотности при 436 мμ; 2 — вес сухой биомассы; 3 — полиоксимасляная кислота; 4 — белок; 5 — нуклеиновые кислоты; 6 — полисахариды

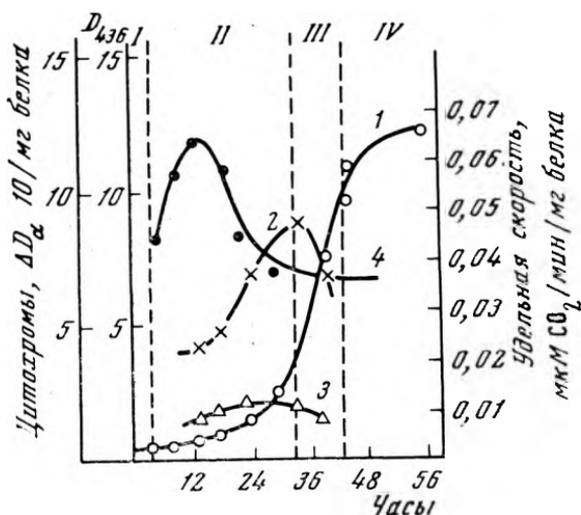


Рис. 13. Изменения содержания цитохромов и удельной скорости ассимиляции углекислоты *Hydrogenomonas eutropha* Z-1 по фазам роста культуры (I–IV) (Веденина, 1968)

- 1 — оптическая плотность;
- 2 — цитохромы c+b;
- 3 — цитохром a;
- 4 — изменение удельной скорости ассимиляции C^{14}O_2

Источником азота в средах для водородных бактерий обычно являются соли аммония или мочевины, оптимальная концентрация которых находится между 0,01 и 0,03 M/l. Применение солей аммония приводит к необходимости тщательного наблюдения за значением pH среды, которое вследствие потребления аммония может падать до pH 4,8, при котором рост большинства штаммов прекращается. Это в свою очередь требует забуферивания среды фосфатами и особенно карбонатами. Потребление углекислоты из среды приводит к повышению pH, если потеря углекислоты не возмещается ее притоком из газовой смеси. Включение аммония в обмен микроорганизмов происходит с помощью НАД- и НАДФ-специфичных глутаматдегидрогеназ, аланиндегидрогеназы и аспартазы. Из этих ферментов у *H. eutropha* была обнаружена только глутаматдегидрогеназа, причем активность фермента с НАДФ была значительно выше, чем с НАД. Оптимум фермента был при pH 8, и удалось получить мутанты, которые росли только при повышенном pH, но не при pH 6. НАДФ-зависимый фермент играет биосинтетическую роль, в то время как НАД-зависимый скорее всего участвует в использовании глутамата для энергетического обмена (Joseph, Wixom, 1970; Strenkovski, DeCicco, 1971). Раннее образование аминокислот аланина, аспарагиновой и глутаминовой в опытах по фиксации углекислоты показывает, что синтезированные соединения углерода быстро используются как акценторы аммиака. Недостаток азота в среде приводит к переключению пути обмена на синтез запасного полимера β -оксимасляной кислоты, о чем можно судить по отношению белок/сухой вес (рис. 14, а, б).

Наиболее удобным источником азота для водородных бактерий является мочевина, которая позволяет не включать в состав среды карбонаты и не приводит к резким изменениям pH. Исследование

уреазной активности водородных бактерий показало, что этот фермент подвергается катаболической репрессии под действием ионов аммония, а в отсутствие аммония претерпевает эндогенную дерепрессию. При разложении мочевины активность уреазы и концентрация аммиака в среде колеблются, причем колебания эти сдвинуты по фазе: появление аммиака приводит к уменьшению активности уреазы, исчерпание аммиака или иного источника азота для роста индуцирует образование уреазы (König et al., 1966; König, Schlegel, 1967). Эндогенная дерепрессия уреазы объясняется тем, что уреазы является конечным ферментом пути разложения азотистых оснований; удаление аммиака из среды приводит к прекращению синтеза белка и разрушению соответствующего ферментативного аппарата. Благодаря наличию этого механизма регуляции уреазная активность водородных бактерий не приводит к быстрому разложению мочевины и подщелачиванию среды, как это происходит у уробактерий (Krämer et al., 1967), у которых аммиак не репрес-

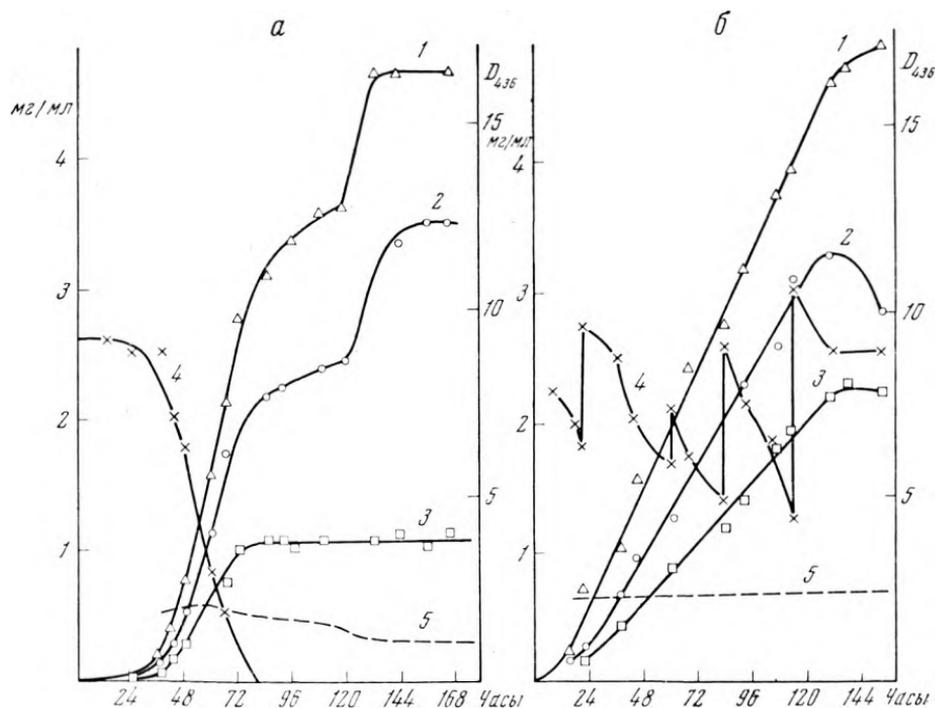


Рис. 14. Автотрофный рост *Hydrogenomonas pantotropha* Z-11 в зависимости от содержания аммония в среде

а — однократное добавление аммония; б — многократное добавление аммония; 1 — оптическая плотность; 2 — вес сухой биомассы; 3 — содержание белка; 4 — концентрация аммония в среде; 5 — отношение белок/сухой вес

сирует образование уреазы. Все до сих пор исследованные штаммы водородных бактерий обладали способностью расти на средах с мочевиной (Савельева, 1968).

Рост водородных бактерий на нитрате как источнике азота обычно идет медленнее, чем на восстановленных соединениях азота. У некоторых водородных бактерий была обнаружена способность денитрифицировать на средах с органическими веществами. К денитрификации в атмосфере водорода они, по-видимому, не способны, в отличие от *Micrococcus denitrificans*.

Использование органических источников азота водородными бактериями стало объектом серьезных исследований в связи с тем, что они должны служить предполагаемым источником азота в замкнутых экологических системах. Глутамат может служить источником азота и углерода при гетеротрофном росте *Hydrogenomonas*, причем рост осуществляется с одинаковой скоростью у адаптированных к глутамату клеток в атмосфере воздуха, гремучего газа и гремучего газа с углекислотой. Напротив, литотрофно выращенные клетки в атмосфере гремучего газа неспособны адаптироваться к использованию глутамата как источника углерода (Gottschalk, 1965), но не как источника азота (Krämer, 1968).

Водородные бактерии различаются по способности использовать азотистые основания. Кремер (Krämer, 1968) приводит следующие данные: *Hydrogenomonas eutropha* штаммы Н-1, Н-2, Н-16, Н-20 неспособны использовать пиримидины, за исключением цитозина, у которого они усваивают один атом азота, дезаминируя цитозин и урацил, накапливающийся в среде. *H. facilis*, напротив, использует широкий набор азотистых оснований: урацил, цитозин, дигидроурацил, 3-урейдопропионат, тимин, но не барбитуровую кислоту. Этот организм разрушает даже ДДТ (Focht, Alexander, 1971).

Использование органических источников азота обуславливается индуцированным дезаминаз при недостатке азота в среде. Отсутствие внешнего источника азота сопровождается синтезом уреазы, НАД-глутаматдегидрогеназы, глутаминсинтетазы. Индукции ферментов разложения пуринов при недостатке азота не происходит, так как уриказа и глиоксилаткарболигаза с низкой специфической активностью обнаруживаются в клетках и в присутствии аммиака.

Относительно способности водородных бактерий к ассимиляции атмосферного азота имеется только краткое сообщение Беляевой (1950) об азотфиксации у *Hydrogenomonas pantotropha*.

Обмен фосфора у водородных бактерий начали изучать уже давно. Образование органических фосфорных соединений при окислении водорода было установлено рядом авторов (Беляева, 1950; Schlegel, 1954). При окислении гремучего газа фосфат потреблялся из среды, но связь эта не была обязательной, и при холостом окислении фосфорилирование не шло.

Влияние концентрации фосфата на рост водородных бактерий подробно исследовано Кальтвассером (Schlegel, Kaltwasser, 1961; Kaltwasser, 1962). Поведение клеток в присутствии фосфата зависит как от предшествующих условий выращивания, так и условий инкубации. Если клетки росли при недостатке фосфата, например при концентрации 2 мг/л фосфора, то по исчерпанию его запасов рост прекращается. В таких клетках отсутствуют полифосфаты и содержание фосфора в 10 раз ниже, чем в нормальных клетках. При добавлении фосфата в среду он быстро потребляется, начинается использование азотсодержащих веществ для синтеза белков и нуклеиновых кислот, и рост снова прекращается по исчерпанию источников азота. В таких клетках накапливаются полифосфаты. Для достижения стационарного состояния достаточно 20—30 мин. Усвоение фосфата из среды требует энергии и может происходить только в присутствии кислорода либо за счет окисления водорода, либо за счет использования запасных веществ. Во время окисления водорода фосфор поступает во все фракции фосфорных соединений: нуклеиновые кислоты, полифосфаты и лабильные фосфорные соединения (АТФ). После удаления водорода последние сразу же возвращаются к исходному уровню, в то время как нуклеиновые кислоты и полифосфаты остаются в клетке неизменными. Добавление источников азота приводит к включению фосфора в нуклеиновые кислоты и использованию запасов полифосфатов.

В качестве источника серы водородные бактерии способны использовать сульфаты и, следовательно, обладают ассимиляторным путем усвоения этих соединений. Подробнее потребность этих организмов в соединениях серы не исследована, хотя многие из них обитают в условиях, где постоянно присутствуют восстановленные соединения серы, и можно допустить существование организмов, неспособных к использованию сульфатов.

Показано, что водородные бактерии нуждаются в значительных количествах железа, причем некоторые формы заметно увеличивают скорость роста и урожай, если железо добавляется в форме восстановленных соединений (Repaske, 1966); недостаток восстановленного железа может подавлять развитие этих организмов, что заставляет предпринимать специальные предосторожности при внесении железа в агаризованные среды. Вместе с тем при внесении окисленного железа в среду в клетках оно обнаруживается и в окисленном и в восстановленном состоянии (Мошковский и др., 1966). В лабораторных условиях культивирования в среду требуется добавлять порядка 10^{-6} М железа. Была обнаружена также потребность *Hydrogenomonas* Н-1 и Н-16 в $3 \cdot 10^{-7}$ М никеля (Bartha, Ordal, 1964) для автотрофного роста. Отсутствие в среде калия приводит к быстрой остановке роста.

Обмен водородных бактерий показан на схеме 9. Цепь переноса электрона водородных бактерий содержит все основные переносчики электрона. Водород вступает в цепь на уровне НАД под

действием гидрогеназы, которых может быть несколько у одного и того же вида водородных бактерий. Вода является единственным продуктом энергетического обмена. При синтезе воды происходит окислительное фосфорилирование с действующими всеми тремя местами фосфорилирования. Помимо этой основной цепи, водород может окисляться побочными путями. Восстановленный НАДН вступает в реакции цикла Кальвина и одновременно подавляет возможность окисления органических веществ по пути Энтнера — Дудорова. При органотрофном питании сахара и органические кислоты окисляются через путь Энтнера — Дудорова и цикл Кребса; образующийся НАДН окисляется в цепи переноса электрона. Углекислота, ассимилированная в цикле Кальвина и под действием ФЕП-карбоксилазы, вступает в цикл Кребса, превращается в органические кислоты, которые благодаря переаминированию с глутаминовой кислотой — единственным акцептором аммония — превра-

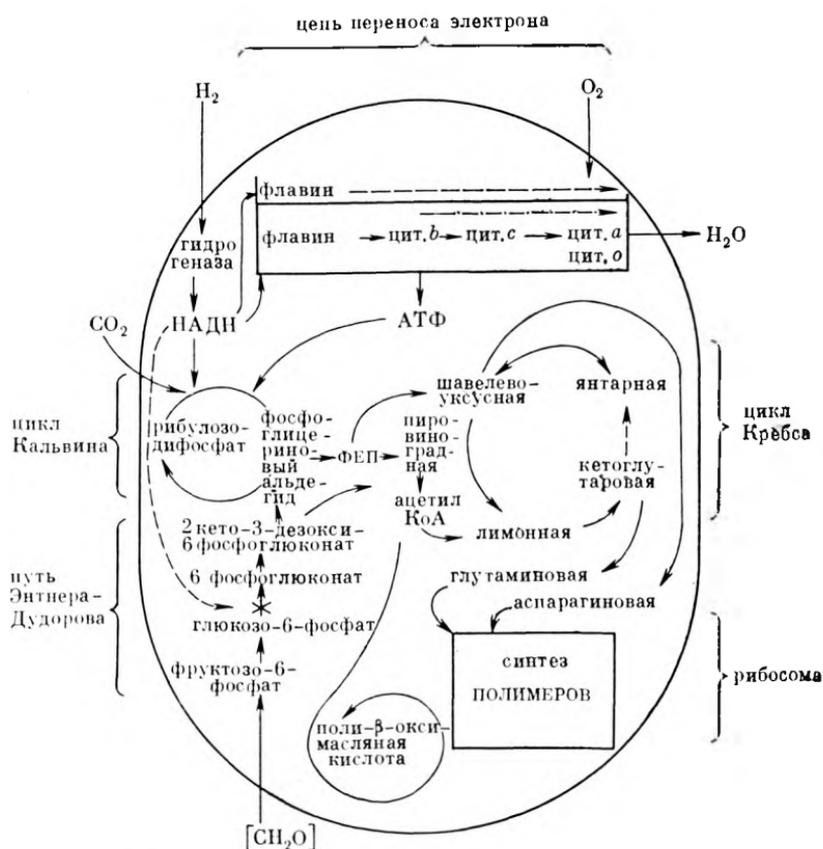


Схема 9. Обмен водородных бактерий

щаются в аминокислоты по обычным путям биосинтеза. В отсутствие аммония вместо вступления в цикл Кребса ассимилированная углекислота превращается в ацетил-КоА и полимеризуется в поли-β-оксималяную кислоту. Основной расход АТФ происходит при ассимиляции углекислоты в цикле Кальвина и при синтезе полимеров; реакции амфиболизма к расходу АТФ не ведут.

ОРГАНОТРОФНЫЙ РОСТ ВОДОРОДНЫХ БАКТЕРИЙ

Водородные бактерии отличаются гораздо большей лабильностью обмена, чем другие хемолитотрофные организмы. Помимо роста на минеральной среде под гремучей смесью, они могут использовать разнообразные органические вещества, в первую очередь органические кислоты и аминокислоты, в меньшей степени — и некоторые сахара. При органотрофном росте водородные бактерии неотличимы от обычных гетеротрофов, развивающихся в сточных водах, таких, как представители родов *Pseudomonas* и *Alcaligenes*. Все водородные бактерии — миксотрофы, и в этом отношении из литотрофов с ними сходны только некоторые тионовые бактерии. При переходе от литотрофного к гетеротрофному обмену в клетках происходит целый ряд изменений в энзиматическом аппарате. Уже в ранних работах было установлено, что клетки водородных бактерий, выросшие на органических веществах, лишь в слабой степени способны к окислению водорода и ассимиляции углекислоты. Таким образом, ключевые ферменты автотрофного способа существования — гидрогеназа и ферменты ассимиляции углекислоты — являются индуцируемыми. Точно так же при переходе от литотрофного к гетеротрофному росту индуцируются ферменты, необходимые для использования органических веществ.

В отсутствие углекислоты литотрофный и гетеротрофный рост могут быть альтернативами из-за «водородного эффекта». Автотрофно выращенные клетки Н-16 оказывались неспособными ассимилировать некоторые субстраты, если их инкубировали в атмосфере гремучего газа (Gottschalk, 1965). Блекколб (Blackkolb, Schlegel, 1968) нашел, что этот эффект наблюдается у 58 исследованных штаммов, включая *H. ruhlandii*, *H. eutropha* (штаммы Репаске, Н-1, Н-16, Н-20), и с такими субстратами, как фруктоза, глюконат, фумарат, цитрат, лейцин, изолейцин, изовалернат, аспарагин, гистидин, тирозин, фенилаланин, пролин. Этот эффект не наблюдается с такими веществами, как сукцинат, кротонат, пируват, лактат, триптофан, мочева кислота. Водородный эффект представляет катаболитную репрессию водородом — предпочтительным источником энергии для водородных бактерий. Торможение роста на фруктозе обуславливается репрессией синтеза ферментов пути Энтнера — Дудорова, по которому разлагают сахара водородные бактерии, и подавлением активности участвующих в разложении

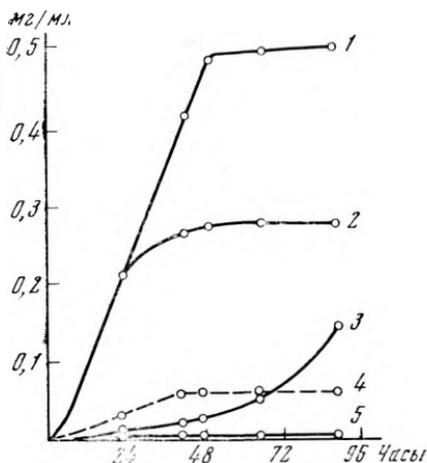


Рис. 15. Литогетеротрофный рост *Hydrogenomonas facilis* Z-56 в зависимости от добавления органических веществ и концентрации кислорода (Жилина, 1970б)

- 1 — дрожжевой экстракт 0,1%, кислород 17%; $H_2 + CO_2$;
- 2 — дрожжевой экстракт 0,1%, кислород 7%; $H_2 + CO_2$;
- 3 — без дрожжевого экстракта, кислород 6%; $H_2 + CO_2$;
- 4 — дрожжевой экстракт 0,1%, воздух;
- 5 — без дрожжевого экстракта, кислород 12%; $H_2 + CO_2$

фруктозы ферментов, по-видимому, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, причем вероятными эффекторами являются АТФ или НАДН. Диауксия при использовании водорода и органического субстрата описана у *H. eutropha* (Stukus, DeCicco, 1970). Литогетеротрофные водородные бактерии, т. е. такие организмы, которые могли быстро расти только в присутствии органического вещества, были выделены Жилиной (1970 а, б) из сточных вод и оказались принадлежащими к виду *Hydrogenomonas facilis*. Любопытным было отношение этих организмов к кислороду. В присутствии органического вещества рост начинается без фазы задержки при любой концентрации кислорода. В отсутствие органического вещества очень слабый рост после длительной фазы задержки начинался только при низких концентрациях кислорода менее 5% (рис. 15). По своему типу питания эти организмы аналогичны *Micrococcus denitrificans*.

ЛИЗИС ВОДОРОДНЫХ БАКТЕРИЙ

Наблюдая чашки, покрытые газоном водородных бактерий, иногда удается находить на них пятна, свободные от роста бактерий. Эти негативные колонии могут быть обусловлены деятельностью различных агентов.

В накопительных культурах водородных бактерий из сточных вод часто приходилось наблюдать крупные неправильной формы негативные колонии, вызванные выеданием газона жгутиконосцами из отряда *Protomastigina*. В таком литическом пятне сравнительно немногочисленные подвижные метаболические клетки жгутиконосцев располагаются по краю пятна. В жидких культурах они чаще встречаются в пленке водородных бактерий. При культивировании с перемешиванием жгутиконосцы не удерживаются в культуре.

Хищные бактерии типа *Bdellovibrio* были обнаружены на газонах *H. facilis* Z-56. Негативные колонии этих организмов появляются на газоне из убитых клеток водородных бактерий на 3—4-й день. Под микроскопом хищников можно отличить по оживленной подвижности мелких клеток, часто прикрепленных к пустым клеткам-теням водородных бактерий. Эти хищники неспецифичны и атакуют разные штаммы водородных бактерий.

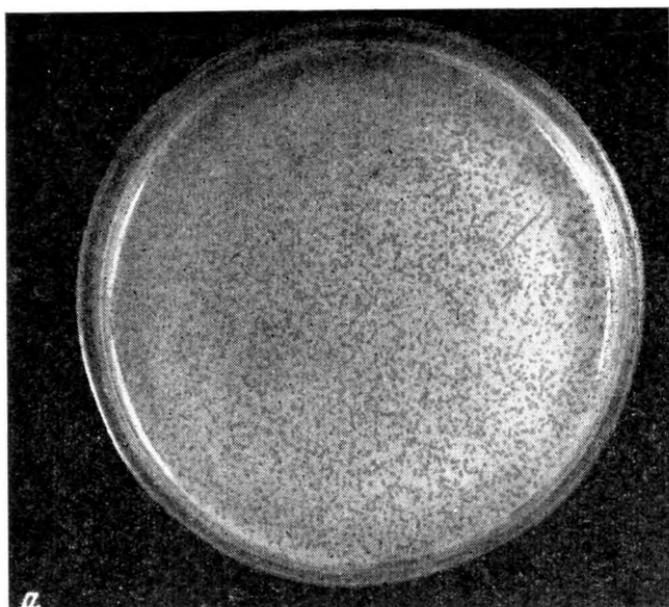
Специфические для видов водородных бактерий фаги были обнаружены у *H. facilis* (Pootjes, 1964; Pootjes et al., 1966) в условиях органотрофного роста. Выделенные фаги были идентичны по морфологии своих частиц, но различались по продолжительности латентного периода, урожайности, термоустойчивости. Не были они идентичны и серологически. Действие их в условиях автотрофного роста не было изучено.

Фаг, специфичный для штаммов *H. eutropha*, был выделен из образца перегнойной почвы, обогащенной смесью культур водородных бактерий, и из типовой культуры *H. eutropha* ATCC 17697 (Хавина и др., 1968; Савельева, 1968) (рис. 16, а, б). Фаг не лизировал *H. pantotropha*, *H. facilis*, *Achromobacter* sp. sp. По морфологии своих частиц фаг *Hydrogenomonas* Н-20 принадлежит к группе фагов, имеющих отросток сложного строения размерами $260 \times 1200 \text{ \AA}$ с базальной пластинкой и с фибриллами. Чехол отростка сократимый, состоит из субъединиц, собранных в спираль. Размеры головки фага гексагональной формы 1000 \AA . Фаг Н-20 лизирует чувствительные к нему культуры не только при гетеротрофном, но и при автотрофном росте. Основным фактором, определяющим лизис в минеральной среде для водородных бактерий, является недостаток ионов кальция и хлористого натрия. При внесении этих веществ удалось наблюдать образование негативных колоний фага на всех штаммах *H. eutropha*. Титр фага при росте хозяина в органотрофных условиях был довольно низким 10^4 — 10^5 и только у штамма ATCC 17697 достигал 10^9 — 10^{11} частиц/мл.

В культурах некоторых водородных бактерий происходит автолиз, но чаще лизис вызывают миксобактерии, которые легко загрязняют культуры и которых бывает очень трудно обнаружить. При развитии миксобактерий мутность суспензии бактерии-хозяина падает примерно до $1/2$ начальной и появляется неприятный запах. Лизис происходит под действием экзоферментов миксобактерий (Заварзин, Жиллина, 1971).

ВОЗМОЖНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВОДОРОДНЫХ БАКТЕРИЙ

Перспективы практического применения водородных бактерий заключаются в возможности их использования в биорегенеративных системах, где в сочтании с электролизом воды они могут заменить



a

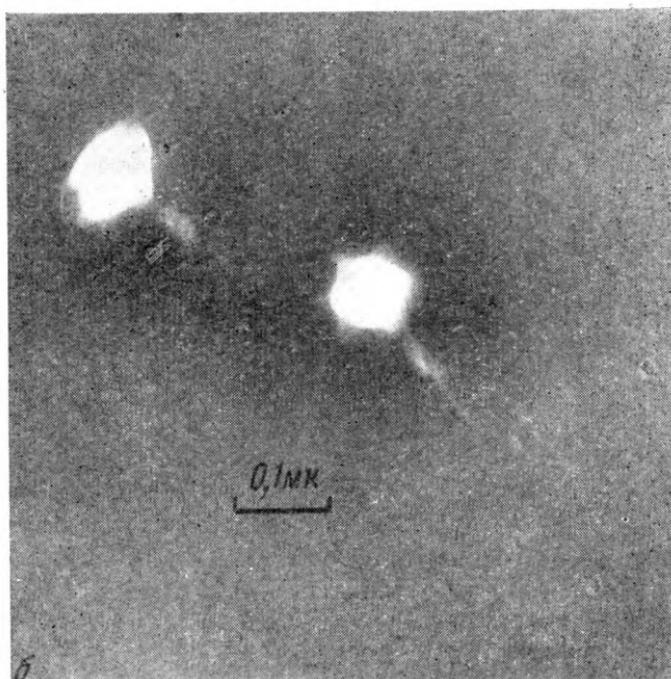
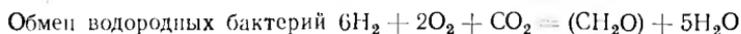
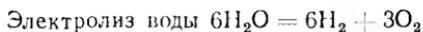


Рис. 16. Фаги *Hydrogenomonas cutropha* Z-1
a — негативные колонии фага; *б* — частицы фага

хлореллу, и в крупнотоннажном производстве бактериального белка.

При использовании водородных бактерий в биорегенеративных системах осуществляются следующие реакции:



Водородные бактерии используют водорода больше, чем следует по реакции гремучего газа на количество, эквивалентное ассимилированной ими углекислоте. Дыхательный коэффициент человека близок к единице. Таким образом, система электролиз воды — водородные бактерии — человек оказывается сбалансированной. Эксперименты и расчеты показали, что газовый баланс может быть сведен довольно точно: 200 г бактерий могут поглощать всю углекислоту, выделяемую человеком. Источником минерального питания для бактерий служит моча. При этом не сходится баланс только по азоту, которого бактериям недостаточно. Расчеты показывают, что энергетически водородные бактерии выгоднее фотосинтезирующих организмов в тех случаях, когда энергия поступает не в виде прямого солнечного света. Вес системы, обеспечивающей одного человека, оценивается примерно в 150 кг, из них 20 кг составляет вес суспензии бактерий (рис. 17).

Возможности использования биомассы водородных бактерий для питания (Покровский, 1971; Schlegel et al., 1969) обусловлены тем, что белки этих бактерий полноценны по аминокислотному составу и содержат достаточно триптофана и метионина. Белок бактерий животные усваивали несколько хуже, чем казеин. Неблагоприятным обстоятельством является общее для всех бактериальных белков высокое содержание нуклеиновых кислот. Запасное вещество водородных бактерий — полимер оксималяной кислоты — человеком и животным не используется из-за отсутствия соответствующей деполимеразы. Бактерии используют полимер медленно. Синтез полимера идет с высокой эффективностью в отношении использования водорода, и бактерии могут накапливать более 70% запасного вещества. При соблюдении правильного режима культивирования содержание полимера исчезающе мало.

Высокая скорость роста водородных бактерий делает их одним из перспективных возможных источников бактериального белка, который в случае необходимости можно было бы применять в кормовых целях. Скорость роста водородных бактерий превосходит скорость роста метанокисляющих, а плотность биомассы много выше, что позволяет эффективно использовать оборудование. Предполагаемая организация производства белка водородными бактериями связана с электролизом воды, так как организмы нуж-

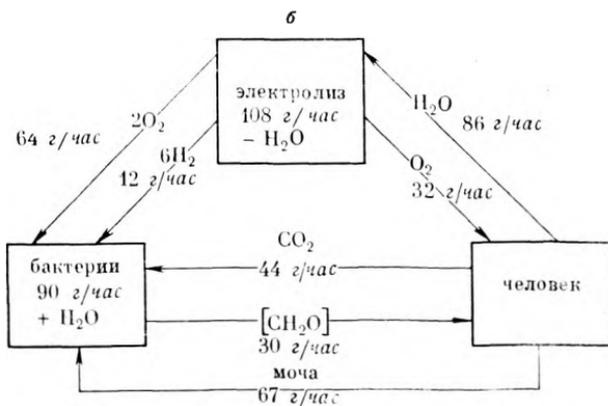
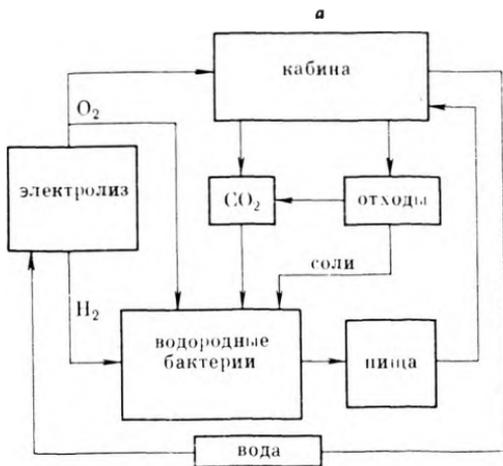


Рис. 17. Замкнутая система жизнеобеспечения человека водородными бактериями (Jenkins, 1965)

а — принципиальная схема; **б** — масс-потоки

даются в чистом водороде и кислороде. Ориентировочные расчеты дают выход менее 50 г сухого веса/квт-час (Schlegel, 1970). Использование для получения водорода конверсии природных газов, нефтяных остатков, бурого угля ограничено тем, что для бактерий требуется водород высокой чистоты, а при таком производстве водород обычно загрязнен окисью углерода (Нюффе, 1960), токсичной для водородных бактерий. Исследование возможности практического применения водородных бактерий сейчас проводится в СССР (*Hydrogenomonas* Z-1), США (*H. eutropha* ATCC 17697) и ФРГ (*Hydrogenomonas* H-16).

ОКИСЛЕНИЕ ОДНОУГЛЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ВОДОРОДНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Свособразный случай представляет использование микроорганизмами одноуглеродных соединений. Здесь имеют место два пути включения углерода: 1) в виде углекислоты через восстановительный рибулозодифосфатный цикл, 2) включение одноуглеродных соединений без окисления до CO_2 . Первый путь автотрофный, второй — гетеротрофный. Эти возможности реализуются не только у аэробных, но и анаэробных бактерий, в том числе и фотосинтезирующих.

Метанооксиляющие бактерии усваивают одноуглеродные соединения в виде формальдегида, используя свособразный цикл, в котором формальдегид присоединяется к рибозо-5-фосфату с образованием аллюлозо-5-фосфата; последний эпитермизуется во фруктозо-6-фосфат (Quayle, 1969). Благодаря использованию частично восстановленного одноуглеродного соединения — формальдегида, рибулозодифосфатный цикл шунтируется, и отпадает характерный для автотрофной ассимиляции углекислоты участок карбоксилазы рибулозодифосфата. Такой сокращенный рибозо-5-фосфатный цикл наблюдается у облигатных метилотрофов. Для окисления метана эти организмы имеют соответствующую оксигеназу (Whittenbury, 1969, Ribbons et al., 1970).

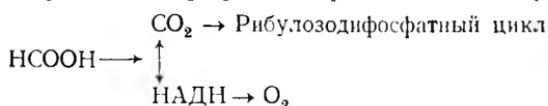
Некоторые микроорганизмы, растущие на метаноле или солях муравьиной кислоты, неспособны усваивать ни метан, ни водород. К ним относится прежде всего *Hyphomicrobium* и ряд организмов, обозначаемых *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Protaminobacter*, но в сущности плохо определенных. У этих организмов включение одноуглеродных соединений идет через образование серина, но остается неизвестным, каким образом замыкается цикл, чтобы обеспечить синтез всех компонентов клетки из одноуглеродного соединения. Оба пути усвоения одноуглеродных соединений указывают на гетеротрофный тип обмена. Организмы этой группы — почкующиеся бактерии или близкие к ним.

Более окисленные, чем формальдегид одноуглеродные соединения при включении в тело клетки должны быть восстановлены. При этом возможны два пути: 1) прямое восстановление муравьиной кислоты или окиси углерода; 2) окисление их до углекислоты и включение через рибулозодифосфатный цикл. Автотрофный путь наиболее вероятен для водородных бактерий, учитывая что и муравьиная кислота и окись углерода дают водород и углекислоту.

Поскольку все штаммы активно растущих водородных бактерий, в отличие от малоактивных, способны расти на формиате как единственном источнике углерода и энергии, в нашей лаборатории было предпринято более подробное исследование пути усвоения формиата водородными бактериями (Намсараев и др., 1971). Рост *H. eutropha* Z-1 с формиатом идет медленно и быстро

прекращается вследствие резкого подщелачивания среды. Периодически добавляя муравьиную кислоту, можно было добиться удовлетворительного урожая. Карбоксилирование рибулозодифосфата в бесклеточных экстрактах клеток, выращенных на формиате, было в 6 раз меньше, чем в экстрактах автотрофно выращенных клеток и в 13 раз выше, чем в клетках, выращенных на сукцинате. Эта активность вполне достаточна для обеспечения невысокой скорости роста, наблюдаемой на формиате. Для определения способности организма разлагать формиат с выделением водорода опыты проводили в сосуде, присоединенном к газовому хроматографу. Суспензию клеток продували газом-носителем — азотом высокой чистоты, затем шприцем вводили через резиновую мембрану раствор формиата. После 0,5—1 час. инкубирования выдували газ в колонку. Контрольные определения с суспензией *E. coli* показали, что даже при коротких экспозициях выделение водорода легко обнаруживается. Водородные бактерии, напротив, в этих условиях водорода не выделяли. В присутствии формиата бесклеточные препараты *H. eutropha* Z-1 восстанавливали НАД, что служит указанием на присутствие формиатдегидрогеназы.

Обмен водородных бактерий при использовании формиата можно обозначить как органоавтотрофный и представить следующей схемой:

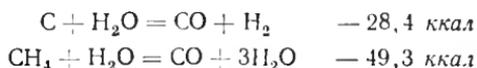


Такой же тип обмена был установлен у *Pseudomonas oxalaticus*, который, однако, не использует водород (Quayle, 1961). Способность окислять формиат широко распространена у различных автотрофных (*Nitrobacter*, *Micrococcus denitrificans*) и гетеротрофных бактерий. Из анаэробных бактерий формиат хорошо используют сульфатвосстанавливающие и метанобразующие; для обеих групп формиат можно рассматривать как предшественник водорода, который они получают из него.

Если муравьиная кислота является продуктом широко распространенных нормальных брожений, то соответствующая ей по уровню восстановленности окись углерода образуется преимущественно небиологическим путем. Она является продуктом неполного окисления топлив. В атмосфере окись углерода не накапливается. При низких температурах равновесие реакции



сдвинуто в сторону образования водорода, но скорость реакции мала. В промышленности водород получают путем взаимодействия водяного пара с топливом по реакциям:



Во всех случаях образующийся «водяной газ» имеет в своем составе окись углерода. От нее освобождаются, конвертируя окись углерода с водяным паром над железным катализатором при 400—500°, когда достигается достаточная скорость процесса.

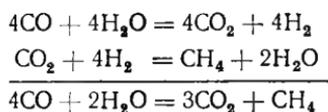
Окисление окиси углерода микроорганизмами было установлено в начале этого века, одновременно с открытием микроорганизмов, окисляющих водород. Окись углерода исчезала из газовой смеси при контакте ее с почвой, сточными водами и другими естественными субстратами как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В чашках с агаром, помещенных в атмосферу окиси углерода и воздуха, выросли колонии микроорганизмов, из которых Бейеринк выделил организм, названный им *Bacillus oligocarbophilus*. В описанных условиях наблюдается разнообразная микрофлора, живущая частично за счет использования органических веществ воздуха, в особенности образующихся при сгорании метана, частично за счет медленного использования агара. При той низкой скорости роста, которая характерна для олигокарбофилов, нужно предпринимать чрезвычайные предосторожности, чтобы избежать адсорбции органического вещества из воздуха. В микробиологической литературе периодически появляются сообщения о росте микроорганизмов без видимых источников углерода и энергии, чаще всего в дистиллированной воде. Скорость роста при этом мала, а конечная концентрация ниже 10^6 клеток/мл. Поэтому сейчас не представляется возможным определить, с какими именно организмами имели дело авторы этих ранних работ.

Более подробно Кистнером был исследован *Hydrogenomonas carboxydovorans* (Kistner, 1953, 1954). Организм был выделен из воды очистных сооружений на минеральной среде, к которой добавляли сточную жидкость. *H. carboxydovorans* был типичной псевдомонадой, использовавшей органические кислоты и кроме окиси углерода мог окислять и водород. Кистнер показал, что организм, выращенный на среде с лактатом или в атмосфере водорода, адаптируется к окислению CO, в то время как организм, выращенный в атмосфере окиси углерода, окисляет водород без периода адаптации. Стехиометрия реакции соответствовала уравнению



Результаты опытов Кистнера не удалось воспроизвести ни с оригинальной культурой, ни с аналогичными культурами, выделенными позднее (Davis et al., 1969, 1970; Schlegel, 1970). Культуры псевдомонад, выделенные в нашей лаборатории, росли в атмосфере с угарным газом только при добавлении небольшого количества органического вещества. Кроме этих псевдомонад, в присутствии угарного газа могут расти и миксобактерии и актиномицеты, так что, несмотря на свою ядовитость, угарный газ не подавляет роста многих организмов.

Как известно, окись углерода является мощным ингибитором железосодержащих ферментов, в первую очередь цитохромоксидазы. На свету соединение окиси углерода и гемопротенда диссоциирует, поэтому не удивительно, что многие фотосинтезирующие и лишённые цитохромоксидазы анаэробные организмы способны окислять угарный газ. В первую очередь это относится к метанобразующим бактериям. Чистые культуры метанобразующих бактерий (см. главу 3) используют окись углерода по реакциям:



Methanosarcina barkerii могла расти в атмосфере чистой окиси углерода, а *Methanobacterium formicicum* выдерживала только 14%. Ферментативное окисление CO бесклеточными препаратами *Desulfocivibrio* также было показано (см. главу 4). Из фотосинтезирующих организмов быстрое превращение в углекислоту окиси углерода наблюдается при освещении культур хлореллы. Хирш (Hirsch, 1968) нашел штамм *Rhodospseudomonas* sp., который рос за счет окиси углерода как восстановителя. Им было высказано предположение, что рост микроорганизма в атмосфере, содержащей CO, возможен на свету, так как при этом происходит диссоциация комплекса с гемопротендом.

Выделить чистую культуру организма, который рос автотрофно за счет угарного газа, недавно удалось в нашей лаборатории (Санжиева, Заварзин, 1971). Организм был выделен из сточных вод после длительного культивирования накопительной культуры на минеральной среде в смеси окиси углерода и воздуха. Чистая культура была получена путем выделения очень мелких росинчатых колоний на агаре. После серии пересевов на жидкой минеральной среде и выделения отдельных колоний удалось получить культуру, которая росла в атмосфере 70% CO + 20% O₂ + 10% CO₂. Организм плохо рос на агаре, что можно было использовать для проверки чистоты.

Организм полиморфен и представляет собой мелкую 0,3×0,6—1,2 мк палочку, часто изогнутую, для которой характерно образование розеток (рис. 18). В таких розетках клетки соединены одним полюсом, на котором происходит выделение прикрепительного материала. Дочерние подвижные клетки образуются на свободном конце. Они обычно короче и круглее материнских, оживленно подвижны благодаря одному субтерминальному жгутику; на поздних стадиях развития — перитрихи. На картофельном агаре образуются мелкие бесцветные слизистые колонии, штрих беловатый. На агаризованной минеральной среде — рост такого же вида и точно так же явно угнетенный. На жидкой минеральной среде в каче-

стве единственного источника углерода и энергии может использовать рибозу и соли янтарной, яблочной, уксусной, пировиноградной, винной кислот. На муравьиной кислоте рост плохо воспроизводимый. Глюкоза, сахароза, фруктоза, мальтоза, ксилоза, галактоза, арабиноза, щавелевая, лимонная, бензойная кислоты, метанол, этанол, глицерин, маннит, аминокислоты не использовались.

В автотрофных условиях организм способен расти как в атмосфере водорода, углекислоты и кислорода, так и в смеси окиси углерода и кислорода.

В атмосфере водорода, кислорода и углекислоты организм рос так же, как обычные водородные бактерии, достигая урожая 3 г/л. Рост в атмосфере угарного газа, кислорода и углекислоты был в 30 раз медленнее, однако примесь 20% CO в водороде не задерживала роста, ингибирующее влияние CO начинало проявляться с более высоких концентраций (рис. 19). Организм обладал активной карбоксилазой рибулозодифосфата. Цитохромная цепь включала

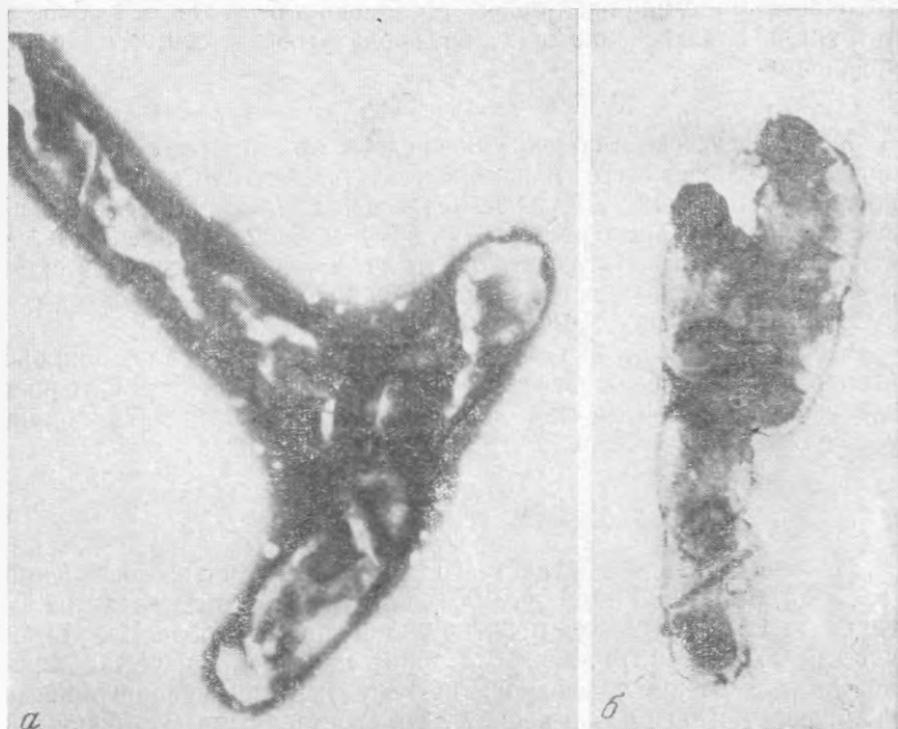


Рис. 18. *Seliberia carboxydohydrogena* Z-1062

Негативная окраска фосфовольфрамовой кислотой. а — поверхность соединенных прикрепительным материалом клеток имеет винтовую скульптуру; б — видны шапочки прикрепительного материала на полюсе клетки

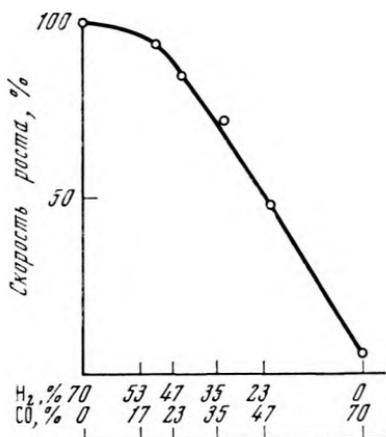


Рис. 19. Зависимость скорости роста *Seliberia carboxydohydrogena* от содержания H₂ и CO в газовой фазе при концентрации O₂ 20%, CO₂ 10%

цитохромы *b* и *c*, широкая полоса поглощения была также в области цитохрома *a*. Окисление окиси углерода в общем соответствовало уравнению



Морфологически и по росту на средах с органическим веществом организм ближе всего напоминает *Agrobacterium stellatum*, но поскольку в группе *Agrobacterium* — *Rhizobium* — *Seliberia* первые два рода связаны с растениями, а вид *A. stellatum* предлагается исключить из рода *Agrobacterium*, то возможным таксономическим решением оказывается выделение CO-окисляющего организма в самостоятельный вид *Seliberia carboxydohydrogena*.

Если способность использовать муравьиную кислоту широко распространена среди известных видов водородных бактерий, то рост за счет угарного газа, как показали работы нашей лаборатории, также оказался достаточно частым явлением.

ВОДОРОДНАЯ ДЕНИТРИФИКАЦИЯ

Из рассмотрения диаграммы состояний азотистых соединений (рис. 20) (Pourbaix, Zoubov, 1963) следует, что область устойчивости газообразного азота практически совпадает с областью устойчивости воды, и нитрат может заменять кислород в качестве окислителя для микроорганизмов; поэтому денитрификацию иногда называют нитратным дыханием. Промежуточными устойчивыми соединениями при этом могут быть нитрит-ион и N₂O. В природных условиях денитрификация начинается при некотором критическом давлении кислорода, которое легко достигается локально в почве (Корсакова, 1941; Meiklejohn, 1940; Harmsen, Kolenbrander, 1965). Денитрификация, как и нитрификация, подавляется при pH ниже

4,0, при котором, как видно из диаграммы (рис. 20), появляется недиссоциированная азотистая кислота, представляющая собой сильный яд.

Образование аммония микроорганизмами в анаэробных условиях отмечалось многими авторами, и обычно трактуется как результат ассимиляторного усвоения азота. Отметим, что при крайне низких значениях потенциала возможно образование аммиака как термодинамически выгодный процесс, но для большинства значений потенциала более вероятно окисление аммиака (Pichinoty, D'Ornano, 1961 b; Woldendorp, 1962). В почвах, богатых закисным железом, возможно химическое восстановление нитрата в аммиак (Sreenivasan, Subrahmanyam, 1934, 1935), которое иногда рассматривается как путь анаэробного окисления железа микроорганизмами.

Помимо восстановления нитратов органическими соединениями, которое наблюдается у большого числа микроорганизмов, существует

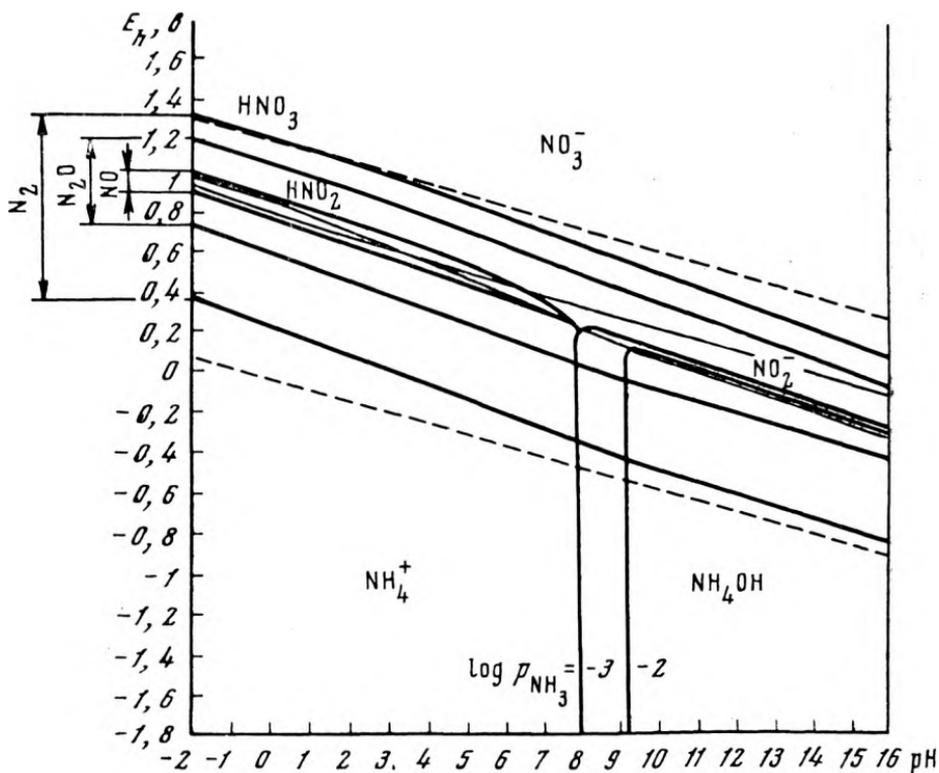


Рис. 20. Поля устойчивости соединений азота, важных при денитрификации, в координатах E_h — pH (Pourbaix, de Zoubov, 1963)

Парциальное давление NH_3 , N_2 , N_2O , NO относится к раствору, содержащему 1 г-атом азота в 1 л. Пунктир — поле устойчивости воды

вует несколько бактерий, способных к восстановлению нитратов неорганическими донорами электрона. Восстановителями могут служить водород и соединения серы. Такие организмы были выделены и довольно подробно изучены. Микроорганизмы, восстанавливающие нитраты за счет соединений серы, относятся к виду *Thiobacillus denitrificans*, представляющему сборную группу различных по обмену микробов.

Способность к денитрификации за счет молекулярного водорода начали искать уже в начале работ с водородными бактериями. Казерер (Kaserer, 1906) не нашел ее у *Hydrogenomonas pantotropha*. Лебедев (1910), доказав газовыми анализами водородную денитрификацию у выделенного им организма, способного так же развиваться в атмосфере гремучего газа и расти гетеротрофно, не оставил описания, достаточного для уверенной идентификации бактерии, с которой он работал. Денитрифицирующий *Hydrogenomonas agilis* (Niklewski, 1914) представлял собой тонкую весьма подвижную палочку, образовавшую плотную пленку на поверхности среды и способную к росту: 1) в атмосфере гремучего газа, 2) в присутствии водорода и нитрата, 3) к гетеротрофному росту. Повторно этот организм пока никем не выделен. Способность восстанавливать нитрат водородом была обнаружена в нефизиологических опытах у различных микроорганизмов — *Aerobacter aerogenes*, *Desulfotribrio*.

Выделить микроорганизм, способный расти за счет окисления водорода нитратом, удалось Клюйверу и Верховену (Verhoeven et al., 1954; Клюйвер, 1959). Микроорганизм оказался литогетеротрофом, нуждающимся для роста не только в водороде, нитрате и углекислоте, но и в органических веществах, которые обеспечивали биосинтетические пути обмена. Идентификация организма привела к *Micrococcus denitrificans*, который за 40 лет до этого был выделен Бейеринком (Beijerinck, Minkman, 1910). Оба штамма оказались идентичными. Впоследствии этот организм выделяли несколько авторов (Chang, Morris, 1962; Vogt, 1965).

M. denitrificans исследован разносторонне в серии микробиологических и биохимических работ, представляя исключительный пример лабильности обмена. Таксономическое положение организма не соответствует его морфологии. Поэтому было предложено образовать новый род граммотрицательных кокковидных неподвижных бактерий (Kosug et al., 1968). Формально это предложение было внесено Дэвис с соавторами (Davis et al., 1969), которые дали роду название *Paracoccus*.

M. denitrificans представляет собой граммотрицательный неподвижный кокк диаметром 1 мк, который размножается делением пополам, образуя диплококки. В культуре наблюдаются также веретеновидные или каплевидные клетки, иногда даже палочки с преломляющими свет полярными тельцами. Морфология организма сильно варьирует в зависимости от условий культивирования.

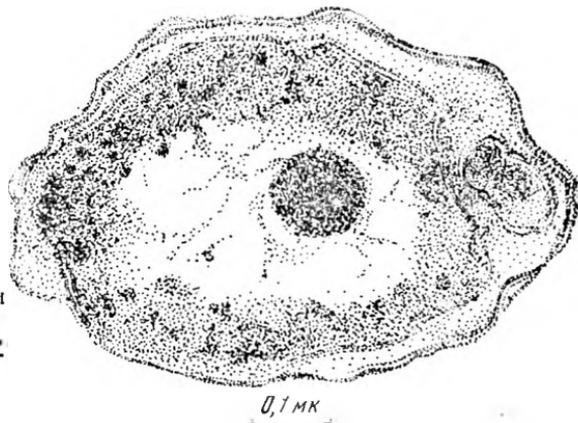


Рис. 21. Строение клетки *Micrococcus denitrificans*

Схематизировано по фотографии (Kokug et al., 1968)

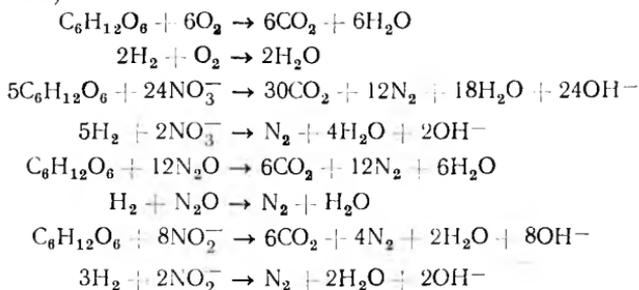
Наблюдение под контролем глаза за развитием микрокультуры убедило, что все эти формы могут быть потомками одной клетки (Vogt, 1965). Электронномикроскопическое исследование показало, что это типичный грамотрицательный микроорганизм, размножающийся делением и по своей структуре не имеющий сходства с *Thiobacillus novellus* (Kosig et al., 1968) (рис. 21). По составу азотистых оснований ДНК он близок к другим грамотрицательным микроорганизмам: ГЦ 65—67 мол. %.

Колонии организма на пептонном агаре или среде с глюкозой и нитратом гладкие, блестящие. В МПБ образует муть. Один из штаммов разжижал желатину, другой — нет. Организм может использовать ряд органических веществ; иногда, однако, требуется длительная адаптация. Очень хороший рост наблюдали на средах с глюкозой, фруктозой, глицерином, этанолом, изопропанолом, фумаровой, яблочной, молочной, гликолевой, аспарагиновой, кротоновой кислотами; несколько хуже культуры росли на средах с галактозой, маннитом, янтарной кислотой. Умеренный рост был на рибозе, пировиноградной и муравьиной кислотах. Роста не было на сорбозе, лактозе, арабинозе, сорбите, метаноле, щавелевой, изовалериановой, изомаляной, масляной, пропионовой кислотах и гликоколе.

Оптимальная температура для роста между 35 и 40°, оптимум рН около 7,5 с пределами от 6,5 до 7,8. Организм накапливает до 63% полимера β-оксимасляной кислоты.

Наибольший интерес представляет способность этого организма использовать в качестве энергетического процесса для роста все возможные комбинации, которые дают доноры электрона, — органические вещества (например, глюкоза) или молекулярный водород, и акцепторы электрона — кислород, нитрат, нитрит, веселя-

щий газ (рис. 22):



M. denitrificans был использован Клейвером как модель адаптации микроорганизма к различным субстратам. Как и другие денитрифицирующие бактерии, *M. denitrificans* может использовать в качестве акцептора электрона нитрит и закись азота (N_2O), к которым он адаптируется при росте на нитрате, так как эти соединения являются промежуточными продуктами восстановления нитрата (Pichinoty, D'Ognano, 1961 a, b; Vogt, 1965). Нитрит восстанавливается с образованием азота быстрее, чем нитрат, но скорость потребления водорода суспензией бактерий ниже в присутствии нитрита, чем нитрата, что связано с тормозящим действием N_2O на гидрогеназу. Организм обладает возможностями адаптироваться к любому из использованных доноров и акцепторов электрона, но

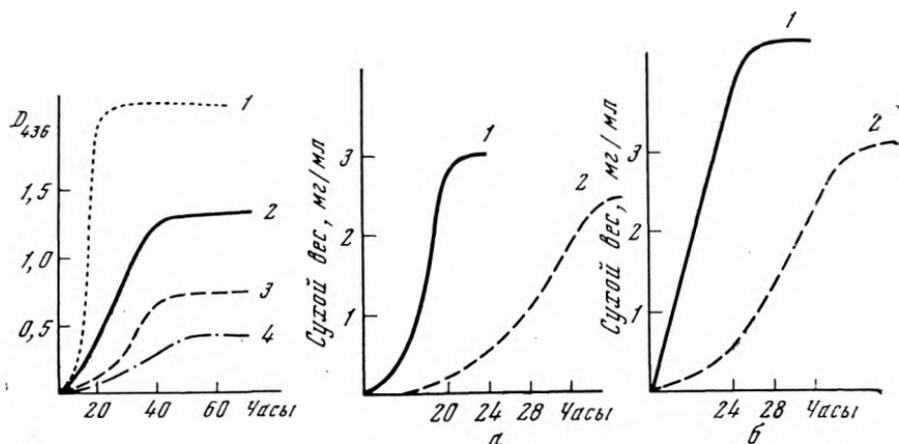


Рис. 22. Рост *Micrococcus denitrificans* в зависимости от условий культивирования (Vogt, 1965)

1 — аэробно с глюкозой; 2 — анаэробно, глюкоза + нитрат; 3 — аэробно, $\text{H}_2 + \text{CO}_2 +$ нитрат; 4 — анаэробно, $\text{H}_2 + \text{CO}_2 +$ нитрат

Рис 23. Рост *Micrococcus denitrificans* с различными источниками азота (Chang, Morris, 1962)

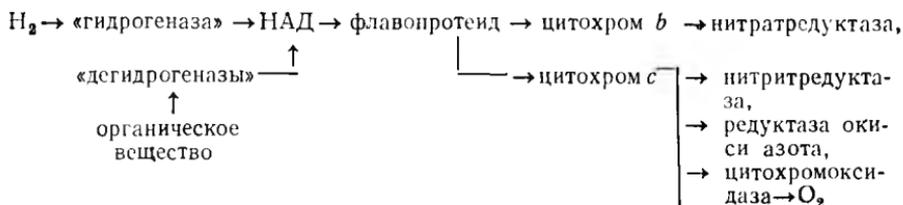
а — единственный источник азота — нитрат; б — источник азота — аммоний; 1 — аэробно; 2 — анаэробно

эта адаптация быстрее всего идет к органическому веществу и кислороду и медленнее — к водороду.

В восстановлении нитрата микроорганизмами следует различать два пути: 1) ассимиляционный, который ведет к NH_2 -группам органических соединений, и 2) дыхательный, или диссимиляционный, который ведет к молекулярному азоту. Оба эти пути не обязательно совпадают у одних и тех же организмов. Не только большинство бактерий, использующих нитраты, неспособны к денитрификации, но и многие денитрифицирующие бактерии неспособны использовать нитрат для ассимиляции. Эта особенность, обнаруженная еще Буткевичем, свойственна и обоим литотрофным денитрификаторам *Thiobacillus denitrificans* и *Micrococcus denitrificans* (Baalsrud, Baalsrud, 1954; Chang, Morris, 1962). Оба эти организма плохо растут на среде без аммония (рис. 23).

Первый этап восстановления нитрата приводит к нитриту. Есть две нитратредуктазы А и В, отличающиеся своим отношением к ClO_3^- . Нитратредуктаза А, которая есть и у *M. denitrificans* и у *T. denitrificans*, использует ClO_3^- как субстрат, нитратредуктазу В ClO_3^- угнетает (Pichinoty, Piechaud, 1968). В анаэробных условиях экстракты *M. denitrificans*, содержащие нитратредуктазу А, катализируют окисление НАДН, но не НАДФН. В присутствии O_2 восстановление NO_3^- подавляется на 60%. Энергия, освобождающаяся при окислении НАДН, теряется для организма, если не происходит передачи на промежуточные переносчики электрона.

Расхождение между ассимиляционным и дыхательным путем восстановления нитрата во всяком случае происходит после образования нитрита. Ассимиляционный путь может требовать для своего действия присутствия флавинов и ионы металлов. Исследуя окисление нитрита *M. denitrificans*, Лем и Николас (Lam, Nicholas, 1969) нашли, что нитритредуктаза и цитохром с оксидаза не разделяются даже при тщательной очистке. Вероятно, фермент состоит из комплекса цитохромов с и a_2 , которые оба вовлекаются в перенос электрона и с O_2 и с нитритом. Нитритредуктазная и цитохромоксидазная активность различным образом реагируют на изменение условий. Дальнейший путь восстановления нитратов в молекулярный азот у *M. denitrificans* не изучен детально, но, по-видимому, не отличается от пути, установленного для других денитрификаторов, где в качестве промежуточных продуктов появляются окислы азота (Matsubara, Mori, 1968). Путь переноса электрона при денитрификации может быть схематизирован следующим образом:



Близость потенциалов нитрата и кислорода позволяет использовать практически одинаковую цепь переноса электрона, различающуюся лишь терминальным участком. Относительно цепи переноса электрона у *M. denitrificans* имеются некоторые расхождения, касающиеся цитохрома a_3 , который не был обнаружен одними авторами (Asano et al., 1967a, b; Imai et al., 1967, 1969) и найден другими вместе с цитохромом o (Scholes, Smith, 1968 b). При анаэробном росте с нитратом как акцептором электрона и сукцинатом или донорами, связанными с НАД, было найдено фосфорилирование с высоким отношением Р/О или Р/нитрат (Knobloch et al., 1971). При литотрофном росте *M. denitrificans* как водородной бактерией в атмосфере водорода и воздуха бесклеточные препараты имели высокое отношение Р/О порядка 0,6—1,6 для водорода, 0,4—1,2 для окисления НАДН и 0,7—1,0 для сукцината. Окислительное фосфорилирование подавлялось низкими концентрациями разбавителей, не влиявшими на скорость окисления субстрата, причем, очевидно, в клетке действуют все три точки сопряжения переноса электрона с фосфорилированием. Водород, однако, по мнению авторов, может вступать в цепь переноса на разных уровнях: НАД, цитохромов b и c и флавопротенда. Однако при росте на сукцинате III место фосфорилирования может теряться, как оно теряется при анаэробном росте с нитратом. Авторы суммируют перенос электрона у *M. denitrificans* при автотрофном росте следующей схемой:



Кроме того, у *M. denitrificans* был обнаружен цитохром b способный к самоокислению, который, по-видимому, может переносить электроны непосредственно на нитрат. Таким образом, в бесклеточных экстрактах *M. denitrificans* обнаружили ряд параллельных путей переноса электрона. Переход организма от одного способа существования к другому сопровождается не только качественной перестройкой терминальных участков цепи, но и количественным изменением содержания промежуточных переносчиков. При переходе к анаэробному росту с нитратом уменьшалось количество цитохрома a и возрастало количество цитохромов c и b . Несмотря на высокую скорость переноса электрона, восстановление компонентов цепи лимитировалось тем, что и сукцинатоксидаза и НАДН-оксидаза взаимодействовали с одними и теми же цитохро-

мами (Scholes, Smith, 1968 a,b). Все цитохромы при аэробном росте были локализованы в мембранах. В целом цитохромная цепь весьма напоминала митохондриальную.

Своеобразен и углеродный обмен *M. denitrificans*. Он явился первым примером литогетеротрофных организмов, которые получают энергию от окисления неорганического субстрата, но растут за счет органического вещества. Клюйвер и его сотрудники именно исходя из этого предположения и выделили *M. denitrificans*.

Исследование способности этого организма к ассимиляции углекислоты показали, что он совершенно бесспорно обладает всеми необходимыми ферментами и в автотрофных условиях осуществляет ассимиляцию углекислоты через восстановительный пентозофосфатный цикл (Kornberg et al., 1960). Потребности этого организма в органических веществах не была обоснована потребностью в витаминах, так как при гетеротрофном росте организм не нуждался в них, а дрожжевой экстракт мог быть заменен гидролизатом казеина. Причиной необычно медленного роста в строго автотрофных условиях, вероятно, была малая мощность системы, фиксирующей углекислоту, всего $0,26 \cdot 10^{-9}$ моля CO_2 /час/мг белка, по сравнению с величинами порядка $13 \cdot 10^{-9}$ у истинных водородных бактерий. В присутствии дрожжевого экстракта способность к фиксации углекислоты возрастала и составляла уже $3,42 \cdot 10^{-9}$. При этом 38% углерода клетки поступало из углекислоты, а дрожжевой экстракт использовался полностью для синтеза клеточного тела. Банерджи и Шлегель (Banerjee, Schlegel, 1966) полагают, что автотрофный рост *M. denitrificans* был ограничен неактивностью ключевых ферментов цикла Кальвина, в частности, карбоксилазой рибулозодифосфата. Около 50% углерода углекислоты поступало через другие пути карбоксилирования, возможно, через образование малата и пирувата из углекислоты. Эти результаты отчетливо показывают, что одно только присутствие ферментов восстановительного пентозофосфатного цикла не гарантирует способности организма к быстрому автотрофному росту.

Обмен углерода у *M. denitrificans* осуществляется с участием системы гликолатного цикла (Kornberg, Morris, 1968). Организм обладает также всеми ферментами орнитинового цикла (Hiort et al., 1967).

Интересно, что несмотря на такую универсальность биохимических потенций, организм, по-видимому, конкурентоспособен лишь в гетеротрофных условиях. При органотрофном росте в анаэробных условиях можно сравнивать факультативных и облигатных денитрификаторов. У первых нитрат не представляет необходимого компонента среды при анаэробном росте, в отсутствие его они могут переходить на брожение, как например *Aerobacter aerogenes*. Напротив, облигатные формы, такие как *M. denitrificans*, в отсутствие нитрата не могут расти анаэробно. Оказалось, что эти особенности коррелируют с метаболическими путями использования

органических соединений. У *M. denitrificans* цикл Кребса играет роль терминального окисления при росте на среде с нитратом, в то время как у *A. aerogenes* он работает циклически только при росте в аэробных условиях. При использовании глюкозы единственным путем ее окисления у *M. denitrificans* является путь Энтнера — Дудорова, в то время как у *A. aerogenes* во всех условиях роста функционируют ферменты гликолиза и гексозомонофосфатного шунта, но в анаэробных условиях работает только гликолитический путь (Forget, 1968).

Обмен *M. denitrificans* суммирован на схеме 10. Водород поступает, как и у других водородных бактерий, на уровне НАД, но может восстанавливать и другие переносчики. Акцептором электрона может служить либо кислород, и тогда сохраняются все три места фосфорилирования, либо нитрат, тогда сохраняются только два

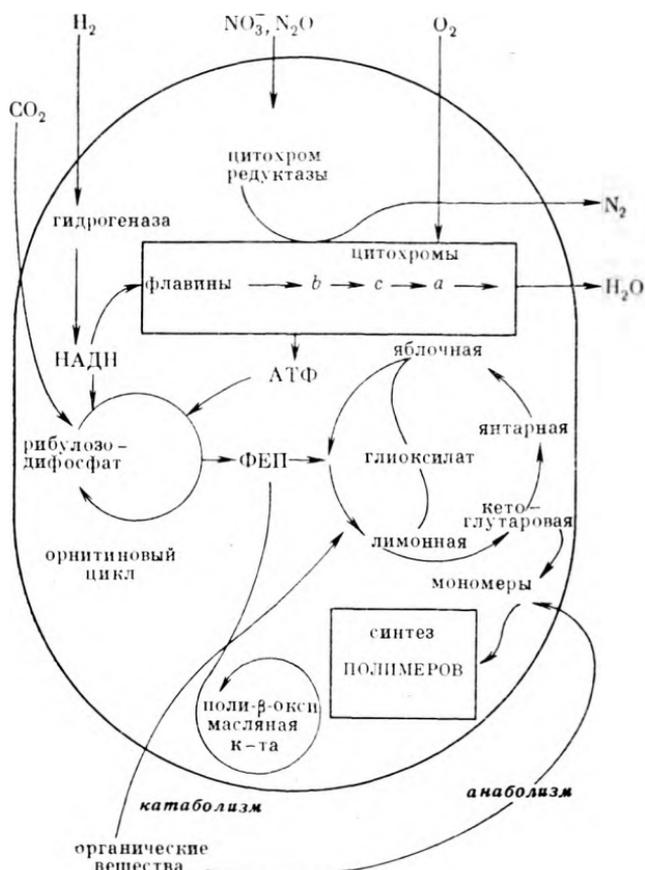


Схема 10. Обмен *Micrococcus denitrificans*

места фосфорилирования. У организма есть цикл Кальвина, но он недостаточен для того, чтобы обеспечить рост организма без экзогенных органических веществ. У организма установлен глиоксилатный шунт, обеспечивающий действие цикла Кребса при извлечении органических кислот для синтеза мономеров.

Таким образом, для обмена органических веществ есть два пути: анабиотический и катаболический. Обмен *M. denitrificans* служит примером литогетеротрофного типа питания, характерного для бактерий-анаэробов.

ЛИТЕРАТУРА

- Беляева М. И. 1950. Физиология и экология водородных бактерий. Докт. дисс. Казань.
- Веденина И. Я. 1968. Автотрофная ассимиляция углекислоты водородными бактериями *Hydrogenomonas* Z-1. М. Канд. дисс.
- Воронин Г. Н., Поливода А. И. 1967. Жизнеобеспечение экипажей космических кораблей. М., Машиностроение.
- Жилина Т. Н. 1968. Тонкое строение миксобактерии *Archangium* Z-8. — Микробиол., 37, 903.
- Жилина Т. Н. 1970а. Выделение литогетеротрофной водородной бактерии. — Микробиол., 39, 813.
- Жилина Т. Н. 1970б. Литогетеротрофный рост *Hydrogenomonas* Z-56. — Микробиол., 39, 933.
- Заварзин Г. А. 1969. Несовместимость признаков и теория биологической системы. — Журн. общ. биол., 30, 33.
- Заварзин Г. А., Жилина Т. Н. 1971. Миксобактерии в культурах водородных бактерий. — Микробиол., 40, 407.
- Ишменецкий А. А. 1967. Биологический круговорот водорода. — Вестник АН СССР, 6, 39.
- Ноффе В. Б. 1960. Основы производства водорода. Л., Гостоптехиздат.
- Клюйвер А. Я. 1959. Гибкость проявлений жизни. Адаптация микробов. — В кн.: Клюйвер А. Я., ван Ниль К. Б. «Вклад микробов в биологию». М., ИЛ.
- Корсакова М. П. 1941. Влияние аэрации на процесс восстановления нитратов. — Микробиол., 10, 163.
- Красильников И. А. 1949. Определитель бактерий и актиномицетов. — М.—Л., Изд-во АН СССР.
- Лебедев А. Ф. 1910. Исследование хемосинтеза у *Bacillus hydrogenes*. Одесса.
- Лисенкова Л. Л. 1967. Сравнительное количественное изучение цитохромов хемосинтезирующих и гетеротрофных микроорганизмов. М., Канд. дисс.
- Мошковский Ю. Ш., Макаров Е. Ф., Заварзин Г. А., Веденина И. Я., Марданян С. С., Гольдманский В. И. 1966. Применение эффекта Мессбауэра для изучения состояния Fe^{57} в водородных бактериях *Hydrogenomonas* Z-1. — Биофизика, 2, 57.
- Налмариев Б., Пожевникова А. К., Заварзин Г. А. 1971. Потребление формиа-та водородными бактериями. — Микробиол., 40, 772.
- Покровский А. А. 1971. Белки одноклеточных. М., Главмикробиопром.
- Пономарев П. И., Рубцов И. Д., Войтович Я. В. 1969. Установка для непрерывного культивирования водородных бактерий. — В кн.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. II Всесоюз. совещание. Красноярск, стр. 87.
- Романова А. К., Веденина И. Я., Пожевникова А. Н. 1970. Исследование продуктов кратковременного хемосинтеза и некоторых ферментов восстановительного пентозофосфатного цикла у водородных бактерий. — Микробиол., 39, 557.

- Савельева Н. Д. 1968. Сравнительное изучение водородных бактерий. М. Канд. дисс.
- Савельева Н. Д., Жилина Т. П. 1968. К систематике водородных бактерий. — Микробиол., 37, 84.
- Савельева Н. Д., Заварзин Г. А., Веденина И. Я. 1971. Водородные бактерии. — Успехи микробиол., 7, 121.
- Санжиева Э. У. 1970. Миксобактерии в культуре СО-окисляющих организмов. — Микробиол., 39, 817.
- Санжиева Э. У., Заварзин Г. А. 1971. Бактерия, окисляющая окись углерода. — Докл. АН СССР, 196, 956.
- Соловьев П. В., Стрельчук П. А., Ермилов П. И., Канер Б. Л. 1966. Основы техники безопасности и противопожарной техники в химической промышленности. Под ред. Б. Л. Канера, 2 изд. М., «Химия».
- Федорова Т. А. 1970. Метод расчета амфиболлизма микроорганизмов на примере водородных бактерий. — Микробиол., 39, 937.
- Хавина Э. С., Савельева Н. Д., Раутенштейн Я. И. 1968. О бактериофаге бактерий из рода *Hydrogenomonas*. — Микробиол., 37, 471.
- Ahrens J. 1966. Über die Komponenten des Elektrontransportsysteme bei *Hydrogenomonas* H-16. Diss. Göttingen.
- Asano A., Imai K., Sato R. 1967a. Oxidative phosphorylation in *Micrococcus denitrificans*. II. The properties of pyridine nucleotide transhydrogenase. — Biochim. et biophys. acta, 143, 477.
- Asano A., Imai K., Sato R. 1967b. Oxidative phosphorylation in *Micrococcus denitrificans*. III. ATP supported reduction of NAD⁺ by succinate. — J. Biochem., 62, 210.
- Atkinson D. E. 1955. The biochemistry of *Hydrogenomonas*. III. The effect of inorganic nitrogen compounds on hydrogen uptake. — J. Bacteriol., 70, 78.
- Atkinson D. E., McFadden B. A. 1954. The biochemistry of *Hydrogenomonas*. I. The hydrogenase of *Hydrogenomonas facilis* in cell free preparation. — J. Biol. Chem., 210, 885.
- Baalsrud K., Baalsrud K. S. 1954. Studies on *Thiobacillus denitrificans*. — Arch. Mikrobiol., 20, 34.
- Banerjee A. K., Schlegel H. G. 1966. Zur Rolle des Hefeextractes während des chemolithotrophen Wachstum von *Micrococcus denitrificans*. — Arch. Mikrobiol., 53, 132.
- Bartha R. 1962. Physiologische Untersuchungen über den chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter *Hydrogenomonas* Stämme. — Arch. Mikrobiol., 41, 313.
- Bartha R., Ordal E. J. 1964. Nickel-dependent chemolithotrophic growth of two *Hydrogenomonas* strains. — J. Bacteriol., 89, 1015.
- Beijerinck M. W., Minkman D. C. 1910. Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. — Zbl. Bakteriol., II Abt., 25, 30.
- Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 7-th ed. 1957. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Bernstein S., Vishniac W. 1959. Purification and properties of DPN-linked hydrogenase. — Federal. Proc., 18, 192.
- Blackkolb F., Schlegel H. G. 1968. Katabolische Repression und Enzymhemmung durch molekularen Wasserstoff bei *Hydrogenomonas*. — Arch. Mikrobiol., 62, 129.
- Bone D. H. 1960. Localization of hydrogen activating enzymes of *Pseudomonas saccharophila*. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 3, 211.
- Bone D. H. 1963. Inhibitor, isotopic and kinetic studies on hydrogen dehydrogenase. — Biochim. et biophys. acta, 67, 589.
- Bone D. H., Bernstein S., Vishniac W. 1963. Purification and some properties of different forms of hydrogen dehydrogenase. — Biochim. et biophys. acta, 67, 581.
- Bongers L. H. 1964. Sustaining life in space: a new approach. — Aerospace Med., 139, 144.

- Bongers L. 1967. Phosphorylation in hydrogen bacteria. — J. Bacteriol., **93**, 1615.
- Bovell C. 1967. The effect of sodium nitrite on the growth of *Micrococcus denitrificans*. — Arch. Mikrobiol., **59**, 13.
- Chang J. P., Morris J. G. 1962. Studies on the utilization of nitrate by *Micrococcus denitrificans*. — J. Gen. Microbiol., **29**, 301.
- Chapman D. D., Meyer R., Proctor C. M. 1963. Application of hydrogen utilizing microorganisms to respiratory support in closed systems. — Developm. Industr. Microbiol., **4**, 343.
- Cohen J. S., Burris R. H. 1955. A method for the culture of hydrogen bacteria. — J. Bacteriol., **69**, 316.
- Davis D. H., Doudoroff M., Stanier R. Y., Mandel M. 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. — Internat. J. Syst. Bacteriol., **19**, 375.
- Davis D. H., Stanier R. Y., Doudoroff M., Mandel M. 1970. Taxonomic studies on some gram-negative polarly flagellated "hydrogen bacteria" and related species. — Arch. Mikrobiol., **70**, 1.
- Dworki M., Foster J. W. 1957. Some new autotrophic hydrogen utilizing bacteria. — Federat. Proc., **16**, 176.
- Eberhardt U. 1966. Über das Wasserstoffaktivierende System von *Hydrogenomonas* H-16. I. Verteilung der Hydrogenase Aktivität auf zwei Zellfraktionen. — Arch. Mikrobiol., **53**, 288.
- Eberhardt U. 1969. On chemolithotrophy and hydrogenase of a grampositive Knallgas Bakterium. — Arch. Mikrobiol., **66**, 91.
- Fewson C. A., Nicholas D. J. D. 1961. Respiratory enzymes in *Micrococcus denitrificans*. — Biochim. et biophys. acta, **48**, 208.
- Focht D., Alexander M. 1971. Aerobic cometabolism of DDT analogues by *Hydrogenomonas* sp. — Agric. and Food. Chem., **19**, 20.
- Forget P. 1968. Recherches sur le metabolisme du glucose chez les bacteries denitrifiantes. II. *Micrococcus denitrificans*. — Ann. Inst. Pasteur. **115**, 332.
- Foster J., Litchfield J. H. 1964. A continuous culture apparatus for the microbial utilization of hydrogen produced by electrolysis of water in closed cycle space system. — Biotechnol. and Bioengng, **6**, 441.
- Gottschalk G. 1965. Die Verwertung organischer Substrate durch *Hydrogenomonas* in Gegenwart vom molekularen Wasserstoff. — Biochem. Z., **341**, 260.
- Grohman G. 1924. Zur Kenntniss wasserstoffoxydierender Bakterien. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **61**, 256.
- Hamer G., Hedén G. G., Carenberg C. O. 1967. Methane as carbon substrate for the production of microbial cells. — Biotechnol. and Bioengng, **9**, 499.
- Harmsen G. W., Kolenbrander G. F. 1965. Soil inorganic nitrogen. — In: Soil nitrogen. Bartholomew W. V., Clark F. E. (Eds). Wisconsin.
- Hiort U., Kleczkowski K., Kating H. 1967. Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoff in Mikroorganismen. V. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin Cyclus in *Micrococcus denitrificans*. — Arch. Mikrobiol., **55**, 311.
- Hippe H. 1967. Abbau und Wiederverwertung von Poly- β -hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* H-16. — Arch. Mikrobiol., **56**, 248.
- Hirsch P. 1961. Wasserstoffaktivierung und Chemoautotrophie bei Actinomyeten. — Arch. Mikrobiol., **39**, 360.
- Hirsch P. 1963. CO₂-Fixierung durch Knallgasbakterien. II. Chromatographischer Nachweis der frühzeitigen Fixierungsproducte. — Arch. Mikrobiol., **46**, 53.
- Hirsch P. 1968. Photosynthetic bacterium growing under carbon monoxide. — Nature, **217**, 555.
- Hirsch P., Georgiev G., Schlegel H. G. 1963a. CO₂-Fixierung durch Knallgasbakterien. III. Autotrophe und organotrophe CO₂-Fixierung. — Arch. Mikrobiol., **46**, 79.
- Hirsch P., Georgiev G., Schlegel H. G. 1963b. Identification of early labelled products of CO₂ fixation by hydrogen bacteria accumulating poly- β -butyric acid. — Nature, **197**, 313.
- Hirsch P., Schlegel H. G. 1963. CO₂-Fixierung durch Knallgasbakterien I. Einbau und Fraktionierung. — Arch. Mikrobiol., **46**, 44.

- Repaske R. 1966. Characteristics of hydrogen bacteria. — *Biotechnol. and bioengng.* 8, 217.
- Repaske R., Lizotte C. L. 1965. The electron transport system of *Hydrogenomonas eutropha*. II. Reduced nicotinamide adenine nucleotide menadiol reductase. — *J. Biol. Chem.* 240, 4774.
- Ribbons D. W., Harrison J. E., Wadzinski A. M. 1970. Metabolism of single-carbon compounds. — *Annual Rev. Microbiol.* 24, 135.
- Ruhland W. 1922. Aktivierung von Wasserstoff und CO₂-Assimilation durch Bakterien. — *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, 40, 180.
- Ruhland W. 1924. Beiträge zur Physiologie der Knallgasbakterien. — *Jahrb. wiss. Bot.* 63, 321.
- Schatz A. 1952. Uptake of carbon dioxide, hydrogen and oxygen by *Hydrogenomonas facilis*. — *J. gen. Microbiol.*, 6, 329.
- Schatz A., Bovell C. 1952. Growth and hydrogenase activity of a new bacterium *Hydrogenomonas facilis*. — *J. Bacteriol.* 63, 87.
- Schlegel H. G. 1953. Physiologische Untersuchungen an wasserstoffoxydierenden Bakterien. — *Arch. Mikrobiol.*, 18, 362.
- Schlegel H. G. 1954. Untersuchungen über den Phosphatstoffwechsel der wasserstoffoxydierenden Bakterien. — *Arch. Mikrobiol.*, 21, 127.
- Schlegel H. G. 1964. Die Verwendung von H₂-oxydierenden Bakterien zur Regenerierung der Atemluft. — *Raketentechn. Raumforsch.* 8, 65.
- Schlegel H. G. 1966. Physiology and biochemistry of Knallgasbacteria. — *Advanc. Compar. Physiol. and Biochem.* 2, 185.
- Schlegel H. G. 1970. From electricity via water electrolysis to food. — *Fermentation Advances*, 1969, p. 807. Academic Press. N. Y.
- Schlegel H. G., Claus D., Lafferty R. M. 1969. Mikroorganismen im Dienste der menschlichen Ernährung. — *Zbl. Bakteriol.* I Abt., 212, 303.
- Schlegel H. G., Gottschalk G. 1962. Poly- β -hydroxybuttersäure ihre Verbreitung. Funktion und Biosynthese. — *Angew. Chem.*, 74, 342.
- Schlegel H. G., Gottschalk G., Bartha R. 1961. Formation and utilization of poly- β -hydroxybutyric acid by Knallgasbacteria (*Hydrogenomonas*). — *Nature*, 191, 463.
- Schlegel H. G., Kaltwasser H. 1961. Veränderungen des Polyphosphatgehaltes während des Wachstums von Knallgasbakterien unter Phosphatmangel. — *Flora (Jena)*, 150, 259.
- Schlegel H. G., Kaltwasser H., Gottschalk G. 1961. Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. — *Arch. Mikrobiol.* 38, 209.
- Schlegel H. G., Lafferty R. 1964. Submerskultur von *Hydrogenomonas* mit elektrolytischer Knallgaserzeugung im Kulturgefäß. — *Zbl. Bakteriol.* Abt. II, 118, 483.
- Schlegel H. G., Trüper H. G. 1966. Repression of enzyme formation in *Hydrogenomonas* strain H-16 G⁺ by molekular hydrogen and by fructose. — *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.* 32, 277.
- Scholes P. B., Smith L. 1968a. Composition and properties of the cytoplasmic membrane of *Micrococcus denitrificans*. — *Biochim. et biophys. acta*, 153, 363.
- Scholes P. B., Smith L. 1968b. Composition and properties of the membrane bound respiratory chain system of *Micrococcus denitrificans*. — *Biochim. et biophys. acta*, 153, 363.
- Schuster E., Schlegel H. G. 1967. Chemolithotrophes Wachstum von *Hydrogenomonas* H-16 im Chemostaten mit elektrolytischer Knallgaserzeugung. — *Arch. Mikrobiol.*, 58, 380.
- Sreenivasan A., Subrahmanyam V. 1934. Loss of nitrogen from swamp soils. — *Current Sci. India*, 2, 432.
- Sreenivasan A., Subrahmanyam V. 1935. Biochemistry of water logged soils. IV. Carbon nitrogen transformations. — *J. Agric. Sci.*, 25, 6.
- Stonier R. Y., Doudoroff J., Palleroni N. J. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. — *J. Gen. Microbiol.*, 43, 159.

- Strenkouski L. F., DeCicco B. F.* 1971. pH conditional ammonia assimilation deficient mutants of *H. eutropha*: isolation and growth characteristics. — *J. Bacteriol.*, **105**, 291.
- Stukus P. E., DeCicco B. T.* 1970. Autotrophic and heterotrophic metabolism of *Hydrogenomonas*. Regulation of autotrophic growth by organic substrates. — *J. Bacteriol.*, **101**, 339.
- Takamiya A., Tubaki K.* 1956. A new form of *Streptomyces* capable of growing autotrophically. — *Arch. Mikrobiol.*, **25**, 58.
- Verhoeven W.* 1956. Some remarks on nitrate and nitrite metabolism in microorganisms. — In: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. D. McElroy and B. Glass (Eds). Baltimore, J. Hopkins Press, p. 61.
- Verhoeven W., Koster A. L., van Nievell M. G. A.* 1954. Studies on true dissimilatory nitrate reduction. III. *Micrococcus denitrificans* Beijerinck a bacterium capable of using molecular hydrogen in denitrification. — *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.*, **20**, 273.
- Vernon L. P.* 1956. Cytochrome system of *Micrococcus denitrificans*. — *J. Biol. Chem.*, **222**, 1035.
- Vernon L. P., White F. C.* 1957. Terminal oxidases of *Micrococcus denitrificans*. — *Biochim. et biophys. acta*, **25**, 321.
- Vogt M.* 1965. Wachstumsphysiologische Untersuchungen an *Micrococcus denitrificans* Beij. — *Arch. Mikrobiol.*, **50**, 256.
- Whittenbury R.* 1969. Microbial utilization of methane. — *Process Biochem.*, **4**, 51.
- Wilde E.* 1962. Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. — *Arch. Mikrobiol.*, **43**, 109.
- Wittenberger C. L., Repaske R.* 1961. Studies on hydrogen oxidation of *Hydrogenomonas eutropha*. — *Biochim. et biophys. acta*, **47**, 542.
- Woldendorp J.* 1962. The quantitative influence of the rhizosphere on denitrification. — *Plant and Soil*, **17**, 267.

АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ВОДОРОДА. МЕТАНОБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Анаэробные микроорганизмы развиваются в условиях, где отсутствует окислитель с высоким окислительным потенциалом, которым для аэробных организмов служит кислород воздуха. При недостатке кислорода возможно осуществление трех типов физиологических процессов — брожения, анаэробного дыхания, бактериального фотосинтеза, — в которых по-разному решается проблема терминального окислителя.

Брожение, при котором происходит восстановление одной органической молекулы за счет другой, возможно при благоприятном соотношении окисленных и восстановленных эквивалентов в субстрате. Такому процессу могут подвергаться углеводы, — причем первое место занимает сбраживание клетчатки, и многие азотистые вещества, соответствующие по уровню восстановленности клеточному телу. Продуктами этих процессов являются простые органические соединения, такие как жирные кислоты, спирты, молекулярный водород. Брожение сопровождается субстратным фосфорилированием.

Следующим типом анаэробных процессов является анаэробное дыхание, в котором окисление простых органических соединений осуществляется за счет восстановления неорганических веществ: углекислоты, сульфатов, нитратов. При анаэробном дыхании происходит окислительное фосфорилирование. Восстановителем здесь может служить водород. Эти процессы приводят к полному использованию органических веществ и появлению газов: сероводорода, метана, свободного азота и аммиака.

Третьим типом анаэробных процессов служит бактериальный фотосинтез, в котором окисление сероводорода, водорода, простых органических веществ и других восстановителей осуществляется фотохимически без потребления иных окисленных соединений, кроме воды.

В задачу этой книги входит рассмотрение только анаэробного дыхания, а именно — тех его случаев, когда восстановителем являются неорганические вещества. Энергетический выход окислительно-восстановительной реакции зависит от разности потенциалов между окислителем и восстановителем, поэтому энергетически вы-

годно использование наиболее восстановленных субстратов. В настоящее время изучены, кроме восстановления нитрата тионовыми бактериями, реакции, в которых восстановителем служит водород. Окислителем в этих реакциях могут служить нитрат, сульфат, углекислота. Микроорганизмы, восстанавливающие нитрат, относятся к факультативным анаэробам и могут переходить к аэробному росту как обычные водородные бактерии, вместе с которыми они обсуждались в главе 2.

К строгим анаэробам относятся сульфатвосстанавливающие и метанобразующие бактерии.

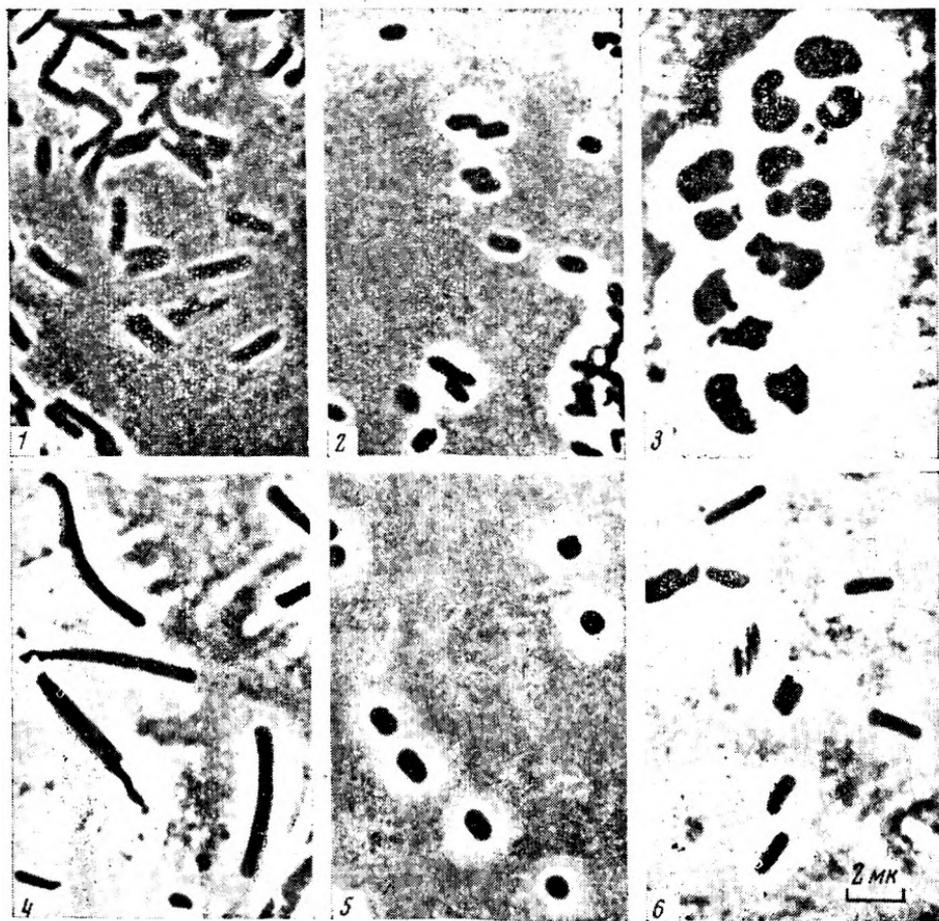
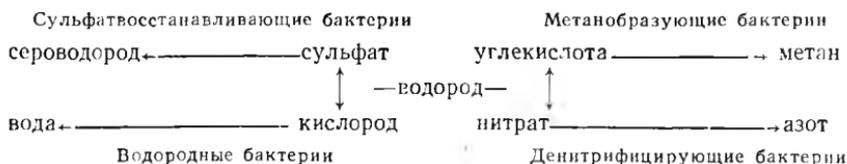


Рис 24. Метанобразующие бактерии (Smith, 1965)

1 — *Methanobacterium formicicum*; 2 — *Methanobacterium ruminantium*; 3 — *Methanosarcina* sp.; 4 — *Methanobacterium söhngeni*; 5 — *Methanococcus* sp.; 6 — *Methanobacterium* sp.

Центральное положение водорода в микробной экосистеме показано ниже:



У сульфатвосстанавливающих бактерий окислителем служит сульфат, и перенос электрона происходит через цитохромсодержащую цепь, но в переносе участвуют и негеминные железосодержащие белки — ферредоксин, рубредоксин. Организмы этой группы оказались неспособными к росту на углекислоте как единственном источнике углерода, но в их обмене большое значение приобрела ферредоксин-зависимая реакция синтеза и разложения пировиноградной кислоты. Организмы этой группы обладают типичным литогетеротрофным обменом, используя органические вещества. Некоторые сульфатвосстанавливающие бактерии кроме анаэробного брожения за счет сульфатов способны сбраживать пировиноградную кислоту и холин. Обладая одним физиологическим типом питания, штаммы этих организмов довольно разнообразны как по морфологии, так и по адаптации к различным экологическим условиям (см. главу 4).

Для метанобразующих бактерий акцептором электрона служит углекислота. В переносе электрона участвуют ферредоксин, но не цитохромы, и о путях фосфорилирования ничего не известно. Ассимиляция углерода этими организмами осуществляется либо из готовых органических соединений, либо через реакции восстановительного цикла органических кислот, зависящие от ферредоксина, хотя способность метанобразующих бактерий к строго автотрофному способу существования установлена лишь по культивированию в минеральной среде, но не биохимически. Энергетический тип обмена метанобразующих бактерий ближе примыкает к брожению; некоторые виды способны сбраживать уксусную кислоту. Морфологическое многообразие организмов с этим типом питания очень велико; аналогичные им формы встречаются среди многих групп анаэробных микроорганизмов (рис. 24). К ним примыкают организмы, синтезирующие органические вещества, прежде всего ацетат, за счет реакции $\text{CO}_2 + \text{H}_2$.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ

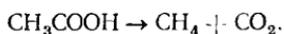
Обзор работ по образованию метана, предшествовавших выделению микроорганизмов, ответственных за этот процесс, сделал Омелянский (1906а). Образование метана — геологический процесс

таких масштабов, которые может оценить и неспециалист, наблюдая за выделением пузырьков газа, поднимающихся со дна водоемов. Еще в XVII веке А. Вольта доказал, что этот газ представляет собой «воспламеняющийся воздух» — метан. Наблюдения в природе с несомненностью доказывали, что болотный газ образуется там, где идет разложение органического вещества без доступа воздуха. Для объяснения процесса был предложен ряд химических гипотез, но все предполагаемые реакции могли идти в таких условиях температуры и давления, которые мыслимы лишь при вулканических процессах. Вместе с тем было несомненно, что основная масса метана образуется в условиях, совместимых с жизнедеятельностью организмов. Это обстоятельство, как и распространившаяся в конце прошлого века идея о геологической роли микробных процессов привели к постановке опытов в лаборатории Гоппе-Зейлера (Hoppe-Seyler, 1886) по сбраживанию клетчатки, зараженной илом сточных вод. В течение четырех лет наблюдая за выделением газа, Гоппе-Зейлер пришел к выводу, что он состоял только из углекислоты и метана, причем никаких промежуточных продуктов распада клетчатки не было обнаружено, а под микроскопом были найдены короткие палочки, некоторые из них со спорами.

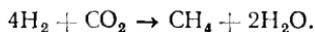
Исследование Омелянского в 1902 г. в полном соответствии с идеями Виноградского привело к заключению, что анаэробное разложение клетчатки с образованием метана есть «самостоятельный микробный процесс, идущий под влиянием специфического агента» (цит. по Омелянский, 1953, стр. 71). В отличие от опытов предыдущих исследований Омелянский обнаружил в среде накопление заметного количества органических кислот, прежде всего уксусной. Далее было показано, что разнообразные органические вещества — жирные кислоты, спирты, пентозаны — разлагаются с образованием метана (Омелянский, 1906б, 1916; Mazé, 1903). Однако разложение сложных соединений осуществлялось смешанными культурами.

Первая диссертация на кафедре Бейеринка в Техническом университете в Делфте была выполнена Зенгеном в 1906 г. по метановому брожению. Зенген (Söhngen, 1910), работая с накопительными культурами на индивидуальных простых химических веществах, установил следующие основные факты:

1. Метановому брожению подвергаются органические соединения, которые могут быть превращены в уксусную кислоту, сбраживаемую согласно уравнению



2. Метан может образовываться за счет восстановления углекислоты молекулярным водородом



3. Метан может образовываться из одноуглеродных соединений.

Последующие работы были посвящены разработке двух основных вопросов: во-первых, какие именно микроорганизмы осуществляют образование метана; во-вторых, каков биохимический путь превращения углерода в метан. Оба вопроса и сейчас нельзя считать разрешенными, но факты, установленные Зенгенем, остаются фундаментальной основой исследований метанового брожения.

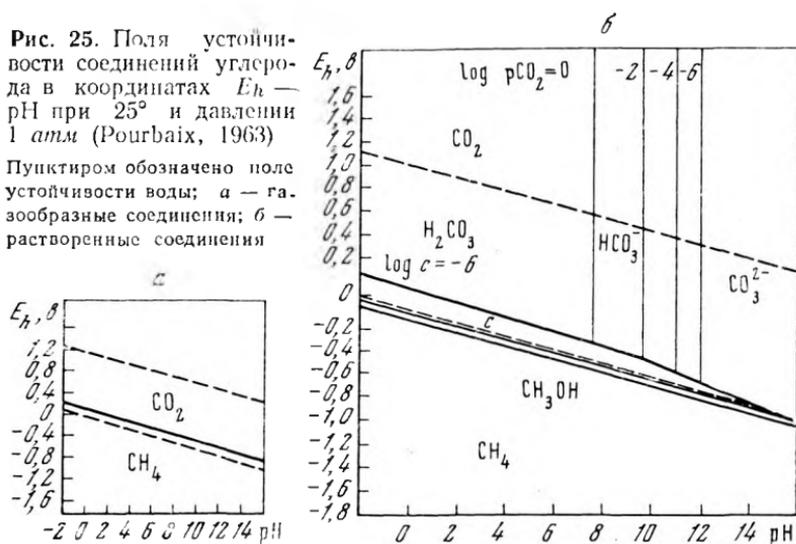
Собственно говоря, только реакцию разложения ацетата можно назвать реакцией брожения, так как в ней происходит восстановление одной части органической молекулы за счет окисления другой части. Реакция восстановления углекислоты является реакцией анаэробного дыхания, при котором происходит восстановление неорганического акцептора, иного, чем кислород, и синтезируется вода. Именно эта реакция заставляет нас рассматривать метанобразующие бактерии вместе с другими литотрофами.

Современные представления об образовании метана основываются на работах очень немногих исследователей, которые были строго преемственны. Прежде всего следует назвать работы Баркера (Barker, 1936a,b, 1949, 1956), которого интересовали в первую очередь превращения органических веществ при образовании метана. Другие стороны обмена метанобразующих бактерий, их физиология, морфология и систематика изучались лишь попутно. Поэтому эта группа изучена очень односторонне.

Образование метана для всех метанобразующих бактерий является энергетической реакцией, обеспечивающей осуществление всех функций микроорганизма. Начиная с работ Омелянского считается, что метанобразующие бактерии являются высокоспециализированными организмами, которые не могут осуществлять никакой дру-

Рис. 25. Поля устойчивости соединений углерода в координатах E_h — рН при 25° и давлении 1 атм (Pourbaix, 1963)

Пунктиром обозначено поле устойчивости воды; а — газообразные соединения; б — растворенные соединения



гой реакции для поддержания своей жизнедеятельности, кроме реакции образования метана. Пока этот постулат встречает только подтверждения. Все метанобразующие бактерии являются строгими анаэробами, они развиваются при полном отсутствии молекулярного кислорода в среде. Уже концентрация кислорода 0,1% в атмосфере является губительной для них.

Из диаграммы состояний соединений углерода (рис. 25) видно, что образование метана может быть термодинамически выгодной реакцией только при крайне низких значениях окислительно-восстановительного потенциала, которые и определяют возможную область развития метанобразующих бактерий. Низкий потенциал создается за счет деятельности сопутствующей микрофлоры.

После работ Гоппе-Зейлера считается, что образование метана может идти в очень простой среде, состоящей из набора минеральных солей, и что организм строит свое тело целиком из окисляемого вещества, а в случае окисления водорода — из углекислоты. Это допущение предполагает, что метанобразующие бактерии являются автотрофными организмами. Такое заключение плохо обосновано экспериментально, так как рост метанобразующих бактерий бывает довольно слабым и их конструктивный обмен почти не изучен.

На основе имеющихся экспериментальных данных принимается, что для энергетического обмена метанобразующие бактерии используют только простые органические вещества. Молчаливо допускается, что пути превращения всех веществ в метан проходят через одни и те же этапы промежуточного обмена, т. е. биохимический механизм образования метана является в принципе однородным у всех микроорганизмов этой группы. Во всех случаях углеродсодержащее соединение выступает в роли акцептора электрона, окислителя, а восстановителем служит либо молекулярный водород, либо водород органических соединений. Поскольку конечным продуктом является одно-единственное вещество метан, то и предшествующие ему промежуточные продукты могут быть одинаковы для всех используемых субстратов у всех организмов.

ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СИСТЕМАТИКА

Метанобразующие бактерии можно условно разделить на две группы: 1) бактерии, способные образовывать метан только из водорода и углекислоты, или же из соединений, превращающихся в водород и углекислоту, но не из органических кислот, спиртов, и 2) бактерии, способные, помимо водорода, использовать для образования метана органические соединения, в первую очередь такие, как уксусная кислота и метанол. Бактерии первой группы способны только к «анаэробному дыханию», бактерии второй группы — и к «анаэробному дыханию» и к «брожению». При всей условности такого деления оно удобно при обсуждении роли метанобразующих бактерий, методов их выделения и культивирования.

Бактерии обеих групп обладают рядом сходных признаков: все они являются строгими анаэробами, быстро погибающими при контакте с кислородом; не имеют таких специальных переживающих стадий, как споры; все строго специфичны и используют ограниченное число субстратов. По имеющимся данным метанообразующие бактерии не разлагают сложные полимерные вещества и не могут использовать соединения, доступные для обычных типов брожения, как например углеводы. Субстратами для метанообразующих бактерий являются вещества, которые образуются как продукты обычных брожений. Метанообразующие бактерии часто развиваются в тесном сообществе с другими анаэробными микроорганизмами, поэтому выделение их в чистую культуру затруднено.

Как видно из изложенного, метанообразующие бактерии представляются сейчас достаточно монолитной физиологической группой, но возможно, что это представление отчасти обусловлено тем, что они плохо изучены.

По возрастающей способности к использованию органических веществ для образования метана можно выделить следующие группы:

1. Используют только водород и превращающиеся в него вещества (CO, формат): *Methanobacterium formicicum*, *M. ruminantium*, *M. mobilis*, *Methanococcus vannielii* (Wolfe, 1971).

2. Кроме водорода используют уксусную кислоту (иногда и масляную): *Methanobacterium söhngeni*, *Methanosarcina methanica*, *Methanococcus mazei*.

3. Кроме водорода и уксусной кислоты используют метанол: *Methanosarcina barkerii*.

4. Используют различные органические кислоты. Организмы этой группы не были получены в чистой культуре, и не исключена возможность, что приписываемая им химическая активность — результат совместного действия нескольких организмов. *Methanobacterium propionicum* использует пропионовую кислоту, *M. suboxydans* — масляную, валериановую, капроновую, «*M. omeljanskii*» — этанол, простые спирты.

Если получение накопительных культур метанообразующих бактерий не вызывает никаких затруднений, то выделение чистых культур и подсчет бактерий в метанообразующей популяции очень сложны. Несмотря на применение селективной среды, в культурах развивается популяция, компонентами которой, как показали исследования Жилиной в нашей лаборатории, являются гнилостные клостридии, разлагающие агар анаэробные цитобагги, энтеробактерии и сульфатовосстанавливающие бактерии. Все эти организмы связаны между собой трофическими связями, и очистить культуры от них оказывается чрезвычайно сложно. Подвижные бактерии распространяются в пленке воды между агаром и стеклом или по трещинам агара, заражая весь сосуд. Некоторые метанообразующие бактерии, такие как метаносарцина, имеют сложное строение ко-

лоний и спутники располагаются в них между пакетами сарцины. Сульфатвосстанавливающие бактерии, по-видимому, способны использовать промежуточные продукты обмена метанобразующих бактерий. Вместе с тем продуцируемый ими сероводород защищает метанобразующие бактерии от действия кислорода.

Чистые культуры метанобразующих бактерий, когда они получены, можно вести в крупных масштабах. Так, для биохимических целей метаносарцину культивировали в лабораторном ферментере на минеральной среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии с выходом биомассы 3,3 г по сухому весу на 1 моль использованного метанола (Stadtman, 1967), а *M. formicicum* штамм M. o. h. в ферментере, через который продували смесь водорода и углекислоты.

Накопительные культуры метанобразующих бактерий на средах с органическими веществами получить сравнительно просто. Зёнген (Söhngen, 1910), получая свои накопительные культуры, использовал то обстоятельство, что метанобразующие бактерии развиваются обычно в осадке. Многократно сменяя минеральный раствор с солями органических кислот над осадком, он сумел добиться значительного обогащения культур и описать вызывающие процесс формы микроорганизмов.

Баркер (Barker, 1936b) применял культивирование в столбиках агара. Его методика, с помощью которой был выделен ряд метанобразующих бактерий, заключается в следующем. Минеральная среда Баркера содержит (в %): NH_4Cl — 0,1; K_2HPO_4 — 0,04; MgCl_2 — 0,01, органическое вещество — 1—2. Перед посевом среду кипятят для удаления растворенных газов и, охладив, добавляют 3% по объему раствора, содержащего 1% $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ и 5% NaHCO_3 , стерилизованного в автоклаве. Добавлением стерильного раствора соляной кислоты устанавливают pH 7,0. В качестве субстрата используют ацетат для выделения сарцин, масляную кислоту — для *M. soehngeni*, метанол — для *M. barkeri*. Выделение чистых культур проводят на агаризованной среде указанного состава. Пробирки с застывшей агаризованной средой заливают смесью равных частей парафина и вазелинового масла, чтобы предохранить их от высыхания и проникновения воздуха. Развитие обнаруживают по появлению разрывов агара, причем сроки инкубации обычно очень длительные, иногда несколько месяцев. Выделение чистых культур производят отсевом колоний, которые обычно очень малы, и их удастся наблюдать только на срезах агаризованной среды под микроскопом.

Для культивирования *Methanococcus vannielii* использовалась среда (Stadtman, Barker, 1951a), содержащая (в г/л): муравьинокислый натрий — 1—15; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 и FeCl_3 — по 0,01; MnSO_4 — 0,001; K_2HPO_4 — 0,003; тиогликолат натрия — 0,5.

При приготовлении элективных сред для метанобразующих бактерий в них избегают вводить вещества, которые могут обусло-

вить развитие конкурирующих процессов: сульфат для сульфатвосстанавливающих и сбраживаемые органические вещества для обычных бродящих организмов.

Методика выделения и подсчета живых клеток метанобразующих водородных бактерий разработана Хангейтом и излагается здесь в модификации Смита (Smith, 1965).

Используется минеральная среда следующего состава (в %): NaCl — 0,1; NH₄Cl — 0,05; MgCl₂·6H₂O — 0,005; KCl — 0,005; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O — 0,001; CoCl₂·6H₂O — 0,001; индикатор резазурин — 0,001; L-цистеин солянокислый — 0,03—0,05; Na₂S·9H₂O — 0,02—0,05; NaHCO₃ — 2; агар — 1,5; жидкость из рубца — 30. Приготавливают все компоненты среды, за исключением цистеина, сульфида и бикарбоната, кипятят для удаления кислорода и разливают по пробиркам, в которые опущена игла для инъекций, через которую пропускают ток газовой смеси 70% H₂ и 30% CO₂, очищенных от кислорода пропусканием через нагретую до 400° медь. Пробирки быстро закрывают резиновыми пробками и устанавливают в пресс, в котором их стерилизуют при 120°. Такая обработка действительно гарантирует от поступления кислорода. После стерилизации и охлаждения через пробку шприцем вводят восстановитель, плавают агар и шприцем производят посев в охлажденную до 45° С среду. Затем пробирки вращают, чтобы среда застыла, распределившись по стенкам. Колонии метанобразующих бактерий развивались медленно, в течение двух месяцев, поэтому быстро появляющиеся колонии отмечали и игнорировали при подсчете.

Необходимым условием начала развития был низкий окислительно-восстановительный потенциал среды порядка — 0,36 в. Потенциал можно было снижать биологически, добавляя в каждую пробирку 0,5 мл суспензии *Escherichia coli*, которую через 48 час. убивали автоклавированием. Культуры метанобразующих бактерий необычайно чувствительны к кислороду: 0,1% кислорода в атмосфере останавливает их рост, а при экспонировании на воздухе количество живых клеток сокращается в 2—10 раз за каждые 4 мин.

Окисляемым субстратом служит в описанной методике водород, поэтому о развитии бактерий можно судить по снижению давления в пробирках и хроматографически, определяя наличие метана на газовом хроматографе.

Методика достаточно эффективна для водородных метанобразующих бактерий, рост которых удается наблюдать вплоть до 10⁻⁸ разведения. Кроме *M. formicicum* и бактерий из рубца, на приведенной среде удается получить и рост *M. barkeri*. Массовое культивирование водородных метанобразующих бактерий осуществили Бриан и соавторы (Bryant et al., 1968) в установке, аналогичной применяемой для культивирования истинных водородных бактерий. Посевной материал выращивали в толстостенной колбе на круговой качалке. Сквозь колбу продували поток газовой смеси водорода и углекислоты из баллона со скоростью 35 мл/мин. Смесь газов освобождали от кислорода пропусканием над нагретой до 400° медью в 15 см колонке. Для культивирования был использован стандартный ферментер на 12 л, через который продували смесь углекислоты и водорода со скоростью 200 мл/мин, затем 650 мл/мин. Образование метана зависело от поступления во-

дорода. На образование 1 моля CH_4 расходовалось 3,6 моля водорода. За 70 час. ферментер давал 60 г сырого веса чистой культуры *Methanobacterium formicicum*. К минеральной среде, кроме восстановителя дисеннесульфата, добавляли 2% жидкости из рубца.

С точки зрения традиционной систематики, метанобразующие бактерии — весьма своеобразная группа. Разделение их на роды основано на предположении о физиолого-морфологическом единстве рода (Kluver, van Niel, 1936). Это отражено в соответствующей номенклатуре: *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*. По этой номенклатуре первая часть названия «*Methano-*» означала способность организма расти за счет образования метана, вторая давала его морфологическую характеристику. В то же время название *Methanomona* было применено для организма, окисляющего метан, что создало путаницу. Поэтому в современной номенклатуре микроорганизмы, окисляющие метан и метанол, предложено обозначать термином «*Methylo-*», указывающим на их принадлежность к метилотрофам, а за метанобразующими сохранили термины «*Methano-*». По этой терминологии метанокисляющие бактерии в русской литературе можно называть метилобактериями, а метанобразующие — метанобактериями (метановыми бактериями).

В номенклатуре метанобактерий морфологические критерии в последние годы более или менее игнорировали. Так, к роду *Methanobacterium* отнесены:

M. formicicum — неподвижные, в цепочках, грамотрицательные, *M. ruminantium* — неподвижные, в цепочках, грамположительные, *M. mobilis* — подвижные с полярным жгутиком, одиночные, грамотрицательные. К этому можно добавить *Methanobacterium soehngenii*, которые по фотографиям и накопительным культурам весьма напоминают влагалитные нитчатые бактерии. В род *Methanococcus* отнесены подвижный почкующийся *M. vannielii* и грамположительный *M. mazei*, фотографии которого наводят на мысль о микоплазмах. Накопительные культуры «*M. omeljanskii*», «*M. suboxidans*» «*M. propionicum*» могут сохранить свое название с таким же правом, как виды лишайников. Принятые как руководящий признак физиологические критерии не привели здесь к созданию единых систематических групп, хотя физиологически метанобактерии весьма однородны. Для объяснения этого явления возможны две гипотезы.

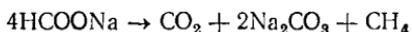
По первой из них использование реакции образования метана в качестве источника энергии свойственно разнообразным анаэробным организмам и никак не коррелирует с их морфологией. Группа метанобразующих бактерий аналогична в этом отношении, например, фотосинтезирующим бактериям.

Вторая гипотеза основывается на предположении, что в описанных культурах имел место симбиоз между метанобразующим организмом, который осуществлял водородную редукцию углекислоты, и броющим, который выделял водород, как это было обнаружено у «*M. omeljanskii*». Разнообразие форм метанобразующих бакте-

рий обуславливается здесь разнообразием бродящих организмов, способных выделять водород.

Во всяком случае сейчас очевидно, что существует два типа метанообразующих бактерий: водородные с типичным представителем *M. formicicum* и сбраживающие ацетат с типичным представителем *Methanosarcina*.

Типичным представителем водородных метанообразующих бактерий является *Methanobacterium formicicum*. Организм был выделен в чистую культуру и описан Шнелленом (Schnellen, 1947), который применял для выделения из ила сточных вод минеральную среду с 0,75% муравьинокислого натрия. После третьего пересева на агаризованной среде колонии оказались чистыми. Организм разлагал формиат в соответствии с уравнением



и был способен также восстанавливать углекислоту молекулярным водородом. Никакие другие органические соединения, кроме формиата, он не использовал.

Милрое и Хангейт (Mylroie, Hungate, 1954) произвели непосредственный высев из метантенка на минеральную агаризованную среду в атмосфере водорода и углекислоты и нашли, что доминирующий организм — *M. formicicum* обнаруживается в иле в концентрации 10^5 — 10^8 клеток /мл. Такие же результаты получили другие авторы (Smith, 1965; Buraczewski, 1964).

Methanobacterium formicicum Schnellen, 1947 представляет собой тонкую слегка изогнутую палочку с округлыми концами размерами 4—5×0,4 мк, часто в цепочках, неподвижную, без жгутиков, неспорозную, грамтрицательную. При негативной окраске фосфовольфрамом под электронным микроскопом обращает внимание наличие прокрашиваемых темных пятен — интрацитоплазматических мембранных элементов. Тонкое строение на срезах не обнаруживает каких-либо отличительных особенностей. Некоторые штаммы *M. formicicum* образуют плотные комки, сплетенные сетью тонких фибрилл 7 мкм диаметром. У штамма, выделенного из культуры «*M. omeljanskii*», окраска по Граму варьирует.

M. formicicum на среде под водородом образует характерные колонии с сильно разветвленными волосистыми краями. Глубинные колонии состоят из тонких ветвящихся близко расположенных нитей.

Организм окисляет в присутствии углекислоты молекулярный водород, муравьиную кислоту, окись углерода, но не образует метан на органических кислотах, спиртах, углеводах. Использование муравьиной кислоты и окиси углерода происходит после их превращения в молекулярный водород и углекислоту ферментативным путем. Связывание выделяющейся из этих соединений углекислоты останавливает образование метана.

Дрожжевой экстракт и микроэлементы не улучшали роста, но добавление к среде жидкости из рубца делало рост более воспроиз-

водимым. Для своего развития организм нуждается в создании восстановительных условий, которые достигаются добавлением к среде сульфида натрия в концентрации 0,01—0,015%, причем при более высоких и более низких концентрациях сероводорода рост задерживается. Вместо сульфида в среду можно добавлять хлористый палладий, который при нагревании среды в атмосфере водорода катализирует восстановление. Можно применять и другие восстановители.

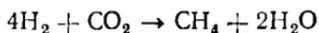
Для *M. formicicum* разработана методика выделения из ила пресноводных водоемов, сточных вод, рубца жвачных. Массовое культивирование этих организмов в атмосфере водорода и углекислоты так же осуществлено.

При культивировании *M. formicicum* в атмосфере водорода и углекислоты потребляется 3,7—3,85 л H_2 на 1 л CO_2 , а выход биомассы составляет 0,62 г на 1 моль H_2 (Robertson, Wolfe, 1970). Это примерно соответствует затрате 200 молей H_2 и 50 молей CO_2 для синтеза 1 «моля» биомассы (CH_2O).

Водородные метанобразующие бактерии из рубца жвачных были выделены Хангейтом и по многим физиологическим характеристикам сходны с *M. formicicum*. Основным используемым субстратом для них является водород, который играет роль важного промежуточного продукта в экосистеме рубца жвачных.

Methanobacterium ruminantium Smith, Hungate, 1958 выделена в чистую культуру из рубца жвачных, где она находится в количестве 10^8 клеток/мл (Smith, Hungate, 1958). Обнаружена также в метантенках. Морфологически это короткие овальные или лимонновидные палочки 0,7—1,8 мк, часто в парах или коротких цепочках. Неподвижны, спор не образуют, грамположительны. При окраске фосфовольфрамом под электронным микроскопом обнаруживается большое количество перегородок, но нет интрацитоплазматических мембранных включений. Строгий анаэроб, развивающийся при 30—42° и при начальном $E_h = -0,335$ в. Культивирование этого организма производят на среде, содержащей, кроме минеральных солей и восстановителя, 30% жидкости из рубца.

Methanobacterium mobilis Paynter, Hungate, 1968. По физиологическим характеристикам этот организм, выделенный из рубца жвачных на такой же среде, как и *M. ruminantium*, очень близок к нему (Paynter, Hungate, 1968). Использует только смесь углекислоты с водородом и формиат. Реакция идет по уравнениям:



В последнем случае водород является вероятным промежуточным продуктом, так как сначала он появляется в среде, и лишь затем начинается образование метана. Для развития организм требует жидкости из рубца, причем необходимый ростовой фактор содержится в твердом остатке и выделяется из него нагреванием.

Морфологически *M. mobilis* совершенно отличается от *M. ruminantium* и *M. formicicum*. Это прямая или слегка изогнутая палочка с округлыми концами $0,7 \times 1,5$ — $2,0$ мк, всегда одиночная. Она слабо подвижна благодаря наличию длинного полярного жгутика, грамотрицательная. Колонии всегда мелкие до 1 мм с ровным краем, прозрачные бледные или желтоватые, выпуклые.

Methanococcus vannielii Stadtman, Barker, 1951. Морфологически — это крупный эллипсоидный кокк диаметром 1—2 мк. В культурах встречаются мелкие и крупные формы, часто в парах, причем их расположение напоминает почкование у дрожжей. Мелкие формы оживленно подвижны, но жгутикование не описано. Организм развивается при рН 8,0 с пределами рН 7,4—9,2. Выделен из почвы на минеральной среде с формиатом натрия и тиогликолатом как восстановителем (Stadtman, Barker, 1951a). Использовал только формиат 0,1—1,5%, но Бурачевский (Buraczewski, 1964) обнаружил рост также в атмосфере, содержащей смесь водорода с углекислотой.

Представление о том, что органические вещества при образовании метана служат только источником водорода для восстановления углекислоты, оказалось неточным после первых работ с изотопами, когда было показано, что при сбраживании ацетата большая часть метана образуется из его метильной группы (Buswell, Sollo, 1948; Stadtman, Barker, 1951a,b). Кроме ацетата в метан превращается, не проходя стадии углекислоты, и метанол. Существенно, что все метанообразующие бактерии, включая и те, которые разлагают органические вещества, могут восстанавливать углекислоту водородом, и эта реакция является для них универсальной.

Среди метановых бактерий, использующих органические вещества, подробнее изучена метаносарцина, восстанавливающая метанол в метан.

Метаносарцина была впервые обнаружена Зёнгеном (Söhngen, 1910) при метановом брожении ацетата кальция. Баркер (Barker, 1936a) дал более подробное описание на основании изучения накопительной культуры, которая сбраживала метанол и ацетат. Он назвал ее *Methanosarcina methanica*; более поздние синонимы — *Zymosarcina methanica*, *Sarcina methanica*. Организм имел большие сферические клетки, сгруппированные в характерные для сарцин пакеты, иногда наблюдались тетрады и диплококки. Несколько лет спустя из черного ила стоячих вод Шнеллен (Schnellen, 1947), а затем Штатдман и Баркер (Stadtman, Barker, 1951b) выделили сарцину, имевшую форму коков диаметром 1,5—2 мк, объединенных в пакеты по 8 клеток. Помимо окисления водорода в смеси с углекислотой, сарцина использовала угарный газ, ацетат и прежде всего метанол. Она получила название *Methanosarcina barkeri*, но основания для выделения нового вида, судя по оригинальной работе Шнеллена (Schnellen, 1947, стр. 33), неясны, так как способностью к окислению метанола обладают оба вида.

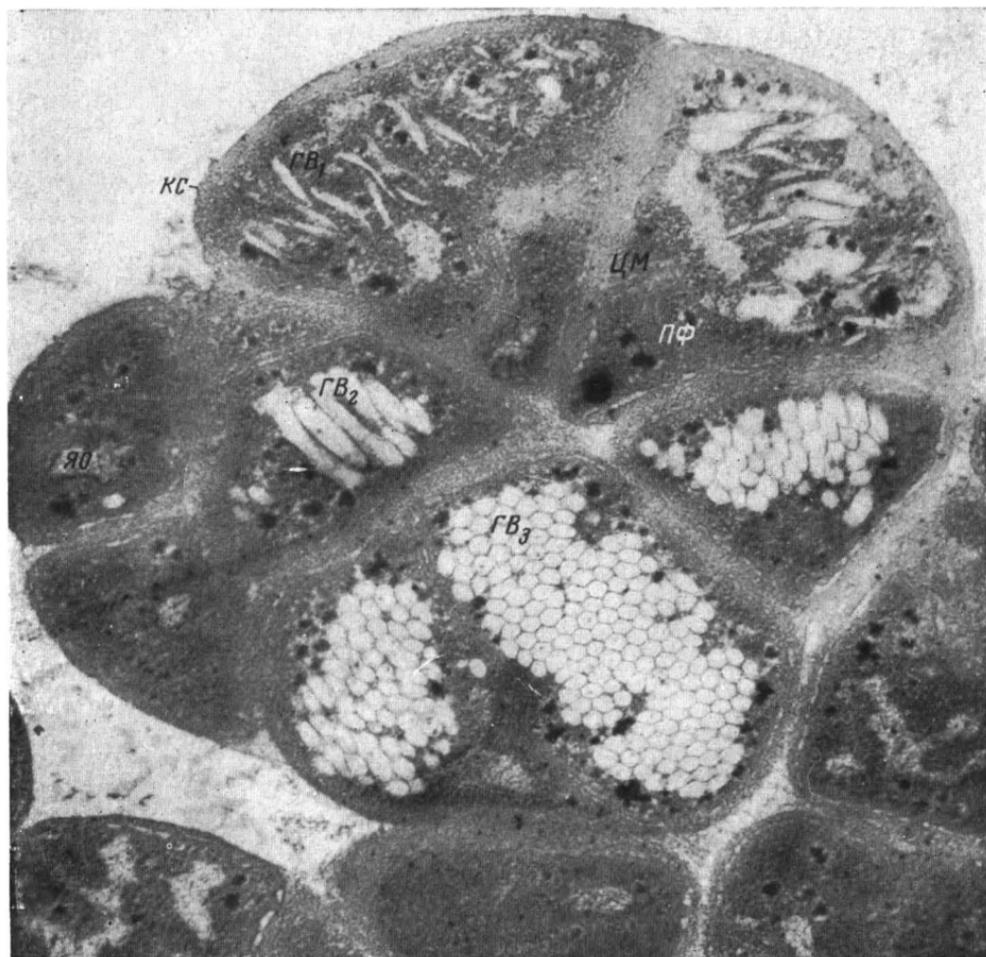


Рис. 26. Ультратонкий срез клеточного агрегата метаносарцины (Жилина, 1971)
 КС — клеточная стенка; ЯО — ядерная область; ГВ — газовые вакуоли; ГВ₁ — без газа; ГВ₂ — продольный срез; ГВ₃ — поперечный; ЦМ — цитоплазматическая мембрана; ПФ — полифосфаты

Биология метаносарцины была исследована в нашей лаборатории Жилиной (1971). Морфологически метаносарцины напоминают анаэробные бродящие сарцины: *Methanosarcina methanica* — *Sarcina ventriculi*, а *M. barkeri* — *S. maxima*, подробно описанные недавно (Canale-Parola, 1970). Тем не менее морфологическое сходство оказывается чисто внешним. На тонких срезах (рис. 26) видно, что крупная «клетка» метаносарцины на самом деле представляет агрегат клеток, образовавшийся в результате делений в различных направлениях, как это бывает у *Mycococcus* и *Dermatophylus*. Такое образование носит у синезеленых водорослей название псевдопаренхимы. Колонии метаносарцины при развитии в жидкой среде представляют правильное образование в форме пузырька с отверстием, напоминающее гастролу. Такая колония достигает размера около 1 мм. Внутренние клетки в колонии отмирают, а живыми остаются только расположенные у поверхности. Колония имеет губчатое строение, и между пакетами метаносарцины располагаются клетки посторонних микроорганизмов. В целом колония метаносарцины представляет своеобразный биоценоз вроде миниатюрного кораллового атолла. Глубинные колонии в агаризованной среде имеют характерную форму ягоды ежевики. Бросающейся в глаза особенностью внутреннего строения клеток метаносарцины, в общем напоминающей клетки анаэробных сарцин, является обилие газовых вакуолей, располагающихся пакетами, как у синезеленых водорослей. Газовые вакуоли играют существенную роль в жизни метаносарцины. Колония метаносарцины со спавшимися вакуолями имеет в два с лишним раза больший удельный вес, чем вода. При добавлении свежего питательного субстрата колония начинает образовывать газ и всплывает со скоростью около 0,5 см/сек. Там, где давление понижено, вакуоли стравливают газ и сарцина оседает на дно со скоростью около 0,7 см/сек. Этот механизм помогает колонии метаносарцины избежать погребения в донных иловых отложениях и вместе с тем не допускает ее всплытия наверх в аэробную зону.

Различия между *M. methanica* и *M. barkerii*, возможно, не превосходят различий между морфотипами одного и того же вида. При проточном культивировании и культивировании с перемешиванием из плотных колоний *M. methanica* была получена культура с диффузным характером роста, напоминавшая *M. barkerii*. В связи с неопределенным таксономическим положением здесь употребляется тривиальное название метаносарцина.

Биохимия образования метана из метанола была изучена в культуре *M. barkerii* (Stadtman, 1967) и изложена ниже. Метаносарцина превращала так же в смесь метана и углекислоты окись углерода и могла расти в атмосфере 100% угарного газа, в то время как *M. formicicum* выдерживала не более 14% CO (Kluver, Schnellen, 1947).

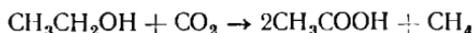
Баркер (Barker, 1936b) наблюдал в накопительных культурах, но не выделил в чистые, еще ряд метанообразующих микроорганизмов.

Methanobacterium soehngenii Barker, 1936. Организм был впервые обнаружен Зёнгом преимущественно в накопительных культурах с маслянокислым кальцием и хорошо распознается по образованию характерных агрегатов. Эти агрегаты (Barker, 1936b) состоят из цепочек клеток, напоминающих трихомы. Отдельные клетки распознаются только после окраски. Цепочки располагаются параллельно друг другу, а все вместе образуют в жидкой культуре рыхлые округлые комки или мотки. Глубинные колонии в агаре имеют компактный центр, а вокруг расходятся нити. Отдельные клетки палочковидные, слегка изогнутые, неподвижные, грамотрицательные. Строгие анаэробы. Образуют метан из уксусной и масляной кислот. Элективная среда для накопления — Баркера с масляной кислотой. В чистой культуре не получены.

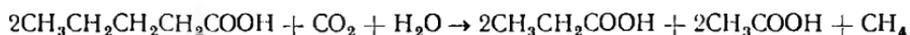
Methanococcus mazei Barker, 1936. Обнаружен в садовой почве, черных сероводородных илах, стоячих водах, навозе травоядных. Один из наиболее активных метанообразующих микроорганизмов. Морфологически это мелкие кокки неправильной формы, которые напоминают почкующиеся организмы, располагаются одиночно или неправильными скоплениями, иногда значительными. Положительно, но нестабильно красятся по Грамму. Строгие анаэробы, растут при 30—37° С. Накопительную культуру получают на среде с уксуснокислым кальцием. На агаре с 2% экстракта ила из метантенка медленный рост с обильным газообразованием. Организм использует водород с углекислотой, ацетат и масляную кислоту в присутствии углекислоты.

По Баркеру (Barker, 1956) физиологические типы метанобактерий достаточно разнообразны для того, чтобы обеспечить полное превращение в метан продуктов брожений, вызываемых другими организмами. Продуктами ряда брожений являются водород и углекислота, которые используются *Methanobacterium formicum*, *M. ruminantium*.

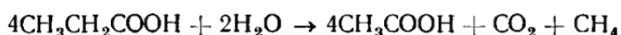
Спирты в соответствующие кислоты и кетоны окисляет «*M. otjeljanskii*»:



Образующиеся кислоты используются последующими организмами. Насыщенные жирные кислоты (капроновая, валериановая, масляная) через бета-окисление, сопряженное с восстановлением CO_2 , превращаются в метан «*Methanobacterium suboxydans*», причем, помимо метана, образуются уксусная и пропионовая кислоты:



Накапливающаяся пропионовая кислота разлагается «*Methanobacterium propionicum*» в уксусную кислоту и углекислоту:



Уксусная кислота является продуктом разнообразных брожений, вызываемых не метанобразующими организмами, может образовываться при восстановлении углекислоты водородом и накапливается при разложении по вышеприведенной последовательности реакций; по имеющимся данным она представляет основное соединение, через которое происходит превращение в метан органических веществ. Уксусная кислота разлагается в истинном брожении такими организмами, как *Methanobacterium söhngrenii*, *Methanosarcina*, *Methanococcus mazei*.

Кроме того, метанобразующие бактерии способны превращать в метан такие одноуглеродные соединения, как окись углерода и метанол, пути биосинтеза которых неясны.

Для метабиотической последовательности реакций, предположенной Баркером, характерно, что все реакции до образования уксусной кислоты согласуются с уравнением водородной редукции углекислоты. Эти реакции могут осуществляться смесью бродящего организма, который выделяет водород, углекислоту, и метанобразующего, такого как *M. formicicum*. Единственной подробно изученной культурой является «*Methanobacillus omeljanskii*», которой был посвящен целый ряд работ.

Омелянский (1916) описал культуру, которая образовывала метан из этанола. Баркер (Barker, 1940) выделил организм, осуществляющий эту реакцию, и назвал его сначала *Methanobacterium omeljanskii*, а потом, когда были обнаружены неустойчивые к нагреванию споры, — *Methanobacillus omeljanskii*. Этому организму приписывалась способность использовать этанол и другие простые спирты с образованием уксусной кислоты и других кислот из первичных спиртов и кетонов — из вторичных. Кроме простых спиртов, культура использовала для синтеза метана водород и углекислоту. На этой культуре была установлена биохимическая последовательность реакций, ведущих к образованию метана через производные фолиевой кислоты (Wolfe et al., 1966). Было обнаружено, что в отсутствие углекислоты суспензии клеток выделяют водород и могут превращать этанол в ацетальдегид (Johns, Barker, 1960). В 1967 г. было показано, однако (Bryant et al., 1967, 1968), что культура *M. omeljanskii* на самом деле представляет симбиотическую ассоциацию двух организмов, из которых метанобразующий организм может использовать только водород и углекислоту, но не органические вещества, а второй организм выделяет водород из органических соединений, но развивается только при быстром и полном удалении водорода. Поводом для исследования послужило то обстоятельство, что пересев культуры, выросшей в атмосфере углекислоты и водорода, обратно на среду с этанолом оказывался безрезультатным. Клетки обоих организмов на среде с этанолом лишь слабо различались под микроскопом. Не образующий метан организм — короткая слегка изогнутая подвижная палочка с тремя перитрихально расположенными жгутиками, могла расти совмест-

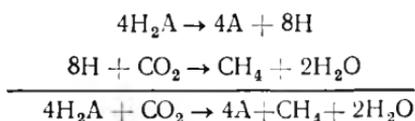
но с *M. formicicum* или *M. ruminantium* на среде с этанолом. Позрнь ни один из организмов на среде с этанолом не рос. Метанобразующий организм из культуры был сходен с *M. formicicum*, отличаясь только неспособностью разлагать формиат. Это тонкие цилиндрические неправильно изогнутые палочки, часто в цепочках. Неспоровые, неподвижные, грамотрицательные. Синтетическая среда для них содержит минеральные вещества, витамины группы В, цистеин, сульфид. Добавление ацетата в высокой степени стимулирует рост.

Культура «*Methanobacterium suboxidans*» (Stadtman, Barker, 1951a) была выделена из черного ила бухты Сан-Франциско в накопительную культуру с *Desulfovibrio*. Это маленькая тонкая изогнутая палочка, которую трудно отличить от вибрионов в старых культурах. В молодых культурах метанобразующий организм кажется более длинным и тонким, чем *Desulfovibrio* и, кроме того, «подвижен как слизняк». Клетки содержат много гранул. Грамположительный, но окраска нечеткая: обнаруживаются все промежуточные окраски. Неясно, образует ли споры. Организм не сбраживает ацетат и пропионат. Использует жирные кислоты с четным и нечетным числом атомов. Четные превращает в метан и уксусную кислоту, нечетные — в метан и пропионовую кислоту. Метан образуется из углекислоты.

«*Methanobacterium propionicum*» (Stadtman, Barker, 1951a) — использующая пропионат культура — развивалась очень медленно, причем преобладающей формой была грамположительная короткая относительно толстая палочковидная или кокковидная бактерия. В жидкой культуре давала равномерную муть. Клетки неравномерно окрашивались и содержали блестящие гранулы.

БИОХИМИЯ ОБРАЗОВАНИЯ МЕТАНА

В 1930 г. ван Ниль предположил (цит. по Barker, 1936a, 1949), что образование метана есть процесс восстановления углекислоты, причем восстановителем может быть любое органическое вещество (А) или водород:



Это предположение объясняло, почему вне зависимости от природы субстрата продуктом обмена является метан, а не другой углеводород. Окисляемое органическое вещество служило источником водорода, углеродный скелет его не использовался. Эта гипотеза устанавливает очень близкую аналогию между восстановлением сульфатов и восстановлением углекислоты. Она получила подтверждение в экспериментах двух типов. Во-первых, Баркер

(Barker, 1936a) показал, что разложение различных субстратов метанообразующими бактериями стехиометрически соответствует уравнению, в котором окислителем служит углекислота. Исключение составляет лишь сбраживание ацетата и метанола. Во-вторых, изотопные опыты показали, что углерод метана происходит из углекислоты (Barker, 1949; Stadtman, Barker, 1951a,b).

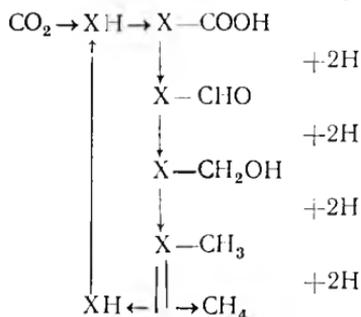
Образование метана из углекислоты предполагает четыре ступени восстановления при переносе двух атомов водорода. Эти ступени соответствуют следующим свободным одноуглеродным соединениям (Stadtman, 1967) с соответствующим изменением свободной энергии:



Однако представление, что свободные соединения являются стадиями восстановления метана, не оправдалось. Ни одна метанообразующая бактерия не могла использовать все эти соединения, хотя некоторые виды использовали тот или иной набор веществ из этой серии. Исследования с меченым углеродом показали, что при восстановлении углекислоты не образуются такие меченые соединения, которые обменивались бы с немечеными C_1 -соединениями, вносимыми в среду. Отсюда следовало, что промежуточные продукты, соответствующие по уровню восстановленности приведенным одноуглеродным соединениям, находятся в клетке в связанном состоянии. Поэтому Баркер (Barker, 1956) предположил две альтернативные возможности образования метана. По первой из них метан образуется из органического вещества в циклическом механизме, аналогичном, например, рибулозодифосфатному циклу. Сам рибулозодифосфатный цикл, характерный для аэробов, не может быть использован по термодинамическим соображениям, так как на восстановление одного углерода здесь затрачивается больше АТФ, чем может быть получено при восстановлении метана. Прямые определения включения меченой углекислоты в обмен метанообразующих бактерий показали, что фосфорилированные продукты, характерные для рибулозодифосфатного пути, не образуются (Stadtman, 1967), а появляются меченые органические кислоты и аминокислоты (C_1 -аланин, C_1 -пируват, C_1 -глутамат, кетоглутарат, метионин, аспарат). Образование этих соединений не противоречит восстановительному циклу органических кислот, тем более что пируватсинтаза у этих бактерий обнаружена (Brill, 1965). Углерод карбоксила пировиноградной кислоты быстро превращается в метан, ее первый и второй атомы углерода — в ацетат. Кофактором реакции является коэнзим А. Стимуляция образования метана коэнзимом А была отмечена только при использовании водорода и углекислоты как субстратов.

По второй альтернативе Баркера, последовательному восстановлению в клетке подвергаются не свободные одноуглеродные соеди-

нения, а их связанные с гипотетическим переносчиком X формы:



Подтверждением этой гипотезы было обнаруженное в экстрактах метанобразующих бактерий выделение метана из соединений, которые у других организмов служат переносчиками одноуглеродных групп.

Первые реакции фиксации углекислоты метанобразующими бактериями остаются неясными. Быстро обмениваются с меченой углекислотой только муравьиная кислота и карбоксил пировиноградной кислоты.

Следующий этап восстановления, соответствующий по уровню альдегиду, осуществляется предположительно через участие формилтетрагидрофолатсинтазы, активность которой была обнаружена у *Methanosarcina barkeri*. Реакция требует АТФ и приводит к синтезу из формиата N¹⁰-формилтетрагидрофолата.

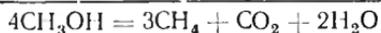
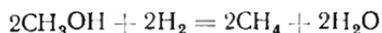
В экстрактах «*Methanobacillus omeljanskii*» были обнаружены ферменты, обеспечивающие взаимные превращения соответствующих формиату, формальдегиду и метанолу производных тетрагидрофолата (Wood et al., 1965; Wolfe et al., 1966). N⁵-формилтетрагидрофолат восстанавливается в N⁵, N¹⁰-метилтетрагидрофолат, который в свою очередь НАДН-редуктазой восстанавливается в N⁵-метилтетрагидрофолат. Все эти соединения могут служить источниками метана под действием экстрактов метанобразующих бактерий в атмосфере водорода и в присутствии АТФ. В отсутствие АТФ бесклеточные препараты осуществляют обратную реакцию, образуя углекислоту. По этим данным, тетрагидрофолат может быть переносчиком C₁-единиц при образовании метана.

Восстановление C₁-соединений при образовании метильной группы в биосинтетических реакциях, например при синтезе метионина, наблюдается у многих организмов, неспособных к выделению метана. Пока не решена количественная сторона вопроса, остается неясным, является ли приведенный путь восстановления одноуглеродных соединений единственно возможным в энергетических реакциях метанобразующих бактерий, или же наблюдаемые реакции соответствуют биосинтетическим потребностям организма.

Последний этап образования метана вызывает меньше сомнений. Переносчиком являются производные витамина B₁₂, которыми ме-

танобразующие бактерии исключительно богаты. Метилированная форма V_{12} , метилкобаламин, восстанавливается в CH_4 в присутствии таких доноров водорода, как пируват или водород. Экстракты *M. barkeri* синтезируют метилкобаламин из субстратных количеств V_{12} и C^{14} -метанола (Blaylock, Stadtman, 1966). Ингибитор соединений типа V_{12} — гликоптерин подавлял образование метана из всех исследованных субстратов. Для синтеза метилкобаламина из метанола и V_{12} требовались корриноидный белок, ферредоксин и неидентифицированный белок. Все исследованные ферментные системы нуждались в добавлении как кофактора АТФ, по-видимому, для реактивации V_{12} в форме коэнзима.

Таким образом, полученные данные согласуются со схемой Баркера, и вместо гипотетического переносчика X можно подставить производные фолиевой кислоты и витамина V_{12} . Представления о пути превращения таких одноуглеродных соединений, как формиат, окись углерода у метанобразующих бактерий исходят из того, что используемые этими организмами вещества могут превращаться в углекислоту и молекулярный водород. Такие соединения, как метанол и уксусная кислота, превращаются в метан без потери водорода метильной группы (Pine, Vishniac, 1957). Согласно этим авторам, при брожении метанола одна молекула его окисляется до муравьиной кислоты, а другая восстанавливается в метан и водород. Муравьиная кислота разлагается на углекислоту и водород, которые участвуют в реакции водородной редукции метанола и углекислоты:



В накопительных культурах метаносарцины нами было обнаружено выделение водорода из метанола в краткосрочных опытах; состав бактерий-спутников также указывает на возможность протекания этих реакций. Пайн и Вишняк (Pine, Vishniac, 1957) полагают так же, что и при сбраживании ацетата происходит образование «эндогенного метанола» из метильной группы ацетата. Это предположение объясняет, почему ацетат — единственное неоднородное соединение, непосредственно используемое метанобразующими бактериями.

Несмотря на значительные успехи в расшифровке последовательных стадий восстановления углекислоты в метан, энергетический обмен метанобразующих бактерий остается невыясненным. Неизвестно, какие стадии превращений субстрата служат источником АТФ. Исходя из данных по урожаю метанобразующих бактерий, приходится допускать у них наличие окислительного фосфорилирования. Исследование роста *Methanobacterium formicicum* штамм М. о. н.

в смеси водорода и углекислоты показало, что вся углекислота превращается в метан, но водорода на 1 моль метана потребляется не 4 моля, а меньше — 3,7—3,85 моля, и, следовательно, часть восстановителя поступает из органических добавок к среде. При пропускании через суспензию клеток смеси $H_2 + CO_2$ в клетках одновременно с образованием метана начинается синтез АТФ и зеркально уменьшается содержание АМФ. Концентрация АДФ возрастает медленно, оставаясь почти постоянной. Добавление 5% воздуха к газовой смеси прекращало образование метана, содержание АТФ падало, а АМФ поднималось до прежнего уровня. Так же действовал хлороформ. Разобщители окислительного фосфорилирования подавляли образование метана в целых клетках и экстрактах. Между образованием метана и энергетическим зарядом клетки существовала прямая пропорциональная зависимость (Robertson, Wolfe, 1970).

В качестве переносчика электрона у метанобразующих бактерий функционируют НАД и ферредоксин, остальные возможные переносчики не выяснены. Акцепторы электрона с низким окислительно-восстановительным потенциалом меньше $-0,36$ в подавляют образование метана из углекислоты.

Как видно из изложенного, механизмы восстановления углекислоты при разложении ацетата и метанола или при восстановлении молекулярным водородом различаются незначительно, хотя в первом случае формально происходит брожение, а во втором — анаэробное дыхание. Несмотря на то, что метанол является ближайшим предшественником метана, сбраживание метанола осуществляет ограниченное число видов, в то время как восстановление углекислоты водородом — универсальная функция метанобразующих бактерий.

Относительно конструктивного обмена метанобразующих бактерий нет четких представлений. Факт, что некоторые из этих организмов могут развиваться в минеральной среде с добавлением одного-единственного источника углерода, указывает на наличие развитого биосинтетического аппарата. Более подробные биохимические исследования были проведены с культурой «*Methanobacillus omljanskii*». Оказалось, что в этой культуре по крайней мере 3% углерода происходит из углекислоты, которая включается в такие нефосфорилированные продукты, как органические кислоты и аминокислоты. Углеродные скелеты аспарагиновой кислоты, аланина, глицина, серина и треонина образовывались из пирувата, который возникал путем C_1-C_2 конденсации. Лизин, пролин, метионин, валин образовывались так же, как у *E. coli*, но глутаминовая кислота синтезировалась иначе, чем у аэробов (Knight et al., 1966).

Источником азота для метанобразующих бактерий служат соли аммония, но в культуре «*M. omljanskii*» была обнаружена фиксация атмосферного азота. Соединения серы обычно даются в среду в восстановленном виде.

Вряд ли можно характеризовать в общей форме тип обмена всех метанобразующих бактерий. Среди них есть и литотрофные формы, способные использовать лишь углекислоту и водород, и органотрофные организмы, сбраживающие органические соединения. Возможно, что некоторые из них автотрофны, хотя более вероятно, что они осуществляют литогетеротрофный обмен подобно сульфатвосстанавливающим бактериям. Предлагаемая ниже схема (схема 11) обмена метанобразующих бактерий может рассматриваться лишь как очень предварительная. Восстановитель обеспечивает восстановление ферредоксина, который является наиболее важным переносчиком у этих организмов. Восстановление углерода происходит через ряд этапов, причем переносчиками C_1 -соединений служат производные фолиевой кислоты и витамина B_{12} . Включение CO_2 в конструктивный обмен происходит через реакцию пируватсинтазы. Синтез аминокислот в общем соответствует известным путям образования этих соединений. Механизм образования АТФ неизвестен.

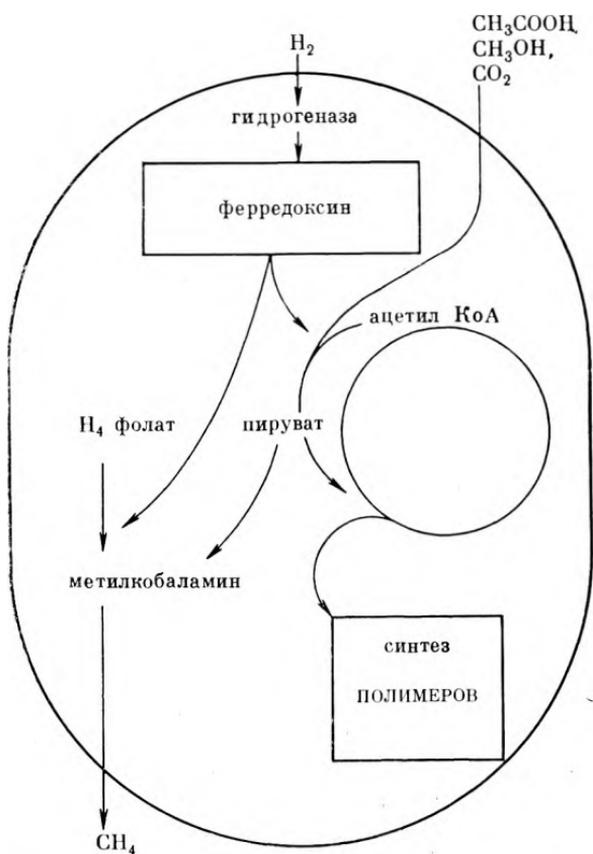


Схема 11. Обмен метанобразующих бактерий

ОБРАЗОВАНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ИЗ УГЛЕКИСЛОТЫ И ВОДОРОДА

В культурах термофильных метанобразующих бактерий, росших на метаноле, Панцхава и Пчелкина (1969) обнаружили образование уксусной кислоты, предшествовавшее образованию метана. Накопительная культура была получена из метантенка и затем очищена методом десятикратных разведений и выделением отдельных колоний на агаризованной среде. Авторы считали, что получили чистую культуру, представлявшую тонкие палочки $0,5-0,7 \times 1,2-1,62 \text{ мк}$, окруженные слизистой капсулой. В семидневной культуре образовались споры. Культура развивалась на метаноле при $52-57^\circ$. Чистоту культуры определяли по микроскопической картине, но на представленной ими микрофотографии морфология клеток разнообразна. Образование уксусной кислоты было подтверждено газовой хроматографией.

Синтез уксусной кислоты из углекислоты найден у клостридиев, осуществляющих так называемое гомоацетатное брожение, где ацетат является основным продуктом (Ljungdahl, Wood, 1969). Известны также реакции синтеза муравьиной кислоты из CO_2 анаэробными гетеротрофными бактериями.

При разложении органических соединений в метантенках на первом этапе процесса образуются летучие органические кислоты, прежде всего уксусная. Исследуя анаэробное потребление окиси углерода сточными водами, Фишер, Винцер и Лиске (Fischer et al., 1931) обнаружили значительное образование летучих кислот. Синтез летучих кислот происходил также в атмосфере углекислоты и водорода, причем потребление газов соответствовало синтезу из них ацетата по уравнению:



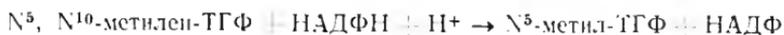
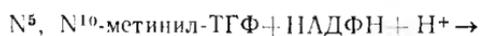
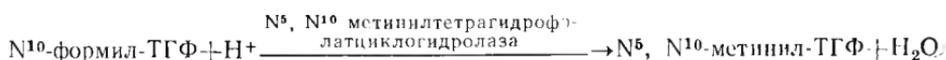
Виеринга (Wieringa, 1936, 1940) выделил микроорганизм, вызывавший этот процесс, и назвал его *Clostridium aceticum*. Возможно, что ранее этот организм уже наблюдал Зёнген. Органотрофный рост *Clostridium aceticum* был исследован Баркером (Barker, 1949). Этот организм близок многим другим анаэробным споровым бактериям, у которых в синтезе ацетата участвует углекислота.

Выделение аналогичного организма было осуществлено Эль-Газзави (El Ghazzawi, 1967) из сероводородного ила. В отличие от штамма Виеринга, вновь выделенный организм образовывал не только уксусную, но и муравьиную кислоту; его было предложено назвать *Clostridium formico-aceticum*.

Выделенные организмы представляли подвижные граммотрицательные палочки с терминальной спорой плектридиального типа. Это строгие анаэробы; при росте в атмосфере водорода и углекислоты нуждаются в органических веществах.

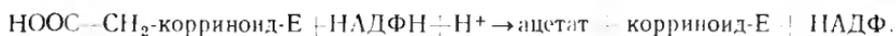
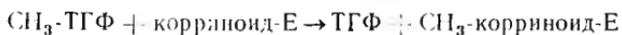
В настоящее время известно, что синтез ацетата из углекислоты могут осуществлять многие гетеротрофные микроорганизмы, среди них *Clostridium acidurici*, *C. cylindrosporium*, *Peptococcus glycinophilus*, *Butyribacterium rettgeri*. Подробнее путь фиксации углекислоты был изучен у *Clostridium thermoaceticum*. Льюнгдал и Вуд (Ljungdahl, Wood, 1969) пришли к заключению, что синтез метильной группы ацетата этим гетеротрофным микроорганизмом аналогичен синтезу метильной группы метионина и образованию метана. Три пути различаются только последней ступенью. При синтезе метионина метильная группа переносится на гомоцистеин, при образовании метана восстанавливается в метан, при образовании ацетата карбоксилируется и восстанавливается в ацетат. Во всех трех метаболических путях участвуют тетрагидрофолат и производные витамина В₁₂.

Первым этапом является восстановление углекислоты в формат, механизм которого остается еще неизвестным. Формат восстанавливается в метильную группу тетрагидрофолата (ТГФ) с затратой молекулы АТФ и двух молекул НАДФН по следующим реакциям:



Соответствующие ферменты были найдены у клостридиев, образующих ацетат. Тетрагидрофолатный путь у этих организмов совпадает с последовательностью реакций, предположенной при синтезе метана (см. выше). N⁵—C¹⁴H₃-ТГФ в присутствии пирувата превращается в ацетат, причем метильная группа ацетата получает метку.

Эти реакции осуществляются с участием корриноидов, где корриноид-Е представляет ферментный комплекс:



Как видно из представленной последовательности реакций, она проходит с потреблением АТФ. При гомоацетатном брожении у *Clostridium thermoaceticum* недостающий АТФ поставляет субстратное фосфорилирование при распаде глюкозы, для метанобразующих бактерий этот источник АТФ недостаточен и при образовании метана происходит не расхождение, а образование АТФ. Это

обстоятельство заставляет с осторожностью относиться к возможности полного совпадения катаболических и анаболических путей, представленных соответственно образованием метана и метионина.

Сходство предполагаемых биохимических путей образования ацетата при гомоацетатном брожении и метана метанобразующими бактериями привлекает особое внимание к организмам, описанным Панцхава и Пчелкиной (1969). Однако для решающего доказательства здесь необходимы не столько биохимические, сколько микробиологические методы — уверенность в чистоте культуры.

Таким образом, по имеющимся в настоящее время данным, литотрофные организмы, которые могли бы существовать за счет синтеза из углекислоты и водорода иных продуктов, чем метан, по-видимому, отсутствуют. Образование органических кислот из углекислоты свойственно многим органогетеротрофным анаэробам, прежде всего клостридиям.

ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАНА В ПРИРОДЕ

Уже первые наблюдения в природе показали, что метан образуется практически из любого органического вещества. На первом этапе работы с микроорганизмами было установлено, что метанобразующая микрофлора способна использовать для образования метана все основные классы органических соединений, продуцируемых живыми организмами (Омелянский, 1906а). Способность метанобразующей микрофлоры производить глубокое разложение разнообразных органических веществ послужила основой для применения ее в анаэробной очистке сточных вод. Процессы, происходящие в метантенках, могут служить моделью природных процессов, которые обуславливают образование газов метановой группы. Ход реакций в принципе одинаков и в илах пресноводных водоемов (Кузнецов, 1952) и в почвах (Коуата, 1964).

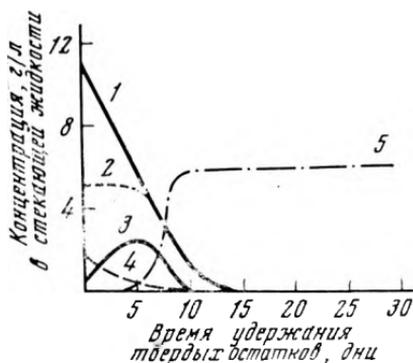
В метантенках (рис. 27) разложение органических веществ сопровождается на первом этапе синтезом летучих органических кислот. Второй этап состоит в образовании метана и исчезновении летучих кислот.

Разнообразие используемых при образовании метана органических веществ находится в резком противоречии со способностью чистых и даже только очищенных накопительных культур метанобразующих бактерий расти лишь на немногих веществах. Принимается, что к образованию метана приводит последовательная деятельность различных групп анаэробных бактерий, причем собственно метанобразующие бактерии выступают только на последнем этапе.

Рассмотрим в качестве примера превращения основного компонента растительных оболочек — целлюлозы. Начиная с работы Гоппе-Зейлера (Hoppe-Seiler, 1886), известно, что целлюлоза под

Рис. 27. Ход процесса разложения органических веществ в метантенке (McCarty, 1966)

- 1 — сумма органических веществ, определенная как потеря веса при прокаливании (600°);
- 2 — липиды;
- 3 — летучие кислоты;
- 4 — белок;
- 5 — метан



Воздействием микроорганизмов практически полностью превращается в метан и углекислоту. Омелянский (1906а) установил два типа анаэробных превращений клетчатки: водородное брожение и метановое брожение. Однако в дальнейшем исследователи пришли к категорическому заключению, что при разложении клетчатки чистые культуры метана совершенно не образуют. При сбраживании целлюлозы, так же как при сбраживании глюкозы, помимо углекислоты и водорода образуются муравьиная, уксусная, молочная кислоты и этиловый спирт. Был сделан вывод, что «при распаде целлюлозы не образуется метана, а возникает большое количество продуктов, которые могут быть использованы различными микроорганизмами для образования метана. Именно поэтому разложение целлюлозы в природе постоянно сопровождается выделением большого количества метана» (Имшенецкий, 1953, стр. 242).

Эти представления, выработанные на чистых микробиологических культурах, согласуются с кинетикой процесса в метантенках: выделение метана начинается после образования летучих кислот и сопровождается уменьшением их концентрации, разложение нерастворимых органических веществ на первом этапе не приводит к образованию метана (рис. 27, 28).

Качественно метаботическая ассоциация метанобразующих микроорганизмов работает следующим образом. Биополимеры, в первую очередь клетчатка, разлагаются анаэробной микрофлорой до простых углеводов, органических кислот, аминокислот. Разложение этих соединений по типу маслянокислого или смешанного брожения приводит к образованию водорода и углекислоты, которые немедленно могут быть использованы водородными метанобразующими бактериями группы *M. formicicum*. Органические кислоты и спирты разлагаются симбиотической группировкой метанобразующих бактерий, описанной Баркером (Barker, 1956). Разложение органических кислот по типу β -окисления приводит к накоплению уксусной кислоты. Эта кислота может так же синтезироваться из водорода и углекислоты по реакциям гомоацетатного брожения. Накапливающаяся уксусная кислота подвергается непосред-

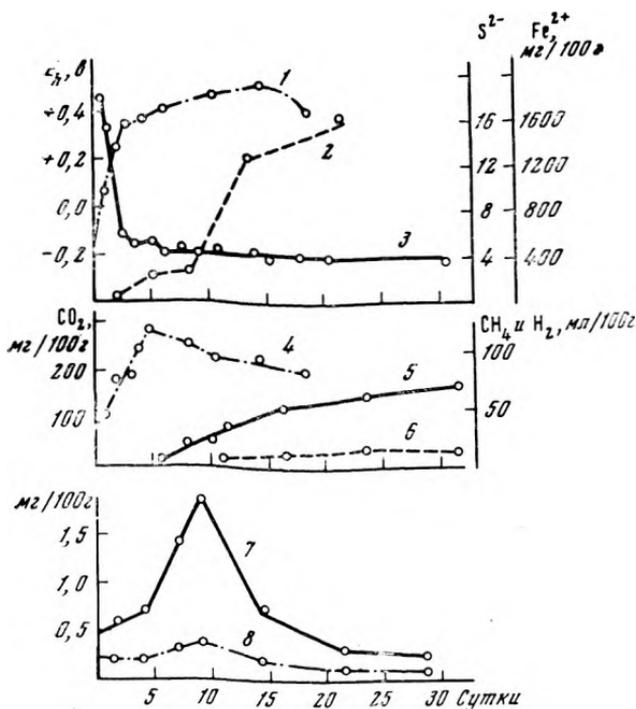


Рис. 28. Ход химических процессов в затопленной почве (Коята, 1964)

1 — концентрация Fe^{2+} ; 2 — концентрация сероводорода; 3 — окислительно-восстановительный потенциал; 4 — углекислота; 5 — метан; 6 — водород; 7 — уксусная кислота; 8 — муравьиная кислота

ственному разложению с выделением метана из метильной группы метанообразующими бактериями группы *Methanosarcina*. Кроме того, метанообразующие бактерии способны превращать в метан метанол, органическое соединение, биосинтез которого неясен. Разложение муравьиной кислоты и окиси углерода через превращение их в смесь водорода и углекислоты дополняют метаболические возможности метанообразующих бактерий.

Таким образом, метабиотическая система микроорганизмов действует по тому же принципу, как и система ферментов внутри организма: разнообразные органические вещества, разлагаясь, превращаются в ограниченное число простых соединений, которые и используются.

Количественное соотношение путей разложения органических соединений через синтез метана из углекислоты и через разложение уксусной кислоты удалось установить, применив изотопы. Эти данные привели к выводу, что 70—75% метана в иле метантенков образуются при разложении уксусной кислоты и 25—30% — путем

синтеза из углекислоты и водорода. Вместе с тем количество метанобразующих бактерий составляет для водородных метанобразующих бактерий — 10^7 клеток/мл, для разлагающих уксусную кислоту — 10^5 — 10^6 , а пропионат и бутират — 10^6 — 10^7 клеток/мл (Smith, 1966).

Метанобразующие бактерии составляют конечный этап анаэробных превращений органического вещества, подобно тому, как другие литотрофы, образуя наиболее окисленные соединения, замыкают аэробную цепь превращений.

Для вступления продуктов этих цепей превращений в круговорот веществ необходим этап физического переноса из аэробной зоны в анаэробную и обратно. Такой круговорот наиболее наглядно иллюстрируется на примере озер: продукты развития организмов в аэробной зоне в виде тел отмерших организмов под действием силы тяжести оседают и переносятся в анаэробную зону, а продукты жизнедеятельности анаэробных микроорганизмов, восстановленные газы, поднимаются в окисленную зону. Выделение газов в озерах может приводить к «метановой конвекции» (Ohle, 1958). Если же физический перенос невозможен, то продукты жизнедеятельности накапливаются.

Образование горючих газов метановой группы расценивается сейчас геохимиками как преимущественно микробиологический процесс. При образовании метана происходит использование водорода и углекислоты, и действительно, присутствие водорода в подземных газах скорее исключение, чем правило. Газ, выделяющийся из ила озер и болот, содержит до 80% метана и лишь около 1% водорода. Это указывает на быстрое и полное использование его в анаэробных процессах. Накопление метана показывает, что в анаэробных процессах как восстановитель он не используется.

Конкурентами метанобразующих бактерий являются сульфатвосстанавливающие, которые так же используют водород. Поэтому данные процессы до известной степени взаимноисключающие: образование метана приурочено преимущественно к пресным водам, образование сероводорода — к соленым, хотя, конечно, и те и другие организмы встречаются и в пресных и в соленых водоемах.

О масштабах образования метана и водорода из расчета за земной шар за год можно судить по следующим данным (Койата, 1964):

	CH ₄	H ₂
Затопляемая почва	$1,9 \cdot 10^{14}$	$1,3 \cdot 10^{10}$
Пищеварение животных	$4,5 \cdot 10^{13}$	$3,1 \cdot 10^9$
Каменный уголь	$2 \cdot 10^{13}$	$1,4 \cdot 10^9$
Лука	$1 \cdot 10^{13}$	$0,7 \cdot 10^9$
Леса	$4 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^7$
Всего	$2,7 \cdot 10^{14}$	$1,8 \cdot 10^{10}$

О происхождении метана можно судить по его изотопному составу. При развитии метанобразующих бактерий наблюдается некоторое разделение стабильных изотопов углерода C^{12} и C^{13} . Кинетический эффект, способствующий выделению $C^{12}O_2$, снижается при воздействии таких бактерий, как сульфатвосстанавливающие и метанобразующие. В результате роста метанобразующих бактерий происходило обогащение CH_4 легким изотопом, причем эффективность разделения снижалась при повышении температуры. Результаты опытов с метановым брожением убеждают, что при микробиологическом разложении органического вещества, особенно в присутствии смешанных культур, одновременно или последовательно протекает ряд процессов, находящихся в сложной зависимости один от другого и, возможно, характеризующихся изотопными эффектами разного знака. По мере течения метанового брожения коэффициент разделения изотопов в смеси CO_2/CH_4 уменьшился от 1,083 до 1,066, приближаясь к теоретическому термодинамическому значению 1,061.

Природный болотный газ — метан болотного происхождения — наиболее обогащен легким изотопом углерода C^{12} по сравнению со всеми другими природными соединениями углерода. Напротив, углекислота болотного газа оказывается несколько обогащенной C^{13} . Метан молодых осадочных пород своим аномально легким углеродным составом существенно отличается от газов нефтяных месторождений и метана, рассеянного в стратосфере. Изотопный состав углекислоты в лабораторных опытах почти совпадает с изотопным составом исходного органического вещества, в то время как в болотном газе обогащение метана менее значительно, но углекислота в большей степени накапливает тяжелый изотоп.

Метан, выделяющийся из углей, практически не отличается по изотопному составу от метана газовых месторождений. В молодых месторождениях его состав близок к составу болотного газа. Следует заметить, что при миграции газов в породах в некоторых случаях происходит обогащение легким изотопом. По разрезу осадочных месторождений происходит закономерное изменение изотопного состава: более глубоко залегающий газ обогащен тяжелым изотопом.

Изотопный анализ позволяет выделить несколько зон образования CH_4 . Микробиологические процессы идут на глубине до 300—500 м в масштабах, обеспечивающих образование значительных газовых скоплений. Примером может служить Аккуловско-Базайская площадь, где залежь метана микробиологического происхождения находится на глубине 300—400 м. Ниже находится зона каталитической генерации метана. Изотопный обмен системы CO_2/CH_4 здесь не работает, так как температура слишком низка, а бактериальная деятельность практически отсутствует. На еще больших глубинах и на термальных площадках, примыкающих к районам тектонической активности, появляется действие неорганической системы CO_2/CH_4 , и значения изотопного состава ложатся на теоре-

тический кривую. В этой зоне вне зависимости от происхождения газа изотопный состав определяется местными температурными условиями и относительными концентрациями CH_4 и CO_2 (Галимов, 1968).

ЛИТЕРАТУРА

- Галимов Э. М. 1968. Геохимия стабильных изотопов углерода. М., «Недра».
- Жилина Т. Н. 1971. Тонкое строение метаносарцины. — Микробиол., **40**, 674.
- Имшенецкий А. А. 1953. Микробиология целлюлозы. М., Изд-во АН СССР.
- Кузнецов С. И. 1952. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в озерах. М., Изд-во АН СССР.
- Лебедев А. Ф. 1910. Исследование хемосинтеза у *Bacillus hydrogenes*. Одесса.
- Омелянский В. Л. 1902. О метановом брожении клетчатки. — В кн.: Избр. труды, **1**, 55, 1953. М., Изд-во АН СССР.
- Омелянский В. Л. 1906а. О выделении метана в природе при биологических процессах. — В кн.: Избр. труды, **1**, 427, 1953. М., Изд-во АН СССР.
- Омелянский В. Л. 1906б. О разделении водородного и метанового брожения клетчатки. — В кн.: Избр. труды, **1**, 82, 1953. М., Изд-во АН СССР.
- Омелянский В. Л. 1916. Метановое брожение этилового спирта. К юбилею И. И. Мечникова. — В кн.: Избр. труды, **1**, 458, 1953. М., Изд-во АН СССР.
- Паничева Е. С. 1967. Современные представления о механизме биосинтеза метана метанобразующими бактериями. — Успехи микробиол., **4**, 97.
- Паничева Е. С., Пчелкина В. В. 1969. Метод выделения накопительных культур и чистых культур термофильных метанобразующих бактерий, сбраживающих этиловый и метиловый спирты. — Прикл. биохим. микробиол., **5**, 291.
- Barker H. A. 1936a. On the biochemistry of the methane fermentation. — Arch. Mikrobiol., **7**, 404.
- Barker H. A. 1936b. Studies upon methane producing bacteria. — Arch. Mikrobiol., **7**, 420.
- Barker H. A. 1940. Studies on methane fermentation. VI. The influence of carbone dioxide concentration on the rate of carbone dioxide reduction by molecular hydrogen. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **29**, 184.
- Barker H. A. 1949. Le metabolisme des gas par les bactéries anaerobies. — Ann. Inst. Pasteur, **77**, 361.
- Barker H. A. 1956. Bacterial fermentation. N. Y., J. Wiley.
- Blaylock B., Stadtman T. 1966. Methane biosynthesis by *Methanosarcina barkeri*. Properties of the soluble enzyme system. — Arch. Biochem. and Biophys., **116**, 138.
- Brill W. J. 1965. CO_2 fixation into pyruvate by extracts of *Methanobacillus omeljanskii*. — Diss. Abstr., **26**, 2445.
- Bryant M. P., Wolin E. A., Wolin M. J., Wolfe R. S. 1967. *Methanobacillus omeljanskii*: a symbiotic association of two species of bacteria. — Arch. Microbiol., **59**, 20.
- Bryant M. P., Mc Bride B. C., Wolfe R. C. 1968. Hydrogen oxidizing methane bacteria. I. Cultivation and methanogenesis. — J. Bacteriol., **95**, 1118.
- Buraczewski G. 1964. Methane fermentation of sewage sludge. I. The influence of physical and chemical factors on the development of methane bacteria and the course of fermentation. — Acta microbiol. polon., **13**, 321.
- Buraczewski G. 1966. Methane fermentation of sewage sludge. III. The rate of methane formation from short chain fatty acids. — Acta microbiol. polon., **15**, 85.
- Buswell A. M., Sollo F. W. 1948. The mechanism of methane fermentation. — J. Amer. Chem. Soc., **70**, 1778.
- Canale-Parola E. 1970. Biology of sugar-fermenting sarcinae. — Bacteriol. Revs., **34**, 82.

- El Ghazzawi E.* 1967. Neuisolierung von *Clostridium aceticum* Wieringa und stoffwechselfysiologische Untersuchungen. — Arch. Mikrobiol., 57, 1.
- Fischer F., Lieske R., Winzer K.* 1931. Die Umsetzung des Kohlenoxyds. — Biochem. Z., 236, 247.
- Hoppe-Seyler Z.* 1886. Über die Gährung mit Bildung von Methan und Kohlensäure. — Zbl. physiol. Chem., 10, 207.
- Johns A. T., Barker H. A.* 1960. Methane formation: fermentation of ethanol in the absence of carbone dioxide by *Methanobacillus omelianskii*. — J. Bacteriol., 8, 837.
- Kluyver A. J., van Niel C. M.* 1936. Prospects for natural system of classification of bacteria. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., 94, 391.
- Kluyver A. J., Schnellen Ch. G. T. P.* 1947. On the fermentation of carbon monoxide by pure cultures of methane bacteria. — Arch. Biochem., 14, 57.
- Knight M., Wolfe R. S., Elsdon S. R.* 1966. The synthesis of amino acids by *Methanobacterium omelianskii*. — Biochem. J., 99, 76.
- Koyama T.* 1964. Gaseous metabolism in lake sediments and paddy soils. — Advances organ. Geochem. Pergamon Press, Oxford-London, p. 363.
- Langenberg K. F., Bryant M. P., Wolfe R. S.* 1968. Hydrogen oxidizing methane bacteria. II. Electron microscopy. — J. Bacteriol., 95, 1124.
- Ljungdahl L. G., Wood H. G.* 1969. Total synthesis of acetate from CO₂ by heterotrophic bacteria. — Annual. Rev. Mikrobiol., 23, 515.
- Mazé P.* 1903. Sur la fermentation forménique et le ferment qui la produit. — C. r. Acad. sci., 187, 888.
- McCarty P. L.* 1966. Kinetics of waste assimilation in anaerobic treatment. — Developm. Industr. Mikrobiol., 7, 144.
- Myroie R. L., Hungate R. E.* 1954. Experiments on the methane bacteria in sludge. — Canad. J. Mikrobiol., 1, 55.
- Nikitinski J.* 1907. Die anaerobe Bindung des Wasserstoffes durch Mikroorganismen. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., 19, 495.
- Niklowski B.* 1914. Über die Wasserstoffaktivierung durch Bakterien unter besonderer Berücksichtigung der neuen Gattung *Hydrogenomonas agilis*. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., 40, 430.
- Ohle W.* 1958. Die Stoffwechselfdynamik der Seen in Abhängigkeit von der Gasabscheidung ihres Schlammes. — «Vom Wasser», 25, 127.
- Paynter M. J. B., Hungate R. E.* 1968. Characterization of *Methanobacterium mobilis* sp. n. isolated from the bovine rumen. — J. Bacteriol., 95, 1943.
- Pine M. J., Vishniac W.* 1957. The methane fermentation of acetate and methanol. — J. Bacteriol., 73, 736.
- Robertson A. M., Wolfe R. S.* 1970. Adenosine triphosphate pools in *Methanobacterium*. — J. Bacteriol., 102, 43.
- Prévot A. R., Turpin A., Kaiser P.* 1967. Les bactéries anaérobies. Paris, Dunod.
- Pourbaix M.* 1963. Atlas d'équilibres électrochimiques à 25° S. Gauthier-Villars, Paris
- Schnellen C.* 1947. Onderzoekingen over de melhangisting bacterien. Diss. Rotterdam.
- Sly W. S., Stadtman E. R.* 1963a. Formate metabolism. I. Formyl coenzyme A an intermediate in the formate dependent decomposition of acetyl phosphate in *Clostridium kluyveri*. — J. Biol. Chem., 238, 2632.
- Sly W. S., Stadtman E. R.* 1963b. Formate metabolism. II Enzymatic synthesis of formyl phosphate and formyl coenzyme A in *Clostridium cylindrosporum*. — J. Biol. Chem., 238, 2639.
- Smith P. H.* 1965. Pure culture studies on methanogenic bacteria. — Proc. 20 Industrial Waste Conf. Purdue Univ.
- Smith P. H.* 1966. The microbial ecology of sludge methanogenesis. — Developm. Industr. Mikrobiol., 7, 156.
- Smith P. H., Hungate R. E.* 1958. Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium* n. sp. — J. Bacteriol., 75, 713.
- Söhngen N. L.* 1910. Sur le role du methane dans la vie organique. — Recueil trav. chim. Pays Bas, 29, 238.

- Stadtman T. 1967. Methane fermentation. — Annual Rev. Microbiol. **21**, 121.
- Stadtman T., Barker H. A. 1951a. Studies on the methane fermentation. VIII. Tracer experiments on fatty acid oxidation by bacteria. — J. Bacteriol., **61**, 67.
- Stadtman T., Barker H. A. 1951b. Studies on the methane fermentation. IX. The origine of methane in the acetate and methanol fermentation by *Methanosarcina*. — J. Bacteriol., **61**, 81.
- Stephenson M., Stickland L. H. 1933. Hydrogenase. III. The bacterial formation of methane by the reduction of one carbone compounds by molecular hydrogen. — Biochim. J., **27**, 1517.
- Wieringa C. T. 1936. Über das Verschwinden von Wasserstoff und Kohlensäure unter anaeroben Bedingungen. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **3**, 265.
- Wieringa C. T. 1940. The formation of acetic acid from carbone dioxide and hydrogen by anaerobic sporeforming bacteria. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **6**, 251.
- Wolfe R. S. 1971. Microbial formation of methane. — Advances Microbial Physiol., **6**, 107.
- Wolfe R. S., Wolin E. A., Wolin M. J., Allam A. M., Wood J. M. 1966. Biochemistry of methane formation in *Methanobacillus omelianskii*. — Developm. Industr. Microbiol., **7**, 162.
- Wood J. M., Allam A. M., Brill W. J., Wolfe R. S. 1965. Formation of methane from serine by cell free extracts of *Methanobacillus omelianskii*. — J. Biol. Chem., **240**, 4564.
- Wood J. M., Wolfe R. S. 1966a. Propylation and purification of a B₁₂ enzyme involved in methane formation. — Biochemistry, **5**, 3598.
- Wood J. M., Wolfe R. S. 1966b. Alkylation of an enzyme in the methane forming system of *Methanobacillus omelianski*. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., **22**, 119.
- Wood J. M., Wolfe R. S. 1966c. Components required for the formation of CH₄ from methylcobalamin by extracts of *Methanobacillus omelianskii*. — J. Bacteriol., **92**, 696.

**АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ВОДОРОДА.
СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ БАКТЕРИИ**

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ

История открытия сульфатовосстанавливающих бактерий может быть поучительным примером того, как изменяются взгляды на процесс под влиянием микробиологических исследований. Подробные обзоры «сероводородного брожения» были сделаны Омелянским (1904) и Исаченко (1914). Отметив, что образование сероводорода происходит в местах поступления органического вещества к воде, содержащей сульфаты, химики пришли к заключению, что источником сероводорода является восстановление сульфатов органическими веществами. Следующим этапом было установление биологической природы процесса. Ряд исследователей нашли, что восстановление сульфатов происходит с участием микроорганизмов. В 1866 г. Бешамп писал (цит. по Исаченко, 1914, стр. 223): «Вода содержит сероводород не потому, что она соприкасается с органическим веществом, а вследствие воздействия некоторых организмов, более или менее близких к микроорганизмам». Это положение было подтверждено серией исследований, в которых наблюдали образование сероводорода в нестерильных осадках и отсутствие его в осадках простерилизованных. Ряд исследователей (Plauchoud, 1877, Miquel, 1879, Werigo, 1888, Zelinski, 1893, Murray, Irvin, 1893, — цит. по Исаченко, 1914) выделили из сероводородных осадков микроорганизмы, в той или иной степени способные образовывать сероводород; однако хотя в их руках и были культуры, восстанавливающие сульфаты, они не располагали главным доказательством — чистой культурой. В то же время стало распространяться мнение, что образование сероводорода есть результат деятельности неспецифической микрофлоры в специфических условиях. Сторонником этого взгляда был Надсон (1903). Он полагал, что для образования сероводорода имеют наиболее существенное значение микробы, способные энергично разлагать белковые вещества с обильным выделением сероводорода и аммиака. Восстановление сульфатов Надсон приписывал не *Spirillum desulfuricans*, роль которой он считал второстепенной, а восстановлению сульфатов водородом, выделяющимся при водородном брожении органических веществ по уравнению реакции:



Впоследствии многие геологи указывали на этот процесс как на источник образования сероводорода из сульфатов, возвращаясь к точке зрения начала XIX столетия. Однако хотя такой процесс и возможен термодинамически, но идет при температурах 500—1000°, отсутствующих в местах образования сероводорода. Как было показано прямыми опытами, водород, выделяющийся при маслянокислом брожении, не восстанавливает сульфаты или серу (Пельш, 1936).

Единая точка зрения на процесс образования сероводорода восторжествовала после работ Бейеринка (Beijerinck, 1895), в 1895 г. обнаружившего, и ван Дельдена (van Delden, 1904), в 1904 г. выделившего специфический возбудитель восстановления сульфатов, названный *Microspira desulfuricans*. Физиология организма была подробно исследована и показано, что он использует в качестве восстановителя немногие органические вещества (van Delden, 1904; Vaars, 1927; Starkey, 1938; Рубенчик, 1947; Postgate, 1965a) и не способен разлагать сложные органические соединения. Образование сероводорода приписывают сейчас в основном, если не полностью, *Desulfovibrio*.

Примерно в те же годы, когда в Голландии были выделены и изучены десульфурierende бактерии, Никитинский (Nikitinski, 1906) установил, что сточные жидкости поглощают молекулярный водород в присутствии сульфатов, а немного позже Никлевский (Niklewski, 1914) выделил *Hydrogenomonas minis*, способный существовать в анаэробных условиях за счет восстановления сульфатов водородом (см. главу 2). Несмотря на то что в те же годы Зёнген (Söhngen, 1906) изучал водородную редукцию углекислоты (см. главу 3), водородная редукция сульфатов не привлекала внимания. Вновь к ней обратились после открытия гидрогеназы (Stephenson, Stickland, 1931) у сульфатовосстанавливающих бактерий. Вскоре после этого открытия Пельш (1936) показал существование микроорганизмов, названных им *Hydrogenthiobacteria*, способных образовывать сероводород из серы в атмосфере молекулярного водорода. Уайт и Старки (Wight, Starkey, 1945; Starkey, Wight, 1945) установили способность сульфатовосстанавливающих бактерий использовать молекулярный водород и таким образом способствовать анаэробной коррозии железа. В 1947 г. английские исследователи Батлин и Адамс (Butlin, Adams, 1947) пришли к заключению, что при водородной редукции сульфатов, которая оказалась очень распространенной у сульфатовосстанавливающих бактерий, организм способен к автотрофному росту. Подробно водородная редукция сульфатов была исследована в 50-х годах (Senez, 1953; Сорокин, 1953 а, б). Сорокин рассматривал сульфатовосстанавливающих бактерий как истинных автотрофов, и это мнение было принято до 1960 г., когда Мехалас и Риттенберг (Mechalal, Rittenberg, 1960), а затем Постгейт (Postgate, 1960a) опытами с $C^{14}O_2$ показали, что углерод клеток этих бактерий происходит главным образом из органиче-

ских веществ. Несмотря на разнообразие штаммов сульфатвосстанавливающих бактерий, представление о них как о литогетеротрофных микроорганизмах распространяется сейчас на всю группу.

Итак, история исследования сульфатвосстанавливающих бактерий прошла следующие этапы: от установления общей химической характеристики процесса — к признанию биологической природы возбудителя; от попыток объяснить процесс деятельностью неспецифической микрофлоры к открытию специфического возбудителя процесса и признанию его ведущей, если не исключительной роли в геологических масштабах; и, наконец, последовало характерное для современного этапа развития микробиологии обнаружение новой функции у старого организма.

Сульфатвосстанавливающим бактериям посвящено большое количество обзоров (Postgate, 1959, 1965 a), наша задача ограничивается рассмотрением их роста в атмосфере водорода.

Восстановление сульфатов осуществляется микроорганизмами в двух существенно различных процессах. Многие организмы способны использовать сульфаты как единственный источник серы для синтеза сульфгидрильных групп белка. При разложении белков отмерших организмов выделяются соединения, содержащие восстановленную серу, в том числе и сероводород. Этот процесс ассимиляторного восстановления сульфатов характеризуется последовательностью реакций, в которую в качестве первой ступени входит восстановление сульфата до сульфита через фосфоаденозинфосфосульфат (ФАФС) (Реск, 1962a, b). Это универсальный процесс, свойственный разнообразным организмам.

Диссимиляторное восстановление сульфатов осуществляется только сульфатвосстанавливающими бактериями — высоко специализированной физиологической группой организмов, которые используют сульфат в качестве акцептора электрона в анаэробных условиях для окисления органических соединений или водорода.

По принятым сейчас представлениям, сульфатвосстанавливающие бактерии являются представителями хемолитогетеротрофных организмов. Энергетический и конструктивный пути обмена у них в высокой степени разобщены, и в энергетической реакции могут использоваться неорганические соединения, молекулярный водород и сульфат. Вопреки распространенным до 1960 г. представлениям, сульфатвосстанавливающие бактерии оказались неспособными к автотрофной ассимиляции углекислоты, и для своего роста нуждаются в готовых органических веществах, к которым они могут присоединять большие, чем у обычных гетеротрофов, количества углекислоты.

Энергетический обмен этих организмов, являющихся строгими анаэробами, по своей биохимии — окислительного, а не бродильного типа, в котором единственным акцептором электрона могут служить окисленные соединения серы. Продуктами окислительной

реакции являются вода и сероводород. Перенос электрона осуществляется через цитохром-содержащую цепь (Postgate, 1956, 1961) и сопровождается окислительным фосфорилированием (Реск, 1960).

ВЫДЕЛЕНИЕ И СИСТЕМАТИКА

При выделении сульфатвосстанавливающих бактерий можно следовать одной из двух методик: оптимальной или селективной. При оптимальном методе культивирования среда не ограничивает развития разнообразной микрофлоры, но выделяемый организм получает преимущества по сравнению с другими, достигая наилучшего роста. При селективной процедуре стремятся ограничить условия по возможности одним избранным организмом.

Получение накопительных культур при оптимальном методе не представляет труда на простой минеральной среде, содержащей восстановитель в виде органического вещества или водорода, 1—2 г/л сульфата и дрожжевой экстракт. К среде добавляют как индикатор соль железа и по мере развития сульфатвосстанавливающих бактерий среда чернеет от образования нерастворимого сульфида железа. Как правило, развитие сульфатвосстанавливающих бактерий начинается в нерастворимом осадке, присутствие которого в среде обычно ускоряет развитие также другой группы анаэробных организмов — метанобразующих бактерий. Подобно им, сульфатвосстанавливающие бактерии, по-видимому, находятся в метабиотических отношениях с анаэробными организмами, деградирующими органические вещества: сульфатвосстанавливающие бактерии используют в качестве субстрата вещества, являющиеся продуктами брожения, таких как маслянокислосое или молочнокислосое. Выделяющиеся при некоторых брожениях восстановители, например водород, снижают потенциал среды и создают условия для развития сульфатвосстанавливающих бактерий. В таких накопительных культурах могут использоваться соединения, которые в чистой культуре недоступны сульфатвосстанавливающим бактериям. Отсюда многочисленные противоречия в более старой литературе относительно списка доноров электрона, обеспечивающих восстановление сульфатов.

Затруднения при выделении колоний сульфатвосстанавливающих бактерий обычно обусловлены неподходящим потенциалом среды. Описан ряд приемов для его снижения. Постгейт (Postgate, 1965b) рекомендует следующую методику. Из накопительной культуры, образовавшей более 30 мг/л сероводорода, делается посев в агаризованную среду Старки, к которой добавляется свежеприготовленный восстановитель (аскорбат натрия 0,01%, тиогликолат натрия 0,01%, дрожжевой экстракт 0,1%, рН 7,5). Разведения делают в агаризованной среде, нагретой до 40°, после чего дают ей застыть. На 4—5-й день инкубации появляются отдельные колонии, имеющие черный цвет. Их выделяют, разрезав пробирку или стеклянную трубку, в которой делали разведения, и проверяют на чистоту или делают повторные разведения. Проверка на чистоту включает посев на обычные среды для аэробов; для проверки же сопутствующих анаэробов Постгейт предлагает

среду, содержащую пептон 0,4%, глюкозу 1%, сульфат натрия 0,2%, сульфат магния 0,1%, агар 1,5% и отдельно добавляемую стерильную соль Мора 0,05% рН 7,0—7,5. Через 3—4 дня в культуре появляется сравнительно немного черных колоний. Появление светлых колоний, образующих газ, служит признаком загрязнения анаэробами.

Для выделения специальных групп сульфатовосстанавливающих бактерий применяются соответствующие селективные среды: для галофилов в среду добавляют 2,5% NaCl, термофилов инкубируют при 55°, для выделения споровых форм применяют прогревание посевного материала.

Сорокин (1953б) для выделения сульфатовосстанавливающих бактерий предлагает селективную методику, при которой в качестве окисляемого субстрата служат водород или муравьиная кислота, неиспользуемые в анаэробных условиях банальной микрофлорой. Эти соединения, вообще говоря, здесь взаимозаменяемы, так как муравьиная кислота разлагается гидрогенлазой, и истинным субстратом в обоих случаях служит водород. Накопительную культуру получают на жидкой среде в сосуде, наполненном на $\frac{4}{5}$ объема водородом, или в эксикаторе в пробирках. Особенно тщательно нужно следить за отсутствием кислорода в газовой атмосфере. После двух-трех пересевов в таких условиях получается визуально чистая культура, которую засевают на агаризованную среду с лактатом. Теплая агаризованная среда натягивается в стеклянные трубки, концы которых запаиваются, как предложил в 1906 г. Исаченко (1914). Если в накопительной культуре имеется много сопутствующих форм, сульфатовосстанавливающие бактерии совсем не развиваются. В достаточно очищенной культуре на 4—5-й день появляются отдельные черные колонии, которые выделяют, разрезав против колонии трубку, и засевают на агаризованную жидкую среду с лактатом. Таким образом, и использованная Сорокиным методика не является селективной для водородной сульфатредукции на всех этапах выделения.

Таблица

Диагностические признаки сульфатовосстанавливающих бактерий

Признак	<i>Desulfotomaculum</i>			<i>Desulfovibrio</i>				
	<i>D. nigrificans</i>	<i>D. orientis</i>	<i>D. ruminis</i>	<i>D. desulfuricans</i>	<i>D. vulgaris</i>	<i>D. salexigens</i>	<i>D. africanus</i>	<i>D. gigas</i>
Форма клетки	палочка	изогнут	палочка	вибрион	вибрион	вибрион	сигма	спиралла
Жгутики	перитрихи			один полярный жгутик			лофотрихи	
Цитохром	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	цитохром гниас				
Десульфовиридин	нет			есть				
ГЦ (мол%)	44,7	41,7	45,6	55,3	61,2	46,1	61,2	60,2
Используют для роста пируват без сульфата	+	—	+	+	—	—	—	—
холин без сульфата	—	—	—	+	—	—	—	—
малат + сульфат	—	—	—	+	—	+	+	—
формат + сульфат	—	—	+	—	—	—	—	—
ацетат + сульфат	—	—	—	—	—	—	—	—
Галсфилия	—	—	—	—	—	+	—	—
Термефилия	+	—	—	—	—	—	—	—

Сульфатвосстанавливающие бактерии хорошо поддаются учету на агаризованной среде с лактатом десятикратными разведениями в пробирках, причем почернение среды от сульфида железа служит индикатором развития бактерий. Их удается так же культивировать в жидкой среде, куда перед посевом опускают железный предмет, гвоздик или кнопку. Выделяющийся при коррозии железа водород обеспечивает развитие бактерий (Abd-el-Malek, Rizk, 1958).

В настоящее время сульфатвосстанавливающие бактерии по систематике, предложенной Постгейтом и Кемпбелом (Postgate, Campbell, 1966), разделяют на два рода: спорообразующие *Desulfotomaculum* и неспорообразующие *Desulfovibrio*. Бактерии, растущие в анаэробных условиях на среде с лактатом и сульфатом, относятся к одному из вышеописанных родов, если они осуществляют диссимиляторное восстановление сульфата в сульфид. Основные признаки сульфатвосстанавливающих бактерий сведены Постгейтом и Кэмпбелом в таблице, приведенной на стр. 142.

Desulfovibrio (Kluyver et van Niel) Postgate et Campbell, 1966

К роду *Desulfovibrio* относят неспороносные грамотрицательные вибрионы, иногда сигмоидные или спиральные, изредка прямые (морфологию определяют в среде Баарс с добавкой поваренной соли, если надо, и 0,02—1,0% дрожжевого экстракта). Облигатные анаэробы с жгутиком, обнаруживающие усиленную подвижность. Мезофилы, иногда галофилы. Содержат цитохром *c* и десульфоксиридин — пигмент, флуоресцирующий в щелочной среде при освещении светом 360 *н.м.* Обычно есть гидрогеназа. Факультативные или облигатные сульфатвосстанавливающие организмы, восстановление сульфатов — диссимиляторный дыхательный процесс. Автотрофный рост под водородом не доказан. Патогенность не обнаружена. Найдены в морской воде и иле, пресной воде и почве; типичный вид *D. desulfuricans*. Синонимы: *Spirillum*, *Microspira*, *Vibrio*, *Sporovibrio*, *Vibrio cholonicus*.

Desulfovibrio desulfuricans Postgate et Campbell, 1966. Вибрионы 3—5 × 0,5—1 μ к, обладающие быстрой поступательной подвижностью при помощи полярного жгутика; могут встречаться сигмоидные формы. Облигатно анаэробные, требуют $E_h = -0,1$ в для роста при pH 7,2; температура от 28 до 44 °C. Обычно растут на среде с сульфатом, не образуют газа из углеводов. На лактатном агаре с сульфатом — круглые черные колонии в случае наличия железа, на пептоно-глюкозо-сульфатном агаре — колонии такие же, но сначала золотистого цвета. Используемые соединения углерода: лактат, малат, пируват, холин, но не оксамат, оксалат, ацетат, пропионат, бутират; ацетат ассимилируется как конечный продукт окисления большинства соединений углерода; сульфат восстанавливается. Малат обычно поддерживает рост в присутствии сульфата; холин и пируват поддерживают рост с сульфатом и без него, желатину не разжижают; нитраты не остаются; изаюг. Сус-

пензия клеток имеет характерные полосы цитохрома c_3 при 525 и 553 нм и десульфовиридина при 630 нм ; при добавлении 2 н. NaOH и освещении светом 365 нм флуоресцирует красным за счет хромофора десульфовиридина. ГЦ 55,3 мол. %. Голотип утерян, неотип NCIB 8307 и ATCC 13541. Вариации: var. *aestuarii* не принята, штаммы из солоноватоводных и морских условий (эстуарии) не рассматриваются как вариация; var. *azotovorans* палочковидная, способная фиксировать азот, NCIB 8387 и NCIB 8388.

Desulfovibrio vulgaris Postgate et Campbell, 1966 сходен с *Desulfovibrio desulfuricans* за исключением следующих признаков. Используемые соединения углерода: лактат, пируват, формиат и простые спирты; малат не поддерживает роста; холин не используется; пируват не поддерживает роста без сульфата; ГЦ 61,2 мол.%. Типовой штамм Гильденборо NCIB 8303. Вариации: var. *oxamicus* способна метаболизировать оксамат или оксалат, иногда растет без сульфата с холином или пируватом, NCIB 9442.

Desulfovibrio salexigens Postgate et Campbell, 1966 (syn.: *Microspira aestuarii* van Delden, 1904). Морфология и культивирование, как у *D. desulfuricans*, за исключением необходимости в 2,5% и более хлорида натрия. Используемые соединения углерода: как у *D. desulfuricans*. Холин не поддерживает роста с сульфатом или без него. ГЦ 46,1 мол.%. Типовой штамм Британская Гвиана NCIB 8403, 8364.

Desulfovibrio gigas (LeGall) Postgate et Campbell, 1966. Большие изогнутые палочки 5—10×1,2—1,5 $\mu\text{к}$, часто в цепочках как спириллы. Медленное поступательное движение при помощи полярных лототрихсальных жгутиков. Культивирование как у *D. desulfuricans*, но $E_n = -0,08$ в наиболее благоприятен для роста. Рост медленнее, чем у других видов. Используемые соединения углерода: как у *D. vulgaris*, за исключением того, что не описано потребление спиртов. Холин не поддерживает роста с сульфатом или без него; на пирувате рост только с сульфатом; ГЦ 60,2 мол.%. Голотип NCIB 9335.

Desulfovibrio africans Campbell, Kasprzyckia, Postgate, 1966. Длинная сигмовидная палочка 5—10 $\mu\text{к}$ с полярными лототрихсальными жгутиками и быстрым поступательным движением. Культивирование как *D. vulgaris*, но обладает широкой галотолерантностью. Используемые соединения углерода как у *D. vulgaris*, но растет на малате с сульфатом; ГЦ 61,2 мол.%. Голотип Бенгази NCIB 8401.

Desulfotomaculum Campbell et Postgate, 1965

Грамотрицательные, прямые или изогнутые палочки, обычно одиночные, но иногда в цепочках, термофильные штаммы имеют сморщенные формы. Конечное или субтерминальное спорообразование со сморщиванием клетки. Подвижны, с перитрихсальным жгу-

тиковацем. Obligатные анаэробы, которые восстанавливают сульфат в сульфид. Обнаружены в пресных водах, почвах, геотермальных областях, некоторых испорченных продуктах, кишечнике насекомых и рубце.

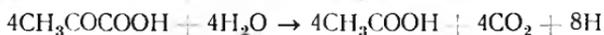
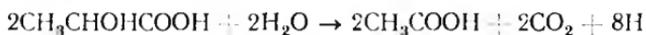
Desulfotomaculum nigrificans (Werkman, Weaver) Campbell et Postgate, 1965, (syn.: *Clostridium nigrificans* Werkman et Weaver, *Vibrio thermodesulfuricans* Ellion, *Sporovibrio desulfuricans* Starkey). Палочки 0,3—0,5×3—6 мк с округленными концами, иногда чечевицеобразные и сморщенные, иногда спаренные; подвижны. Споры овальные, терминальные или субтерминальные. Глубинные колонии в агаре черные, особенно в присутствии солей железа. Нитрат не восстанавливают, глюкозу и другие углеводы не сбраживают, коагулированный альбумин, кровяную сыворотку и желатину не разжижают. Растут на среде, содержащей лактат или пируват с сульфатом, образуя сероводород. На пирувате есть рост без сульфата. Из цистина образуют сероводород. Не патогенны. Термофилы, оптимум 55°, могут расти при 65—70°, адаптируются к медленному росту при 30—37°. ГЦ 44,7 мол %. Цитохромы класса протогема. Место обитания: почвы, компост, термальные источники, испорченная пища.

Desulfotomaculum ruminis (Coleman) Campbell et Postgate, 1965. Палочки 0,5×3—6 мк, грамтрицательные с округленными концами, иногда в парах; слегка колеблющаяся подвижность, перитрихи. Споры овальные, терминальные или субтерминальные. Глубинные колонии в агаре черные, особенно в присутствии железа, нитрат не восстанавливают, глюкозу и другие углеводы не сбраживают, коагулированный альбумин, кровяную сыворотку не разжижают. Растут на среде с лактатом, пируватом или формиатом, но не с ацетатом; в присутствии сульфата образуют сероводород. На пирувате растут без сульфата, не патогенны; мезофилы, оптимум 37°, верхний предел 48°. ГЦ 45,6 мол %. Цитохромы класса протогема. Место обитания: рубец овцы.

Desulfotomaculum orientis (Adams et Postgate) Campbell et Postgate, 1965. Толстая изогнутая палочка 1,5×5 мк, грамтрицательная, иногда в парах, подвижна, перитрихи. Споры круглые центральные, парацентральные или терминальные. Глубинные колонии в агаре черные, особенно в присутствии железа; желатину не гидролизует, нитрат не восстанавливает, глюкозу и углеводы не сбраживает. Растут в специальной среде, содержащей лактат или пируват (но не формиат или ацетат) и сульфат или тиогликолат, с образованием сероводорода. Не растут без сульфата даже с пируватом. Не патогенны. Мезофилы, оптимум 30—37°, верхний предел 42°. ГЦ 41,7 мол %. Цитохромы класса протогема.

Эту систему, предложенную Постгейтом и Кэмпбеллом (Postgate, Campbell, 1966), не принимают французские исследователи (Prévot et al., 1967), которые предпочитают сохранять более старую таксономию.

В качестве донора электрона сульфатвосстанавливающие бактерии используют только ограниченное число простых органических соединений: молочную, пировиноградную, fumarовую, яблочную, щавелевоуксусную кислоты, глицерин, этанол и некоторые другие спирты. Окисление всегда неполное, его продуктом является ацетат:



Кривые роста организма на этих субстратах имеют линейный характер (не экспоненциальный!), и урожай пропорционален количеству внесенного субстрата в соответствии с приведенными уравнениями (Senez, 1953).

Чистые культуры сульфатвосстанавливающих бактерий не способны расти на ацетате, хотя в накопительных культурах ацетат — один из лучших субстратов для восстановления сульфатов.

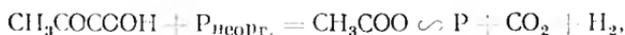
Кроме указанных органических веществ, *Desulfovibrio* может использовать холин. Хайвард и Штадтман (Hayward, Stadman, 1959) в поисках микроорганизмов, использующих соединения четвертичного аммония, на среде для метанобразующих бактерий с добавлением в качестве единственного источника углерода холина выделили организм, способный осуществлять реакцию:



Сенез и Паскаль (Sene, Pascal, 1961) сравнили организм, выделенный Хайвардом и Штадтман, с коллекционными штаммами *Desulfovibrio*, и оказалось, что *Vibrio choliniticus*, как был назван организм, разлагающий холин, идентичен *Desulfovibrio*, среди которых способность разлагать холин оказалась широко распространена.

Способность сульфатвосстанавливающих бактерий расти на средах без сульфата была установлена в ряде работ. Субстратом являлась пировиноградная кислота, которая разлагалась с образованием ацетата, водорода и углекислоты (Senez, 1951; Postgate, 1952, 1963a; Postgate, Campbell, 1963).

Энергия в этом случае поступает от фосфокластической реакции пирувата, и АТФ образуется на уровне субстрата (Akagi, 1964):



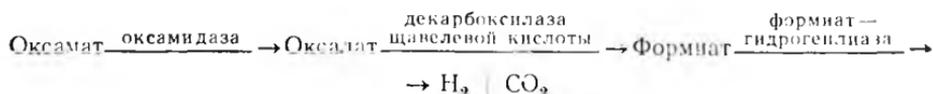
причем кофакторами служат дифосфотамин, коэнзим А, магний. Таким образом, *Desulfovibrio* способен к обоим типам анаэробных превращений органических веществ: брожению и анаэробному дыханию. Открытие способности сульфатвосстанавливающих бактерий использовать холин наводит на мысль, что список органических ве-

ществ, которые они могут окислять анаэробно, не исчерпан. Вместе с тем ясно, что сложные органические вещества, полимеры, эти организмы не используют. Помимо перечисленных выше органических веществ, таких как лактат, донорами электрона могут служить некоторые спирты, например изобутанол, которые превращаются в соответствующие кислоты. Они служат только энергетическим субстратом (Mechalas, Rittenberg, 1960).

Наконец, есть группа соединений, например формиат, которые разлагаются сульфатвосстанавливающими бактериями с образованием молекулярного водорода (Сорокин, 1953б).

Формиатдегидрогеназа из *D. vulgaris* была выделена Яги (Yagi, 1969). В отличие от других формиатдегидрогеназ, требующих в качестве акцепторов электрона НАД, НАДФ, цитохром b_1 , убихинон или ферредоксин, фермент *D. vulgaris* реагировал со специфическим цитохромом c_{553} , и только потом восстанавливались остальные цитохромы неочищенного экстракта бактериальных клеток.

Постгейт (Postgate, 1963b) из водоема, переполненного экскрементами уток, выделил штамм, способный использовать продукт разложения алаптонна — оксамат, и предположил для него следующую последовательность реакций:



Яги (Yagi, 1959 a, b), исследуя окисления СО экстрактами сульфатредуцирующих бактерий, нашел, что наиболее вероятна реакция



Способность сульфатвосстанавливающих бактерий окислять водород, восстанавливая сульфаты в сероводород, привела к выводу, что эти организмы способны к литотрофному существованию (Butlin, Adams, 1947). Исследование распространения водородной сульфатредукции в водоемах (Sisler, ZoBell, 1951; Бунеев, Харитонов, 1948; Кузнецов, 1952) показало, что процесс этот весьма значителен в природе. Сорокин (1953а,б), выделив большое число штаммов сульфатвосстанавливающих бактерий, которые, судя по его микрофотографиям, принадлежали к разным видам, пришел к выводу, что способностью к активному восстановлению сульфатов за счет молекулярного водорода обладают все до сих пор изученные в этом отношении культуры сульфатвосстанавливающих бактерий. Водородная редукция сульфатов сопровождается сильным подщелачиванием среды до рН 9,2 и интенсивно протекает даже в присутствии легко окисляемого органического вещества. Определения баланса углерода и серы в культурах, простоявших три месяца, привели Сорокина к заключению, что идет синтез органического вещества из углекислоты. Количество образовавшегося сероводо-

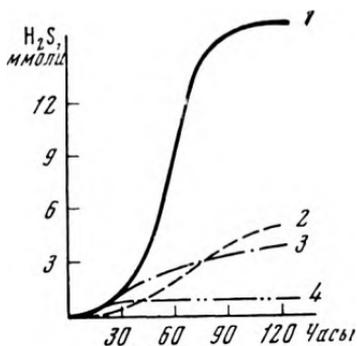


Рис. 29. Выделение сероводорода *Desulfovibrio* при различных условиях питания (Mechalas, Rittenberg, 1960)

- 1 — 0,1% дрожжевого экстракта, CO_2 и H_2 ;
- 2 — 0,1% дрожжевого экстракта; H_2 ;
- 3 — CO_2 и H_2 ;
- 4 — 0,1% дрожжевого экстракта, N_2

роста точно соответствовало потребленному сульфату. Водорода потреблялось больше, чем следует по расчету, исходя из образованного сероводорода. Избыточный водород идет на восстановление углекислоты в соотношении 2 моля H_2 на 1 моль CO_2 . На 100 молей образовавшегося сероводорода образуется 5—10 молей органического вещества.

Однако под влиянием опытов Мехаласа и Риттенберга (Mechalas, Rittenberg, 1960) и Постгейта (Postgate, 1960a) от этих представлений впоследствии отказались. При последовательных пересевах на среде с водородом без органических веществ рост сульфатвосстанавливающих бактерий становится все хуже. Добавление небольших количеств дрожжевого экстракта резко ускоряло развитие культуры. Рис. 29 дает представление о результатах опытов Мехаласа и Риттенберга. Один дрожжевой экстракт в атмосфере азота не обеспечивает выделение сероводорода. В атмосфере углекислоты и водорода идет медленное линейное выделение сероводорода. Только полная смесь углекислоты, водорода и дрожжевого экстракта обеспечивает нормальное развитие культуры. Эти опыты были подтверждены включением C^{14}O_2 в углерод клеточного тела. Сульфатвосстанавливающие бактерии включали 15—20% углерода из углекислоты, но остальной углерод получали из органического вещества. Позднее Сорокин (1961) нашел, что до 30% углерода может поступать в клетки сульфатвосстанавливающих бактерий из углекислоты, и предположил, что углеродное питание обеспечивалось в его опытах реакцией пируватсинтазы. Таким образом, исследованные штаммы сульфатвосстанавливающих бактерий не способны к автотрофной ассимиляции углекислоты в цикле Кальвина, однако участки цикла Арнона у них, возможно, функционируют. Отсутствие циклического механизма усвоения углекислоты приводит к тому, что для них необходим внешний C_2 -акцептор, которым может служить нормальный продукт энергетического обмена — ацетат. По своему типу питания сульфатвосстанавливающие бактерии относятся к литогетеротрофным микроорганизмам. Все анаэробные хемолитотрофные организмы в большей или мень-

шей степени зависят от экзогенных органических веществ, необходимых для конструктивного обмена; это справедливо и для многих органотрофных анаэробов.

Исследование потребностей сульфатовосстанавливающих бактерий в органических веществах показало их способность использовать в качестве единственного источника углерода для построения тела такие простые соединения, как органические кислоты. Вместе с тем неоднократно было показано, что рост организмов улучшается при добавлении сложных питательных субстратов, таких как пептон или дрожжевой экстракт (Имшенецкий, 1949). Постгейт (Postgate, 1951b, 1956) приписал это действию аминокислот серина, орнитина, изолейцина, цистеина. Он пришел к выводу, что цистеин действовал как восстановитель, а другие аминокислоты, способствуя растворению сульфида железа, обеспечивали доступность этого элемента для бактерий. Применение комплексобразователей, таких как ЭДТА, заменяло стимуляцию аминокислотами.

Потребность в железе для сульфатовосстанавливающих бактерий была показана неоднократно (Butlin et al., 1949; Postgate, 1956). Минеральное питание их зависит от условий, в которых был выделен исследуемый штамм; так, было показано, что для организмов из пластовых вод имеет значение отношение $(Ca + Mg)/(K + Na)$ (Кузнецова, 1965).

Рост сульфатовосстанавливающих бактерий в чистой культуре происходит обычно лишейно на значительном участке, что приписывается отравлению среды продуктами обмена. Действительно, при развитии сульфатовосстанавливающих бактерий среда значительно подщелачивается по мере использования сульфата. Образующийся сульфид может обуславливать удаление из среды тяжелых металлов, в первую очередь железа. Если устранить эти причины, рост сульфатовосстанавливающих бактерий идет экспоненциально (Le Gall, Senez, 1960; Senez, 1962b).

Первоначально в качестве источника азота в среде для сульфатовосстанавливающих бактерий добавляли аспарагин, затем его заменили аммонийными солями. Однако оказалось, что по крайней мере некоторые штаммы сульфатовосстанавливающих бактерий способны усваивать атмосферный азот (Le Gall et al., 1959), что было подтверждено результатами с меченым азотом (Le Gall, 1963). Значение сульфатовосстанавливающих бактерий в балансе азота может оказаться существенным, учитывая мощность процесса сульфатредукции.

БИОХИМИЯ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Окисление водорода сульфатовосстанавливающими бактериями осуществляется с помощью гидрогеназы, которая была выделена и тщательно изучена (Sadana, Rittenberg, 1963). Гидрогеназа суль-

сфатвосстанавливающих бактерий — железосодержащий белок и, как у водородных бактерий, из *Desulfovibrio* удавалось выделять гидрогеназу и «растворимую», и связанную с частицами.

Цепь переноса электрона у сульфатвосстанавливающих бактерий включает ряд железосодержащих пигментов. Цитохром c_3 был первым цитохромом, обнаруженным у анаэробных бактерий, и поэтому тщательно исследован (Takahashi et al., 1959; Horigo, Kamen, 1961; Postgate, 1961; Corval et al., 1961). Цитохром c_3 аутооксидабелен и обладает очень низким потенциалом, в клетках *Desulfovibrio* он присутствует в большом количестве и его физиологическая роль в энергетическом обмене сульфатвосстанавливающих бактерий не вызывает сомнений. У *Desulfotomaculum* вместо цитохрома c_3 имеется протогемовый пигмент, возможно, цитохром *b*. Помимо этих пигментов, у *Desulfovibrio* есть десульфовиридин, порфириновый пигмент, роль которого неясна.

Ферредоксин, железосодержащий негемовый белок, был обнаружен у *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum* (Tagawa, Arnon, 1962). Он имеет потенциал $E'_0 = -0,31$ в, напоминает ферредоксины из других бактерий, таких как кластридии, и принимает участие в переносе электрона вместе с цитохромом c_3 .

Рубредоксин — белок низкого молекулярного веса, содержащий негемовое железо — был выделен из *Desulfovibrio*. Он быстро восстанавливается НАДН, но не НАДФН в присутствии специфического фермента. Окислителем могут служить кислород воздуха, цитохром *c* млекопитающих; цитохром c_3 восстанавливается рубредоксином лишь частично в атмосфере азота, но быстро в атмосфере водорода (Le Gall, Forget, 1968).

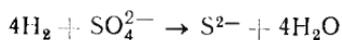
Флавопротени, сходный с флаводоксином из кластридий, был также выделен из *Desulfovibrio* и может заменять ферредоксин в восстановлении сульфита водородом.

Эти соединения принимают участие в переносе электрона, но точная последовательность цепи переноса у сульфатвосстанавливающих бактерий еще не установлена.

Кроме окисленных соединений серы, акцептором электрона могут служить некоторые органические соединения; например, фумаровая кислота восстанавливается в янтарную (Grossman, Postgate, 1954). Исследование азотного обмена сульфатвосстанавливающих бактерий Сенезом (Senez, Pichinoty, 1958a, b; Senez et al., 1956) показало, что они не могут восстанавливать нитрат вследствие отсутствия нитратредуктазы, но такие соединения, как нитрит и гидроксил-амин восстанавливаются *Desulfovibrio* в нефизиологическом процессе при использовании водорода. Кислород восстанавливается в воду вследствие аутооксидабельности цитохрома c_3 .

Для восстановления соединений серы у живых существ имеются два пути. При ассимиляторном восстановлении сульфата происходит синтез серосодержащих аминокислот, характеризующийся

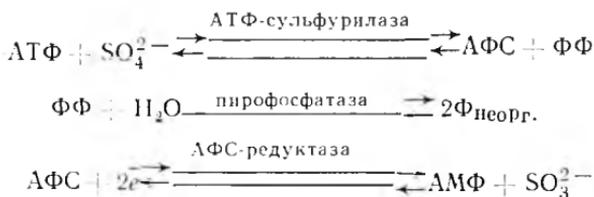
участием 3-фосфоаденилилсульфата (фосфоаденозинфосфосульфат, ФАФС). Реакция идет с затратой АТФ, и промежуточными веществами являются сульфит и «связанный сульфид». Конечный продукт реакции — цистеин. При диссимиляторном восстановлении сульфата, наблюдаемом только у сульфатовосстанавливающих бактерий, ФАФС не метаболизируется, а участвует аденилилсульфат (аденозинфосфосульфат, АФС) (Trudinger, 1969). Целые клетки *Desulfovibrio desulfuricans* быстро восстанавливают сульфат, сульфит, тиосульфат, тетрагидрат в сульфид, окисляя молекулярный водород (Postgate, 1951a):



Первый этап восстановления сульфата заключается, как показал Пек (Pек, 1960), в его активации с затратой энергии на реакцию АТФ-сульфуриказы. Эта реакция подавляется в целых клетках и экстрактах аннионами VI группы, прежде всего молибдатом MoO_4^{2-} , которые не подавляют восстановления сульфата. Реакция образования сульфата из сульфата и водорода зависела в бесклеточных экстрактах от присутствия АТФ, который образовывал с меченым сульфатом единственный меченый нуклеотид. В экстрактах отсутствовал ФАФС, характерный для ассимиляторного пути восстановления сульфата; экстракты *Desulfovibrio* практически не метаболизируют добавленный ФАФС. Таким образом, ассимиляторный и диссимиляторный пути восстановления сульфата характеризуются участием различных соединений (Pек, 1962a).

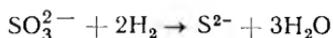
АФС восстанавливался водородом в неочищенных экстрактах с образованием сульфата и АМФ. АФС-редуктаза содержит ФАД и железо в отношении 14 : 5. Непосредственный донор электрона в этой реакции неизвестен, искусственным мог быть феррицианид. Удаление из неочищенных экстрактов цитохрома c_3 снимало способность экстрактов восстанавливать водородом сульфат и тиосульфат. Добавление цитохрома c_3 возвращало эту способность (Ishimoto, Fujimoto, 1959).

Реакции восстановления сульфата в сульфит могут быть суммированы следующими уравнениями:



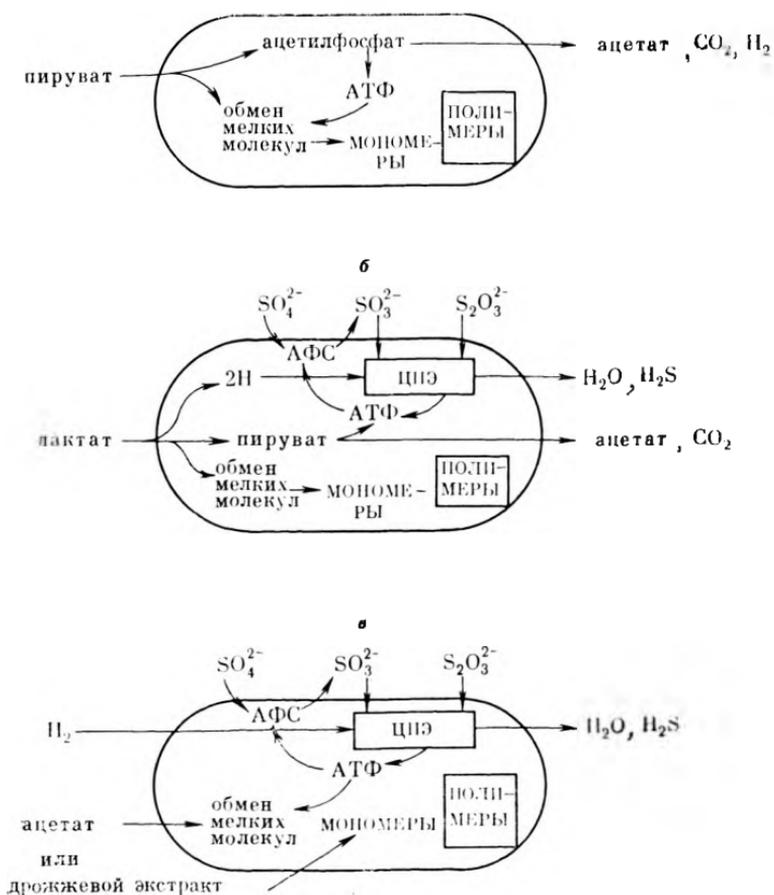
Сульфит образуется целыми клетками как промежуточный продукт восстановления сульфата; в свою очередь это соединение

восстанавливается в соответствии с уравнением (Postgate, 1951a):



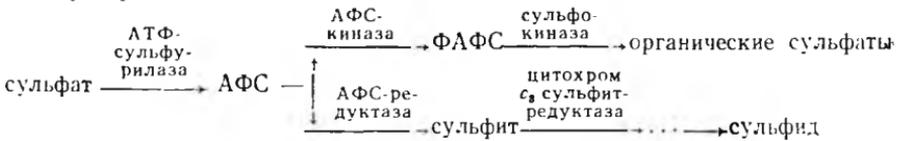
Восстановителями в этой реакции не являются непосредственно цитохром c_3 , флавины или НАДН. Цитохром c_3 служит непосредственным восстановителем только в реакции с тиосульфатом, который распадается на сульфит и сульфид. Стадии восстановления сульфита в сульфид все еще выяснены недостаточно. Одним из возможных продуктов является тиосульфат, хотя он, по-видимому, не находится на основном пути превращения сульфита в сульфид. Реакция требовала присутствия фермента, цитохрома c_3 , ферредоксина и гидрогеназы (Suh, Akagi, 1969).

Фермент, восстанавливающий тиосульфат в сульфид, был выделен и очищен (Haschke, Campbell, 1971). Реакция шла в атмосфере H_2 в присутствии гидрогеназы и метилвиологена. Внешний атом



серы в тиосульфате восстанавливался в сероводород, а внутренний— в сульфит, который вновь мог вступить в реакцию.

Пек (Pекк, 1962b) предложил следующую схему восстановления сульфата:



Окисление водорода сульфатвосстанавливающими бактериями сопровождается фосфорилированием, что было неоднократно показано включением неорганического фосфата в макроэргические соединения (Сорокин, 1953б; Milhaud, 1956). Расход АТФ на активацию сульфата показывает, что субстратное фосфорилирование при окислении лактата или пирувата может обеспечить только активацию.

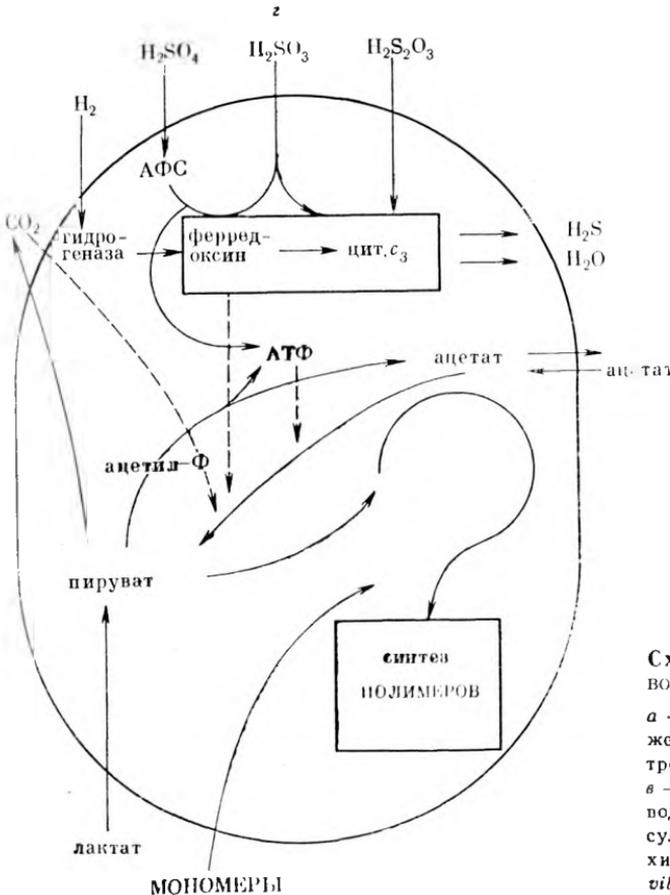


Схема 12. Обмен сульфатвосстанавливающих бактерий
 а — гетеротрофный при разложении пирувата; б — гетеротрофный и анаэробное дыхание; в — хемолитогетеротрофный при водородном восстановлении сульфатов; г — основные биохимические механизмы *Desulfovibrio*

сульфата, выигрыш энергии организмы должны получать от окислительного фосфорилирования. Действительно 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) подавляет в целых клетках восстановление сульфата, но не тиосульфата, хотя в присутствии водорода 2,4-ДНФ быстро инактивируется. В качестве разобщителя может использоваться метилвиологен, который шунтирует цепь переноса электрона и подавляет восстановление сульфата целыми клетками. Несмотря на затраты энергии для активации сульфата, урожай клеток на среде с сульфитом и сульфатом одинаковы (Senez, 1962 b).

Имеющиеся данные позволяют составить схему обмена сульфатвосстанавливающих бактерий при использовании различных доноров и акцепторов электрона (схема 12). На схеме показано, что организм может переходить от брожения с фосфорилированием на уровне субстрата (схема 12, а) к анаэробному дыханию (12, б), расти литогетеротрофно (12, в) и осуществлять эти типы обмена одновременно. Цепь переноса электрона организмов содержит цитохромы (схема 12, г), ингибируется ядами, подавляющими дыхание, такими как цианид, азид, и даже имеет обратимое на свету подавление CO, что полностью соответствует представлениям о переносе электрона через железосодержащие ферменты. Подобно другим литотрофам, сульфатвосстанавливающие бактерии имеют разобщенные потоки реакций конструктивного и энергетического обмена. Эти реакции сопрягаются с фосфорилированием окислительного типа. Однако изученные организмы, насколько известно, не обладают способностью к автотрофной ассимиляции углекислоты, а используют готовые органические вещества, хотя карбоксилирования играют в их существовании большую роль, чем у обычных гетеротрофов. Разделение потоков энергетических и конструктивных реакций предполагает соответствующие особенности в регуляции обмена, которые пока не изучены. На обмен сульфатвосстанавливающих бактерий сильный отпечаток накладывает развитие в резко восстановительных условиях.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Практическое значение сульфатвосстанавливающих бактерий заключается в том, что, являясь основным источником сероводорода в среде обитания человека, они могут наносить ущерб, разрушая материалы, неустойчивые к этому соединению. Так, установлено разрушение сульфатвосстанавливающими бактериями нефтяных продуктов, загрязнение сероводородом светильного газа, почернение бумажной пульпы. Выделяющийся сероводород может отравлять воздух в окрестностях и, окисляясь тионовыми бактериями, служить источником кислотной коррозии металлов и строительных материалов. В водоемах выделение сероводорода приводит к замору рыбы. Вместе с тем образование сероводорода сульфат-

восстанавливающимися бактериями за счет гипса и органического вещества сточных вод может быть применено для получения серы, и такие промышленные установки разработаны. Экономическому значению сульфатовосстанавливающих бактерий посвящено несколько обзоров (Postgate, 1960b, 1965a; Pankhurst, 1968).

Сульфатовосстанавливающие бактерии являются одной из наиболее важных причин коррозии металлического оборудования в анаэробной зоне (Costello, 1969). Полагают, что 50% ущерба от коррозии трубопроводов под землей вызвано их деятельностью; в Англии, например, ежегодный ущерб оценивается в 10 млн. фунтов стерлингов. Микробиологическая коррозия металлов была тщательно изучена, и она связывается с водородной сульфатредукцией. Микроорганизмы могут вызывать коррозию: 1) непосредственно влияя на кинетику электродной реакции; 2) продуцируя вещества, вызывающие коррозию; 3) создавая дифференциальную ситуацию на поверхности, которая приводит к появлению концентрированного электрохимического элемента.

Коррозию первого типа вызывают микроорганизмы, обладающие гидрогеназой, к которым относятся сульфатовосстанавливающие бактерии. Они увеличивают скорость коррозии в сотни раз; так в Копенгагене корабельная сталь корродировала со скоростью 4 мм/год. Коррозии подвергаются не только сплавы железа, но и сплавы алюминия. Считается, что сульфатовосстанавливающие бактерии удаляют водород с поверхности металла; это и приводит к растворению железа (Starkey, 1947). Электрохимическая гипотеза коррозии железа была исследована Хорватом с соавторами в Венгрии и Бусом с сотрудниками в Англии, которые применили изучение кривых поляризации (Booth, 1964; Horváth, Solti, 1959). В присутствии сульфатовосстанавливающих бактерий наклон кривых поляризации снижается. По гипотезе катодной деполяризации, образующийся сероводород не влияет на скорость коррозии, однако ни метанобразующие, ни водородные бактерии не вызывают коррозии железа в лабораторных культурах. Термодинамические расчеты Хорвата показали, что основное значение имеет присутствие сероводорода в системе, роль бактерий состоит в его образовании и поддержании низкого потенциала. Таким образом, катодная деполяризация железа обусловлена, во-первых, гидрогеназой бактерий, во-вторых, биологической реакцией, обусловленной сульфидом железа.

Механизм, обратный коррозии железа, представляет биологический топливный элемент. В таком элементе происходит изотермическая электрохимическая реакция, которая превращает химическую энергию окисляемого вещества в электрический ток. Простейшие биохимические элементы состоят из двух полуэлементов, в которых используется разница потенциалов между засеянной и незасеянной средой. Биологические топливные элементы разделяются на два типа: в одном из них электроднеактивное вещество топлива под

действием бактерий образует электрохимически активный продукт, в другом типе топливных элементов бактерии деполаризуют электроды из железа. Анодный процесс обычно обеспечивается кислородным электродом, действие которого может быть усилено развитием зеленых фотосинтезирующих микроорганизмов. Достоинствами топливных элементов является их малый вес и объем, разнообразие веществ, используемых в качестве топлива (Sisler, 1961; Cohn, 1962; Del Duca et al., 1962). Остается неясным, какое значение могут иметь подобные системы в природе, осуществляющие реакцию между пространственно разделенными восстановителем и окислителем.

Большое значение придается деятельности сульфатовосстанавливающих бактерий в нефтяном пласте. Сульфатовосстанавливающие бактерии в накопительных культурах образуют сероводород за счет органического вещества нефти, в чистых культурах этого до сих пор наблюдать не удалось. В пластовых водах количество сульфатовосстанавливающих бактерий достигает 10^5 клеток/мл. Особенно усиливается процесс образования сероводорода, если на месторождениях используется для оводнения морская вода. При развитии сульфатовосстанавливающих бактерий происходит удаление сульфата, образование сероводорода и подщелачивание среды с образованием гидрокарбонатов. Тип вод при этом меняется от сульфатхлоридно-натриевых на гидрокарбонатно-хлоридно-натриевые. Повышение рН приводит к осаждению магния и кальция (Кузнецов и др., 1962).

Зобелл (ZoBell, 1946, 1947, цит. по Бирштехер, 1957) пришел к выводу, что отдача нефти может быть увеличена за счет образования бактериями кислот и увеличения пористости известняковых коллекторов, образования газов, выделения поверхностно-активных веществ, разрушения высокомолекулярных углеводов. Роль сульфатовосстанавливающих бактерий в нефтяной микробиологии подробно рассмотрена (Бирштехер, 1957).

Участие сульфатовосстанавливающих бактерий в образовании лечебной грязи было установлено Исаченко (1915, 1927), который показал значение деятельности этих организмов для образования сероводорода под слоем рапы. Им же была показана ведущая роль сульфатовосстанавливающих бактерий в генезисе содовых озер в Кулундунской степи (Исаченко, 1934). Как уже отмечалось при формировании подземных вод, сульфатовосстанавливающие бактерии, окисляя органическое вещество и образуя сероводород, значительно повышают щелочность среды. Образуются содовые озера, примером которых могут служить озера Кирсанки, такие как Вади Натрум.

Большинство серных месторождений образуется также за счет деятельности сульфатовосстанавливающих бактерий. Биогенная гипотеза образования месторождений серы (Исаченко, 1958) основывается на том, что сульфаты, восстановленные бактериями при разложении органического вещества, служат источником серово-

дорода. Окисление сероводорода приводит к отложению серы. В зависимости от того, произошло ли отложение серы одновременно с образованием вмещающих пород или сера внедрилась в ранее образованные породы, различают соответственно сингенетические и эпигенетические месторождения. Образование их изучено Ивановым (1964). Эпигенетические месторождения образуются при внедрении хлоридно-натриевых рассолов нефтяного типа в гипсоносные породы. Восстановление гипса приводит к осаждению карбоната кальция и серы, углекислота образуется за счет окисленного органического вещества нефтей. Месторождения такого типа приурочены к геологическим структурам, обеспечивающим контакт сульфатных минералов и нефтей. Окисление сероводорода осуществляется кислородом, поступающим с поверхностными водами. Сингенетические месторождения возникли за счет деятельности сульфатвосстанавливающих бактерий в пловых отложениях водоемов лагунного типа.

Кроме участия в возникновении месторождений серы, деятельность сульфатвосстанавливающих бактерий приводит к образованию сульфидных месторождений. Когда сероводородные воды нефтяных месторождений вступают в контакт с растворами, несущими металлы, осаждаются сульфиды. Модельные опыты подтвердили возможность этого пути образования сульфидных руд (Baas-Becking, Moore, 1961).

ЛИТЕРАТУРА

- Бабьева И. П.* 1953. Некоторые особенности морфологии и обмена веществ сульфатредуцирующих бактерий. Канд. дисс. М.
- Бирштейн Э.* 1957. Нефтяная микробиология. Л., Гостоптехиздат.
- Бунеев А. И., Харитонова Л. П.* 1948. О восстановлении сульфатов в воде Крайних источников в атмосфере водорода. Цит. по *Харитоновой Л. П.* 1950.
- Зелинский П. Д.* 1893. О сероводородном брожении в Черном море и Одесских лиманах. — Журн. Русск. Физ. Хим. Общества, 25, прот. 25.
- Иванов М. В.* 1964. Роль микробиологических процессов в генезисе месторождений самородной серы. М., «Наука».
- Имшенецкий А. А.* 1949. Оптимальные питательные среды для десульфурierenden бактерий. — Микробиол., 18, 324.
- Исаченко Б. Л.* 1914. Бактерии Северного Ледовитого Океана. — В кн.: Избр. труды, 1, 1951. М., Изд-во АН СССР.
- Исаченко Б. Л.* 1915. О бактериологических исследованиях Тамбуканского озера. — В кн.: Избр. труды, 2, 17, 1951. М., Изд-во АН СССР.
- Исаченко Б. Л.* 1927. Микробиологические исследования над грязевыми озерами. — В кн.: Избр. труды, 2, 26, 1951. М., Изд-во АН СССР.
- Исаченко Б. Л.* 1934. Хлористые, сульфатные и содовые озера Кулундинской степи и биогенные процессы в них. — В кн.: Избр. труды, 2, 143, 1951. М., Изд-во АН СССР.
- Исаченко Б. Л.* 1958. О генезисе месторождений серы. — Труды ИИМИ АН СССР, вып. 5, 18.
- Кузнецов С. И.* 1952. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в озерах. М., Изд-во АН СССР.
- Кузнецов С. И., Иванов М. В., Ляликова Н. Н.* 1962. Введение в геологическую микробиологию. М., Изд-во АН СССР.

- Кузнецова В. А. 1965. Роль бактерий в процессе редукции сульфатов нефтяных месторождений. М., Канд. дисс.
- Надсон Г. А. 1903. Микроорганизмы как геологические деятели. Труды комиссии по исслед. Славянских озер. СПб.
- Омелянский В. Л. 1904. Круговорот серы. — В кн.: Избр. труды, 1, 398, 1953. М., Изд-во АН СССР.
- Пельш А. Д. 1936. О новых аутотрофных водородсерных бактериях Hydrogenithiobacteria. — Труды соляной лаб. АН СССР, вып. 5.
- Пельш А. Д. 1937. Динамика десульфатизационного процесса. — Труды соляной лаб. АН СССР, вып. 14.
- Рубеник Л. И. 1947. Сульфатредуцирующие бактерии. М.—Л., Изд-во АН СССР.
- Сорокин Ю. И. 1953а. Баланс углерода при автогетеротрофном питании бактерий, восстанавливающих сульфаты молекулярным водородом. — Докл. АН СССР, 90, 897.
- Сорокин Ю. И. 1953б. Изучение хемосинтеза у сульфатвосстанавливающих бактерий. Канд. дисс., М.
- Сорокин Ю. И. 1961. Гетеротрофная ассимиляция углекислоты микроорганизмами — Журн. общ. биол., 22, 265.
- Сорокин Ю. И. 1966. О роли углекислоты и ацетата в биосинтезе у сульфатвосстанавливающих бактерий. — Докл. АН СССР, 168, 199.
- Харитоновна Л. П. 1950. Микробиологическое восстановление сульфатов и образование сульфидов с использованием молекулярного водорода. М. Канд. дисс.
- Штурм Л. Д. 1951. Роль сульфатвосстанавливающих бактерий в жизни и истории нефтяных месторождений. М., Изд-во АН СССР.
- Abd-el-Malek J., Rizk S. G. 1958. Counting of sulphate reducing bacteria in mixed bacterial populations. — Nature, 182, 538.
- Adams M. E. 1959. A new sulphate reducing vibrio. — J. Gen. Microbiol., 20, 252.
- Akagi J. M. 1960. Culture of *Desulfovibrio desulfuricans*. — Nature, 185, 635.
- Akagi J. M. 1963. Bacterial sulphate reduction and the development of alkalinity. — J. Appl. Bacteriol., 26, 7.
- Akagi J. M. 1964. Phosphoroclastic reaction of *Clostridium nigrificans*. — J. Bacteriol., 88, 813.
- Akagi J. M. 1967. Electron carriers for the phosphoroclastic reaction of *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Biol. Chem., 242, 2478.
- Vaars J. K. 1927. Over sulfaatreductie voor bacterien. Thesis. Delft.
- Vaas-Becking L. G. M., Moore D. 1961. Biogenic sulphides. — Econ. Geol., 56, 259.
- Baliga B. S., Vartak H. G., Jagannathan V. 1961. Purification and properties of sulphurylase from *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Sci. and Industr. Res., 20c, 33.
- Baker F. D., Papiska H. R., Campbell L. L. 1962. Choline fermentation by *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Bacteriol., 84, 973.
- Beijerinck M. W. 1895. Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache von Sulphatreduction. — Zbl. Bakteriol. II Abt., 1, 9, 49, 59, 104.
- Booth G. H. 1964. Sulphur bacteria in relation to corrosion. — J. Appl. Bacteriol., 27, 174.
- Bruschi-Hermand M., Le Gall J. 1967. Biochemie comparée des cytochromes bactériens de type c_3 . — Bull. Soc. chim. biol., 49, 753.
- Butlin K. R., Adams M. E. 1947. Autotrophic growth of sulphate reducing bacteria. — Nature, 160, 154.
- Butlin K. R., Adams M. E., Thomas M. 1949. The isolation and cultivation of sulphate reducing bacteria. — J. Gen. Microbiol., 3, 46.
- Cahet G. 1936. Substrate énergétiques naturels des bactéries sulfatoréductrices. — C. r. Acad. sci., ser., D, 263, 691.
- Campbell L. L., Postgate J. R. 1965. Classification of the spore forming sulphate reducing bacteria. — Bacteriol. Revs, 20, 359.

- Campbell L. L., Kasprzycki M. A., Postgate J. R. 1966. *Desulfovibrio africanus* sp. n., a new dissimilatory sulphate reducing bacterium. — J. Bacteriol., **92** 1122.
- Cohn E. 1962. Perspectives of biochemical electricity. — Developm. Industr. Microbiol., **4**, 53.
- Coleman G. A. 1960. A sulphate reducing bacterium from the sheep rumen. — J. Gen. Microbiol., **22**, 423.
- Corval M. L., Horio T., Kamen M. 1961. The amino acid composition of some bacterial haem proteins. — Biochim. et biophys. acta, **51**, 246.
- Costello J. A. 1969. The corrosion of metals by micro-organisms: a literature survey. — Internat. Biodetn. Bull., **5**, 101.
- van Delden A. 1904. Beitrag zur Kenntniss der Sulphatreduction durch Bakterien. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **11**, 81, 113.
- Del Duca M. G., Fuscoe J. M., Zurella R. W. 1962. Direct and indirect bioelectrochemical energy conversion, systems. — Developm. Industr. Microbiol., **4**, 81.
- Durner G., Römer R., Schwartz W. 1965. Untersuchungen über die Lebensgemeinschaft des Sulfureturns. — Z. allg. Mikrobiol., **5**, 206.
- Ellion L. 1924. A thermophilic sulphate reducing bacterium. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **63**, 58.
- Grossman J. R., Postgate J. R. 1954. The metabolism of malate and certain other compounds by *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. gen. Microbiol., **12**, 429.
- Haschke R. H., Campbell L. L. 1971. Thiosulphate reductase of *Desulfovibrio vulgaris*. — J. Bacteriol., **106**, 80.
- Hayward H. R., Stadtman T. C. 1959. Anaerobic degradation of choline by an anaerobic cytochrome producing bacterium *Vibrio cholonicus* n. sp. — J. Bacteriol., **78**, 557.
- Horio T., Kamen M. D. 1961. Preparation and properties of three pure crystalline bacteria haem proteins. — Biochim. et biophys. acta, **48**, 266.
- Horvath J., Solti M. 1959. Beitrag zum Mechanismus der anaeroben mikrobiologischen Korrosion der Metalle in Boden. — Werkstoffe und Korrosion, **10**, 624.
- Ishimoto M. 1959. Sulphate reduction in cell free extracts of *Desulfovibrio*. — J. Biochem. (Tokyo), **46**, 105.
- Ishimoto M., Fujimoto D. 1959. Adenosine-5-phosphosulphate as an intermediate in reduction of sulphate by sulphate reducing bacterium. — Proc. Japan. Acad., **35**, 243.
- Ishimoto M., Fujimoto D. 1961. Sulphate reducing bacteria. X. Adenosine-5-phosphosulphate reductase. — J. Biochem. (Tokyo), **50**, 299.
- Ishimoto M., Konde J., Kameyama T., Yagi T. 1957. The role of cytochrome in the enzyme system of sulphate reducing bacteria. — In: Proc. Internat. Sympos. Enzyme Chem. (Tokyo-Kyoto), Maruzem, 229.
- Ishimoto M., Yagi T. 1961. Sulphate reducing bacteria. XI. Sulphite reductase. — J. Biochem. (Tokyo), **49**, 103.
- Le Gall J. 1963. A new species of *Desulfovibrio*. — J. Bacteriol. **86**, 1120.
- Le Gall J., Dragoni N. 1966. Dependence of sulphate reduction on crystallized ferredoxin from *Desulfovibrio gigas*. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., **23**, 145.
- Le Gall J., Forget N. 1968. Purification partielle et étude de la NAD: rubredoxine oxido-réductase de *D. gigas*. — Ann. Inst. Pasteur, **114**, 109.
- Le Gall J., Senez J. 1960. Influence de la fixation de l'azote sur la croissance de *Desulfovibrio desulfuricans*. — C. r. Acad. sci., **250**, 404.
- Le Gall J., Senez J., Pichinoty F. 1959. Fixation de l'azote par les bactéries sulfato-réductrices. — Ann. Inst. Pasteur, **79**, 223.
- Mechalaz B. J., Rittenberg S. C. 1960. Energy coupling in *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Bacteriol., **80**, 501.
- Milhaud G. 1956. Phosphorylation et production d'hydrogène sulfuré. — La biochimie du soufre. Paris, CNRS, p. 75.

- Müller G. 1967. Die Erzeugung von Elektroenergie mit Hilfe von Mikroorganismen. — Biol. Rundschau, 5, 36.
- Pankhurst E. S. 1968. Significance of sulphate-reducing bacteria to the gas industry: a review. — J. Appl. Bacteriol., 31, 179.
- Peck H. D. jr. 1959. The ATP dependent reduction of sulphate with hydrogen in extracts of *Desulfovibrio desulfuricans*. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45, 701.
- Peck H. D. jr. 1960. Evidence for oxidative phosphorylation during the reduction of sulphate with hydrogen by *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Biol. Chem., 235, 2734.
- Peck H. D. jr. 1962a. The role of adenosine 5' phosphosulphate in the reduction of sulphate to sulphite by *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Biol. Chem., 237, 198.
- Peck H. D. jr. 1962b. Comparative metabolism of inorganic sulphur compounds in microorganisms. — Bacteriol. Revs, 26, 67.
- Postgate J. R. 1951a. The reduction of sulphur compounds by *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Gen. Microbiol., 5, 725.
- Postgate J. R. 1951b. On the nutrition of *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Gen. Microbiol., 5, 714.
- Postgate J. R. 1952. Growth of SO_4^{--} -reducing bacteria in SO_4^{--} free medium. — Research, 5, 189.
- Postgate J. R. 1956. Iron and the synthesis of cytochrome c_3 . — J. Gen. Microbiol., 15, 186.
- Postgate J. R. 1959. Sulphate reduction by bacteria. — Annual Rev. Microbiol., 13, 505.
- Postgate J. R. 1960a. On the autotrophy of *Desulfovibrio desulfuricans*. — Z. allg. Mikrobiol., 1, 53.
- Postgate J. R. 1960b. The economic activities of sulphate-reducing bacteria. — Progr. Indust. Microbiol., 2, 49.
- Postgate J. R. 1961. Cytochrome c_3 . — In: Haematin enzymes. Falk J., Lemberg R., Morton R. (Eds). London, Pergamon Press.
- Postgate J. R. 1963a. Sulphate free growth of *Clostridium nigrificans*. — J. Bacteriol., 85, 1450.
- Postgate J. R. 1963b. A strain of *Desulfovibrio* able to oxidize oxamate. — Arch. Mikrobiol., 46, 287.
- Postgate J. R. 1965a. Recent advances in the study of sulphate reducing bacteria. — Bacteriol. Revs, 29, 425.
- Postgate J. R. 1965b. Enrichment and isolation of sulphate-reducing bacteria. — Zbl. Bakteriol., I Abt. Supplementheft 1 «Anreicherungskultur und Mutantenauslese», S. 190.
- Postgate J. R., Campbell L. L. 1963. Identification of Coleman's sulphate reducing bacteria as a mesophile relative of *Clostridium nigrificans*. — J. Bacteriol., 86, 274.
- Postgate J. R., Campbell L. L. 1966. Classification of *Desulfovibrio* species: the non sporulating sulphate reducing bacteria. — Bacteriol. Revs, 30, 737.
- Prévot A. P., Turpin A., Kaiser P. 1967. Les bactéries anaérobies. Paris, Dunod.
- Sadana J. C., Morey A. V. 1959. The purification of hydrogenase of *Desulfovibrio desulfuricans*. — Biochim. et biophys. acta, 32, 592.
- Sadana J. C., Rittenberg D. 1963. Some observation on the enzyme hydrogenase of *Desulfovibrio desulfuricans*. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50, 900.
- Salch A. M. 1964. Difference in the resistance of sulphate reducing bacteria to inhibitors. — J. Gen. Microbiol., 37, 113.
- Senez J. C. 1951. Etude comparative de la croissance de *Sporovibrio desulfuricans* sur pyruvate et sur lactate de soude. — Ann. Inst. Pasteur, 80, 395.
- Senez J. C. 1953. Sur l'activité et la croissance des bactéries anaérobies sulfato-réductrices en culture semiautotrophes. — Ann. Inst. Pasteur, 84, 595.
- Senez J. C. 1955. Consommation de l'hydrogène moléculaire par les suspensions non proliférantes et par les extrait cellulaire de *Desulfovibrio desulfuricans*. — Bull. Soc. chim. biol., 37, 1135.

- Senez J. C. 1962a. Role écologique des bactéries sulfato-réductrices. — Publ. Staz. zool. Napoli, suppl., 32, 427.
- Senez J. C., 1962b. Some considerations on the energetics of bacterial growth. — Bacteriol. Revs, 25, 95.
- Senez J. C., Pascal M. C. 1961. Dégradation de la choline par les bactéries sulfato-réductrices. — Z. allg. Mikrobiol., 1, 142.
- Senez J. C., Pichinoty T. 1958a. Réduction de l'hydroxylamine liée à l'activité de l'hydrogénase de *Desulfovibrio desulfuricans*. I. Activité des cellules et des extraits. — Biochim. et biophys. acta, 27, 569.
- Senez J. C., Pichinoty T. 1958b. Réduction de l'hydroxylamine liée à l'activité de l'hydrogénase de *Desulfovibrio desulfuricans*. II. Nature de système enzymatique et du transporteur d'électrons intervenant dans la réaction. — Biochim. et biophys. acta, 28, 355.
- Senez J. C., Pichinoty T., Konovaltchikoff-Mazoyer M. 1956. Réduction des nitrates et de l'hydroxylamine par les suspensions et les extraits de *Desulfovibrio desulfuricans*. — C. r. Acad. sci., 242, 570.
- Senez J. C., Volcani B. F. 1951. Utilization de l'hydrogène moléculaire par les souches pures de bactéries sulfato-réductrices d'origine marine. — C. r. Acad. sci., 232, 1035.
- Sister F. D. 1961. Electrical energy from biochemical fuel cells. — New Sci., 12, 110.
- Sister F. D., Zobell C. E. 1951. Hydrogen utilization by some marine sulphate-reducing bacteria. — J. Bacteriol., 62, 117.
- Starkey R. 1938. A study of spore formation and other morphological characteristics of *Vibrio desulfuricans*. — Arch. Mikrobiol., 9, 304.
- Starkey R. L. 1947. Sulphate reduction and the anaerobic corrosion of iron. — Antonie Leewenhock. J. Microbiol. and Serol., 12, 193.
- Starkey R. L., Wight K. M. 1945. Anaerobic corrosion of iron in soils. — N. Y., Amer. Gas Assoc.
- Stephenson M., Stickland L. H. 1931. Hydrogenase. II. The reduction of sulphate to sulphide by molecular hydrogen. — Biochem. J., 25, 215.
- Suh B., Akagi J. M. 1969. Formation of thiosulphate from sulphate by *Desulfovibrio vulgaris*. — J. Bacteriol., 99, 210.
- Tagawa K., Arnon D. 1962. Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in biological production and consumption of hydrogen gas. — Nature, 195, 537.
- Takahashi K., Titani K., Minakami S. 1959. The structure of cytochrome c. VI Amino acid composition of cytochrome c from beef, horse and whale hearts baker yeast and *Desulfovibrio desulfuricans*. — J. Biochem. (Tokyo), 46, 1323.
- Trudinger P. A. 1969. Assimilatory and dissimilatory metabolism of inorganic sulphur compounds by micro-organisms. Advanc. Microbial. Physiol., 3, 111.
- Wight K. M., Starkey R. L. 1945. Utilization of hydrogen by sulphate-reducing bacteria and its significance in anaerobic corrosion. — J. Bacteriol., 50.
- Yagi T. 1959a. Enzymic oxidation of carbone monoxide. — Biochim. et biophys. acta, 30, 194.
- Yagi T. 1959b. Enzymic oxidation of carbone monoxide. — J. Biochem. (Tokyo), 46, 949.
- Yagi T. 1969. Formate: cytochrome oxidoreductase of *Desulfovibrio vulgaris*. — J. Biochem., 66, 473.
- Yagi T., Tagawa K. 1962. Enzymic oxidation of carbone monoxide. — Biochim. et biophys. acta, 65, 508.

МИКРООРГАНИЗМЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ СЕРЫ

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ

Соединения серы на Земле представлены в первую очередь сульфатами, сероводородом, молекулярной серой. Термодинамические расчеты полей устойчивости соединений серы в координатах E_h — рН показывают, что основная восстановленная форма — сероводород — устойчива лишь при низком окислительно-восстановительном потенциале и щелочной реакции среды (рис. 30). При низких значениях рН из гидросульфид-иона образуется свободный сероводород, который легко окисляется кислородом воздуха, превращаясь в молекулярную серу. Область термодинамической устойчивости последней располагается при пониженном окислительно-восстановительном потенциале и низких значениях рН. В окислительных условиях устойчив сульфат-ион. Кроме этих соединений, сера образует разнообразные неорганические соединения, которые не встречаются в природе в больших концентрациях: тиосульфат, сульфит, полисульфиды и политионаты. Для микроорганизмов, окисляющих соединения серы, внутри области устойчивости сульфата можно наметить две зоны: одну, располагающуюся над областью устойчивости сероводорода при рН выше 5, и другую — над областью устойчивости серы при рН меньше 5. Экологическое различие между группами ацидофильных и ацидофобных микроорганизмов очень велико, но биохимически они различаются незначительно, и физиологическая граница далеко не так отчетлива, как следовало бы из полей устойчивости соединений серы. Микроорганизмы, развивающиеся в щелочной среде, способны окислять не только сероводород, но и серу. Восстановленные соединения серы окисляются микроорганизмами при всех значениях рН.

Основным источником сероводорода в биосфере является восстановление сульфатов бактериями, приуроченное к щелочной и нейтральной среде. В меньшей степени сероводород образуется за счет гниения органических остатков. Особый случай составляют сероводородные источники, где восстановленные соединения серы могут иметь глубинное происхождение. Микроорганизмы, окисляющие соединения серы, можно разделить на три группы: фотосинте-

знующие анаэробные бактерии, тионовые бактерии, собственно серобактерии.

Фотосинтезирующие бактерии окисляют сероводород и серу в анаэробных условиях на свету. Область их распространения примерно совпадает с областью сульфатвосстанавливающих бактерий. В кислой среде они не обнаружены. Многие из них окисляют так же водород и органические вещества. Богатая видами группа фотолитотрофных микроорганизмов здесь не обсуждается, так как обзор их дан в книге Кондратьевой (1963). Эти микроорганизмы могут играть существенную роль в круговороте серы в водоемах.

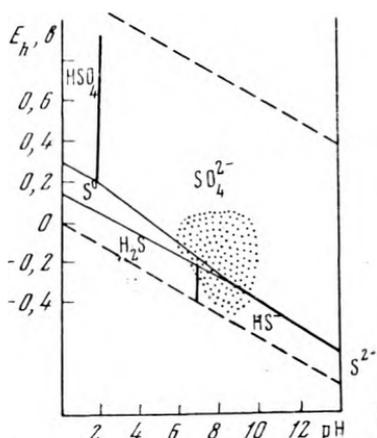
Собственно серобактерии в большинстве своем представляют бесцветные аналоги синезеленых водорослей, способные отлагать внутри клетки капли серы. Это относительно крупные организмы, в массовом количестве развивающиеся в водоемах на поверхности ила в виде снежно-белого налета. Обычно они растут при невысоком содержании сероводорода, но обильны и в сероводородных источниках. Экологическая роль их может быть велика вследствие того, что они образуют биологическую пленку, перехватывая сероводород и кислород и создавая резкую границу между окислительной и восстановительной зонами.

В отличие от двух предыдущих групп, распространение тионовых бактерий не ограничено водоемами. Они распространены и в почвах и в горных породах. Это наиболее важная в геохимическом отношении группа хорошо изучена физиологически и биохимически.

Бесцветные и окрашенные серобактерии были изучены Виноградским в конце прошлого века. Его микроскопические наблюдения за микрокультурами позволили дать систематику этих организмов, которая в основных чертах сохранилась до настоящего

Рис. 30. Поля устойчивости соединений серы в координатах E_h — рН

Показана область развития сульфатвосстанавливающих бактерий. Пунктир — поле устойчивости воды



времени. Если фотосинтезирующие бактерии, начиная с работ ван Нилы, стали обычным объектом лабораторных исследований, и по ним накоплена обширная литература, то бесцветные серобактерии только наблюдались гидробиологами в естественных условиях. За прошедшие годы, помимо морфологических исследований, было сделано несколько попыток культивировать их, но отсутствие чистых культур задерживает изучение этой группы.

Тионовые бактерии были обнаружены при неудачной попытке выделить крупные серные микроорганизмы из воды Неаполитанского залива. Натансон (Nathanson, 1902), добавив к морской воде сернистый калий, наблюдал на поверхности воды пленку серы с многочисленными мелкими палочками. Он подробно изучил процесс, вызываемый этими бактериями, выделив культуру на агаризованной минеральной среде с тиосульфатом, где появлялись мелкие белые или прозрачные ирризирующие колонии. Точные химические анализы убедили Натансона, что организм образует из тиосульфата тетрагидрат и серную кислоту; образование молекулярной серы Натансон приписал побочной химической реакции. Организмы не могли использовать органические вещества и развивались только за счет углекислоты воздуха или бикарбонатов; это доказывало, что они принадлежат к хемосинтезирующим микроорганизмам. Таким образом, уже через четыре года после работ Виноградского с серобактериями его выводы о значении окисления серы были подтверждены другим исследователем на неизвестном до того микроорганизме. Название *Thiobacillus* было предложено через два года Бейеринком (Beijerinck, 1904), который выделил организмы этого рода из разных мест обитания. Он установил также, что существуют штаммы, способные окислять тиосульфат в анаэробных условиях, восстанавливая нитраты в свободный азот. Организмы получили названия *Thiobacillus thioparus* и *T. denitrificans*, которые сохраняются до сих пор, хотя морфологически эти подвижные неспоровые палочки по современной терминологии не могут быть названы бациллами. Названия *Thiobacterium* Lehman et Neumann, *Sulfomonas* Orla-Jensen, хотя и более правильные, не прижились. Омелянский (1904) предложил называть организмы этой группы, в отличие от истинных серобактерий, тионовокислыми бактериями, или тионовыми.

В последующие годы тионовые бактерии были обнаружены в самых разных условиях, и постепенно утвердилось мнение, что именно они являются основными агентами, осуществляющими окисление восстановленных соединений серы в сульфаты; серобактерии, которым до этого придавалась такая значительная роль, отошли на второй план. Уже в работах Бейеринка и Натансона было установлено, что тионовые бактерии способны окислять разные соединения серы: сероводород, сульфиды, тиосульфат, тетрагидрат, молекулярную серу, роданистые соединения в серную кислоту с образованием промежуточных или побочных продуктов окисления, таких

как полиотионаты и молекулярная сера. Накопление этих неполностью окисленных продуктов в значительной степени зависело от условий культивирования.

В 20-х годах американские исследователи, изучая окисление серы в почве, обнаружили организм, обладавший необычайной кислотоустойчивостью; его оптимум развития находился при pH 3,0 (Waksman, Joffe, 1922). Этот организм, окисляя молекулярную серу, образовывал буквально потоки серной кислоты и оказался основным агентом сернокислотного выветривания. Он был назван *Thiobacillus thiooxidans*.

Уже в ранних работах было обнаружено большое количество тиобацилл, в различной степени способных к окислению органического вещества. Траутвейн (Trautwein, 1921, 1924), Якобсен (Jacobsen, 1912, 1914) описали гетеротрофные организмы, способные окислять тиосульфат в тетратионат. Старки (Starkey, 1934, 1935), проводя сравнительное изучение тионовых бактерий, выделил организм, способный расти миксотрофно, либо автотрофно на среде с тиосульфатом, либо гетеротрофно на органических средах. Он был назван *T. novellus*. Лондон и Риттенберг (London, Rittenberg, 1964, 1967) описали еще ряд организмов, представляющих все градации в отношении использования органического вещества. Денитрифицирующие тионовые бактерии, нуждавшиеся в органическом веществе, были описаны еще ранее (Beijerinck, 1904; Тюльпанова-Мосевич, 1930).

Среди тионовых бактерий найдены облигатно галофильные штаммы, в том числе развивающиеся в насыщенном растворе хлористого натрия; такие организмы играют важную роль в лиманах. Существуют, по-видимому, расы, приспособленные к развитию при повышенной и пониженной температуре. Термофильные бактерии, окисляющие соединения серы, неоднократно наблюдались в термальных источниках, но обычно из них удавалось выделить в культуру только мезофильные расы (Emoto, 1929, 1933; Заварзин, Жиллина, 1964). Егорова и Дерюгина (1963) сообщили о выделении спороспособной бактерии *Thiobacillus thermophilus*, окисляющей соединения серы при 55°.

Были обнаружены также организмы, которые, помимо соединений серы, могли окислять двухвалентное железо (Colmer, Hinkle, 1947; Colmer et al., 1949). Организм, названный *T. ferrooxidans*, мог использовать в кислой среде в качестве источника энергии либо окисление железа, либо окисление серы; в последнем случае, он отличался от *T. thiooxidans* только набором минералов, на которые мог воздействовать. Значительное внимание было уделено разложению роданистых соединений, которые имеются в сточных водах. Организм, ответственный за процесс, был назван *T. thio-cyanooxidans* (Happold, Key, 1937; Happold et al., 1954).

Итак, тионовые бактерии представляют обширную группу с физиологически различными штаммами.

СЕРОБАКТЕРИИ

Серобактериями называют сборную группу бесцветных микроорганизмов, часто довольно сложных и разнообразных по строению, которые развиваются в присутствии сероводорода и способны откладывать внутри клеток капли серы. Для типичных организмов этой группы окисление сероводорода рассматривается как энергетический процесс. Термин «серобактерии» применяется для того, чтобы отличать организмы этой довольно расплывчатой в настоящее время группы от мелких псевдомолад — тионовых бактерий и фотосинтезирующих микроорганизмов — окрашенных серобактерий. Основная характеристика бесцветных серобактерий остается неизменной со времени первых исследований Виноградского в 1888 г.:

«Эти бактерии не могут жить без серы, которая откладывается в их клетках. Серу они могут получить только при окислении сероводорода, который вследствие этого необходим для их развития. Свою серу они окисляют в серную кислоту и выделяют наружу из клеток в виде сернокислых солей, главным образом гипса. Если же процесс окисления из-за недостатка серы приостановлен, то серобактерии оказываются угнетены в своих жизненных функциях и скоро погибают. Что касается питания этих организмов органическими веществами, то в этом отношении они совершенно нетребовательны: в высшей степени ничтожные количества органических веществ, которые не могут поддерживать рост большинства организмов, вполне их удовлетворяют. Хорошие питательные вещества, т. е. легко сбраживаемые, не оказывают при культивировании их благоприятного действия, напротив, они могут оказаться косвенно неблагоприятными, вызывая развитие различных гнилостных бактерий. Основные условия культивирования следуют из вышесказанного сами собой» (цит. по Winogradsky, 1888, стр. 9).

За прошедшие три четверти века изучение бесцветных серобактерий почти не продвинулось вперед и во всяком случае не выходит за пределы комментариев к характеристике организмов, данной Виноградским в его первой самостоятельной работе после окончания университета. Задачей его исследования было изучение морфологии серобактерий в связи с утверждениями плеоморфистов об изменчивости микроорганизмов. Но сначала пришлось научиться их культивировать. Основные результаты были получены в проточной микрокультуре под покровным стеклом, положенным на осколки покровного стекла. Когда препарат не был под микроскопом, он находился во влажной камере, а во время наблюдения прибавлялась дистиллированная вода, чтобы избежать высыхания. Работа велась на природной воде источника в Лангенбрюкке, которую обогащали, пропуская 10—20 пузырьков сероводорода через 10 мл воды. Состав воды источника (в г/л) приводит Бавендам (Bavendamm, 1924):

Двууглекислый кальций	3,4056	Хлористый калий	0,1358
Двууглекислый магний	2,6503	Сернистое железо	0,0459
Сернистый кальций	3,1478	(раствор в сернистом	
Сернистый магний	5,0528	кальции)	
Сернистый натрий	2,1245	Окись алюминия	0,0414
Сернистый калий	0,2072	Сернистый кальций	0,0569
Фосфорнокислый кальций	0,2157	Кремниевая кислота	0,1753
(трехосновный раствор		Свободная углекислота	2,3561
в насыщенной CO ₂ воде)		Свободный сероводород	0,0994

Следы органических веществ и фтористого кальция

Воду такого минерального состава применяли затем как среду для серобактерий (Bavendamm, 1924; Keil, 1912), но организмы могут развиваться в любой колодезной воде, где медленно разлагается корневище *Butomus* и есть примерно 0,5 г/л гниса.

Серобактерии чувствительны к концентрации сероводорода, они быстро отмирают в воде, насыщенной сероводородом, и поэтому необходимо 2—3 раза в день менять воду в микрокультуре с тем, чтобы обеспечить поступление и сероводорода и кислорода, без которых бактерии не развиваются.

В природе проточные условия и условия, где существуют градиенты сероводорода и кислорода, широко распространены. В лабораторной культуре оба эти варианта трудно достижимы без громоздкой и неустойчиво работающей аппаратуры.

Виноградский считал, что рост серобактерий происходит медленно по сравнению с другими видами бактерий. Время их удвоения составляло не менее 24 часов.

Хорошо развивающиеся *Beggiatoa* имеют длинные нити — трихомы, которые рвутся или в месте некривиев или при крутом изломе. Механическое повреждение нитей *Beggiatoa*, как отмечал Виноградский, очень вредно для организма. Рост нитей происходит только при добавлении воды с сероводородом, что и является доказательством использования окисления сероводорода в качестве источника энергии для роста серобактерий. В отсутствие сероводорода нити *Beggiatoa* становятся короткими, капли серы из клеток пропадают, плазма становится прозрачной, и трихом распадается на отдельные клетки, которые уже неспособны к развитию. Аналогичные результаты были получены и с неподвижным видом серобактерий *Thiothrix*, который оказался даже более чувствительным к отсутствию сероводорода, чем *Beggiatoa*.

Наблюдения Виноградского получили свое полное подтверждение и в более поздних работах. В микрокультурах на предметном стекле Бар и Шварц (Bahr, Schwartz, 1957) проследили развитие *Beggiatoa alba*. Им удалось наблюдать деление трихома в местах, где не было включений серы, на короткие отрезки — гормогонии. Деление клеток в гормогониях начиналось только через 2—3 дня. Трихомы обладали выраженным хемотаксисом; при недостатке

сероводорода они собирались в центре препарата, а при его избытке ползли к краям, где больше кислорода. При недостатке сероводорода сера быстро исчезала из клеток и только через 30—40 часов накапливалась снова. Для культур *Beggiatoa* очень характерен внезапный лизис трихомов.

Цитологические исследования *Beggiatoa alba* и *Thiothrix nivea* показали, что присутствие серы в клетках коррелирует с содержанием липоидных веществ. Клетки без капель серы были лишены и липидов (Drawert, Metzner-Küster, 1958). Исследования ультратонкого строения серобактерий под электронным микроскопом (Maier, Murray, 1965) показали, что эти организмы во многом напоминают синезеленые водоросли (рис. 31). В отличие от большинства бактерий внутреннее строение серобактерий может быть довольно сложным: они имеют иногда развитую систему внутренних мембран, как например у *Thiovulum* (Fauré-Fremiet, Ruiller, 1958).

Культивирование серобактерий до сих пор удается с большим трудом, и нет полной уверенности, что выделенные штаммы обладают той же физиологией, что и наблюдающиеся в природе. Исходя из представления о строгой автотрофии серобактерий, Кейль (Keil, 1912), а затем Бавендамм (Bavendamm, 1924) культивировали

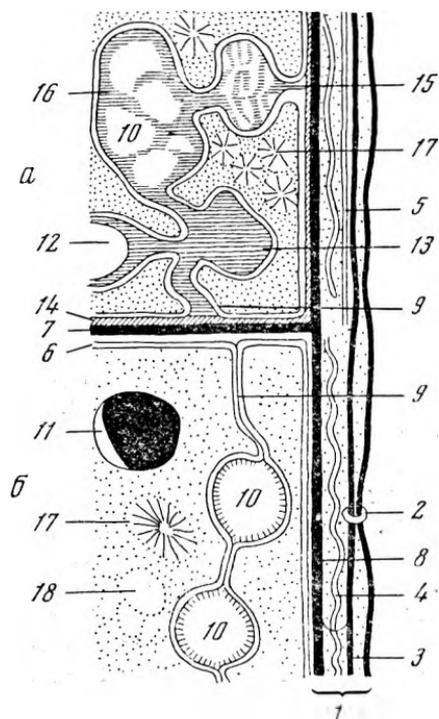


Рис. 31. Строение клеток *Thioploca* (а) и *Beggiatoa* (б) (Maier, Murray, 1965)

- 1 — клеточная стенка;
- 2 — наружный слой стенки;
- 3 — внутренний материал стенки;
- 4 — тройной слой во внутреннем материале стенки;
- 5 — четверной слой во внутреннем материале стенки;
- 6 — цитоплазматическая мембрана;
- 7 — поперечная стенка;
- 8 — внутренний слой стенки;
- 9 — внутриклеточные мембраны, отходящие от цитоплазматической мембраны;
- 10 — включения серы;
- 11 — включения волютина;
- 12, 13 — пустые и заполненные мембраны с вакуолями;
- 14 — плотный материал, связанный с мембраной;
- 15, 16 — содержимое вакуолей;
- 17 — суданофильные гранулы с радиальной структурой;
- 18 — пустые пространства неизвестной природы

серобактерии в атмосфере водорода, сероводорода, углекислоты и кислорода. На основании своих опытов эти авторы смогли придать большую категоричность выводу Виноградского и утверждать, что серобактерии могут строить свое тело целиком из углекислоты. Методика Кейля часто цитируется, но ее не удастся воспроизвести.

В дальнейшем аналогично тому, как это было с железобактериями, возникло предположение, что серобактерии — гетеротрофные организмы. Катальди (Cataldi, 1940) на среде с вываренным сеном нашла бесцветные организмы со скольльзящим движением типа *Oscillatoria*, которые мало отличались от *Beggiatoa*. Позднее эта работа была воспроизведена (Scotten, Stokes, 1962), и Фауст и Вольф (Faust, Wolfe, 1961) описали метод культивирования организмов, определенных ими как *Beggiatoa alba*. Накопительные культуры вели на среде с многократно экстрагированным кипящей водой сеном. Трихомы переносили пипеткой на агар с 0,2% дрожжевого экстракта и через несколько часов расплзшиеся трихомы вырезали вместе с куском агара. Организмы хорошо росли на среде с уксуснокислым натрием (CaCl_2 — 0,01%; KH_2PO_4 — 0,05%; ацетат натрия — 0,01%; казаминовые кислоты — 0,05%, pH 7,0), но сероводород оказывал на них угнетающее действие, и автотрофного роста получить не удалось. Следует при этом заметить, что в последнее время описано большое число скольльзящих бесцветных микроорганизмов, которые по своей морфологии напоминают *Beggiatoa*. Они объединены в группу скольльзящих бактерий (Sogiano, Lewin, 1965). Помещая обычный нитчатый гетеротрофный организм *Sphaerotilus* в атмосферу сероводорода, Скерман (Skerman et al., 1957) обнаружил отложения внутри клеток капель серы. Известно так же, что некоторые синезеленые водоросли откладывают внутри капли серы. Эти наблюдения делали возможным предположение, что отложение капель серы внутри клеток есть неспецифическая реакция, аналогичная, например, отложению формазана, образуемого из тетразолиев. Однако это не подтвердилось (Ordal, Palmer, 1964).

Представление о том, что серобактерии — литогетеротрофные организмы, нуждающиеся и в органическом веществе и в окислении серы, развивает Прингсхейм (Pringsheim, 1963). Для культивирования он рекомендует среду с 0,8% агара, 0,1% пептона, 0,1% мясного экстракта. При выделении рекомендуется вырезать кусок агара с отдельно расположенной нитью, чтобы не повредить трихом. Выделенные таким способом штаммы, хотя все они относились к *Beggiatoa leptomitiformis*, оказались различными по физиологическим признакам. Прингсхейм (Pringsheim, 1967) на основании опытов с выращиванием серобактерий в присутствии минимальных количеств ацетата и сероводорода пришел к заключению, что организмы нуждаются в обоих субстратах одновременно.

Автотрофная гипотеза получила некоторое подтверждение в опытах с гигантским морским серным микроорганизмом *Thiovulum*

majus (La Riviere, 1963). Чистую культуру удалось поддерживать в колбе, где создавался градиент давления кислорода. Сероводород добавляли в виде насыщенного раствора в морской воде.

Распространение серобактерий изучалось многими исследователями. Обычно они развиваются там, где имеет место образование сероводорода за счет разложения водной растительности, например по берегам Балтийского моря в бухтах, где разлагаются водоросли (Winogradsky, 1888; Bavendamm, 1924; La Riviere, 1963). Подводная съемка показала их массовое развитие на поверхности ила в пресных озерах, где они образуют сплошной покров. Серобактерии присутствуют практически во всех водоемах, но иногда количество их бывает очень невелико, особенно в олиготрофных водоемах. «Таким образом, размножение серобактерий вне серных источников зависит от деятельности других микроорганизмов, которые должны обеспечивать им преходящие условия существования» (Winogradsky, 1888, стр. 10).

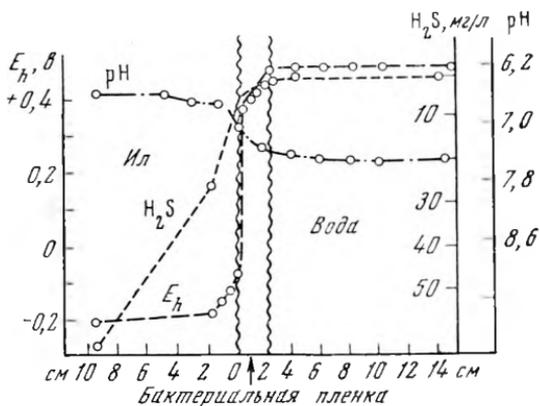
В сероводородных источниках серобактерии развиваются иногда в виде монокультуры, обрамляя снежно-белым налетом место выхода газа или сероводородной воды. *Beggiatoa* растут при этом в виде больших белых пятен или нежной белой сетки на дне в местах с замедленным течением. *Thiothrix* дает грязно-белые обрастания на подводных предметах в подвижной среде. В термальных источниках появляются длинные белые космы *Thiospirillum pistiense*. Скопление микроорганизмов в сероводородных источниках, в которых серобактерии играют часто ведущую роль, носит название барежины.

Обладая повышенной чувствительностью к таким факторам, как концентрации сероводорода, кислорода, нейтральная или щелочная реакция среды, серобактерии приспособлены к развитию в самых разнообразных условиях. Они дают массовый рост и на поверхности черного ила в солевых озерах в почти насыщенном растворе соли (Исаченко, 1927) и в пресных водоемах. Развитие серобактерий наблюдается и в холодной воде и при максимальной температуре, доступной для живых существ в термальных источниках.

Попытку характеризовать условия развития серобактерий сделал Бар и Шварц (Bahr, Schwartz, 1956). В качестве примеров биотопов были избраны сероводородный источник, евтрофные водоемы и ил очистных сооружений. Развитие *Beggiatoa* из сероводородного источника происходило при концентрации сероводорода 15 мг/л, а из евтрофного водоема — при 4—5 мг/л. Резкие изменения содержания сероводорода губительно действовали на микроорганизмы, к медленным изменениям бактерии приспосабливались. Бактерии из одного места обитания погибали в другом, хотя морфологически они принадлежали к одному виду. Развитие начиналось, когда в среде устанавливался постоянный окислительно-восстановительный потенциал, на который оказывало влияние даже изменение концентрации кислорода при изменениях барометрического давления.

Рис. 32. Гидрохимические показатели в сульфурете (Suckow, Schwartz, 1962)

Модельный опыт в аквариуме. На границе ил — вода происходит резкое изменение E_h и pH. Окисление сероводорода начинается в верхних слоях ила



Участие серобактерий в круговороте серы оценивается как незначительное (Иванов, 1964). Основная роль в превращениях серы отводится сейчас тионовым бактериям, в противоположность тому представлению, которое сложилось в начале века (Омелянский, 1904). Вместе с тем роль серобактерий в природе не следует преуменьшать. Бесцветные серобактерии — это типичные водные микроорганизмы, распространенные во всех водоемах, где имеется хотя бы слабое образование сероводорода. Поскольку серобактерии плохо переносят подкисление среды и высокие концентрации сероводорода (пышное развитие их идет при концентрации H_2S меньше 40 мг/л), то массовое развитие их может иметь место лишь в неравновесных условиях, там где происходит медленное образование сероводорода, имеется проточность среды или существует градиент в содержании сероводорода и кислорода. Развитие серобактерий на поверхности ила приводит к тому, что выделяющийся в иле сероводород не отравляет водную толщу. Если же происходит выделение сероводорода в воду, то бактерии могут в этих условиях образовать так называемую бактериальную пластинку, которую описал Егунов (1894). Резкое изменение условий в зоне бактериальной пластинки, ниже которой отсутствует кислород, а выше — сероводород, может оказывать значительное влияние на миграцию и осаждение металлов (рис. 32) (Suckow, Schwartz, 1962).

ТАКСОНОМИЯ СЕРОБАКТЕРИЙ

Серобактерии представляют собой физиологическую группу, члены которой обладают одним-единственным общим признаком, — способностью отлагать внутри клеток капли серы, причем предполагается, что эта сера может быть использована в энергетическом процессе. К серобактериям относят микроорганизмы различного происхождения: нитчатые серобактерии родов *Beggiatoa* и *Thiothrix*, серобактерии с гигантскими одиночными клет-

ками, такие как *Achromatium* или *Thiovulum*, и относительно мелкие формы, такие как *Thiospira*. Все эти организмы имеют между собой мало общего морфологически. Сложившаяся после работ Виноградского традиция заставляет относить бесцветные нитчатые формы к бактериям. Это деление искусственно и обосновано лишь тем, что граница между синезелеными водорослями и бактериями условна.

В своей обширной монографии по бесцветным водорослям Прингсхейм (Pringsheim, 1963) рассматривает серобактерии как бесцветные синезеленые водоросли. Эта позиция подкрепляется многочисленными случаями существования бесцветных форм среди других групп водорослей, где таксономические отношения более ясны. Морфологическое сходство синезеленых водорослей и некоторых серных и несерных бактерий используется для построения параллельных рядов. Разумеется, этот параллелизм заходит не слишком далеко, и его можно рассматривать как общую тенденцию, а не буквальное повторение. Такая картина была дана Гайдуковым (1926). Прингсхейм (Pringsheim, 1963) приводит следующий список параллелей:

Пигментированные формы	Бесцветные формы	
	без серы	с серой
<i>Oscillatoria</i>	<i>Vitreoscilla</i>	<i>Beggiatoa</i>
<i>Microcoleus</i>		<i>Thioploca</i>
<i>Spirulina</i>	<i>Spirulina albida</i>	<i>Thiospirillopsis</i>
<i>Microchaete</i>		<i>Thiochaete</i>
<i>Lyngbya</i>	<i>Leucothrix</i>	<i>Thiothrix</i>
<i>Letustinema</i>	<i>Crenothrix</i>	
<i>Crinalium</i>	<i>Simonsiella</i>	
<i>Synechococcus</i>		<i>Achromatium</i>

Обращает на себя внимание отсутствие среди параллелей микроорганизмов с бактериальным типом фотосинтеза.

Количество описанных серобактерий довольно велико, но все эти описания основываются на чисто микроскопических наблюдениях. Виды серобактерий трудно отличаются друг от друга, поэтому систематику этих организмов можно считать разработанной только до уровня рода.

Искусственный ключ к определению родов организмов, окисляющих серу

I. Сера отлагается вне непосредственной связи с клетками, некоторые окисляют серу, не отлагая ее. Мелкие одиночные клетки морфологически сходны с *Pseudomonas*.

Тионовые бактерии

II. Клетки окрашены в различные тона, но обязательно имеют хлорофилл.

Фотосинтезирующие бактерии

III. Внутри клеток или непосредственно на их поверхности отлагаются капли серы. Следует быть совершенно уверенным, что это действительно сера, а не жировые глобулы (поли- β -оксимасляная кислота). Не имеют фотосинтетических пигментов.

Серобактерии

А. Нитчатые организмы.

1. Клетки объединены в трихомы, только боковая поверхность клетки свободна. Сера отлагается в виде почти черных капель внутри клеток. Бесцветные.

а) Трихомы свободные постоянно подвижные благодаря способности к скользящему движению.

Прямые — *Beggiatoa*.

Спирально изогнутые — *Thiospirillopsis*.

б) Трихомы объединены в пучки слизистым чехлом, внутри которого сохраняют подвижность.

Thioploca

в) Трихомы одиночные, прикрепленные к субстрату слизистым диском

Thiothrix

2. Клетки изогнутые в цепочках. Сера отлагается на поверхности пучков нитей. До сих пор обнаружен только в термальных источниках.

Thiospirillum pistiense

3. Клетки обнаруживаются только по концам тончайших нитей, на поверхности которых отлагается сера.

Thiodendron Perfiliev

Б. Одноклеточные организмы размером более 10 мк.

1. Организмы неподвижные или движущиеся только при соприкосновении с субстратом. Внутри клеток капли серы, а у пресноводных форм также кристаллы углекислого кальция. Размеры клеток значительно больше, чем у обычных бактерий.

Achromatium

2. Организмы, подвижные благодаря наличию жгутиков.

а) Клетки крупные круглые или овальные, плазма оттеснена к одной стороне, в ней капли серы. Ожвлевенно подвижны благодаря многочисленным жгутикам.

Thiovulum

б) Клетки цилиндрические или слегка изогнутые, движутся благодаря единственному очень толстому жгутику, расположенному сзади клетки. Внутри клеток капли серы и сферулы углекислого кальция.

Macromonas

В. Одиночные организмы или в агрегатах; имеют размеры обычной бактериальной клетки.

а) Клетки спиральные подвижные, в середине клетки включения серы.

Thiospira

б) Мелкие бактериальные клетки в слизистых капсулах, образующие зооглейные колонии. Внутри клеток капли серы.

Thiobacterium

Beggiatoa Trevisan, 1842

К роду *Beggiatoa* относятся нитчатые бесцветные подвижные организмы различной толщины, которые никогда не прикрепляются к субстрату (рис. 33, а). Трихомы *Beggiatoa* очень напоминают по своему строению трихомы синезеленых водорослей рода *Oscillatoria* и бесцветных скользящих бактерий рода *Vitreoscilla*, от

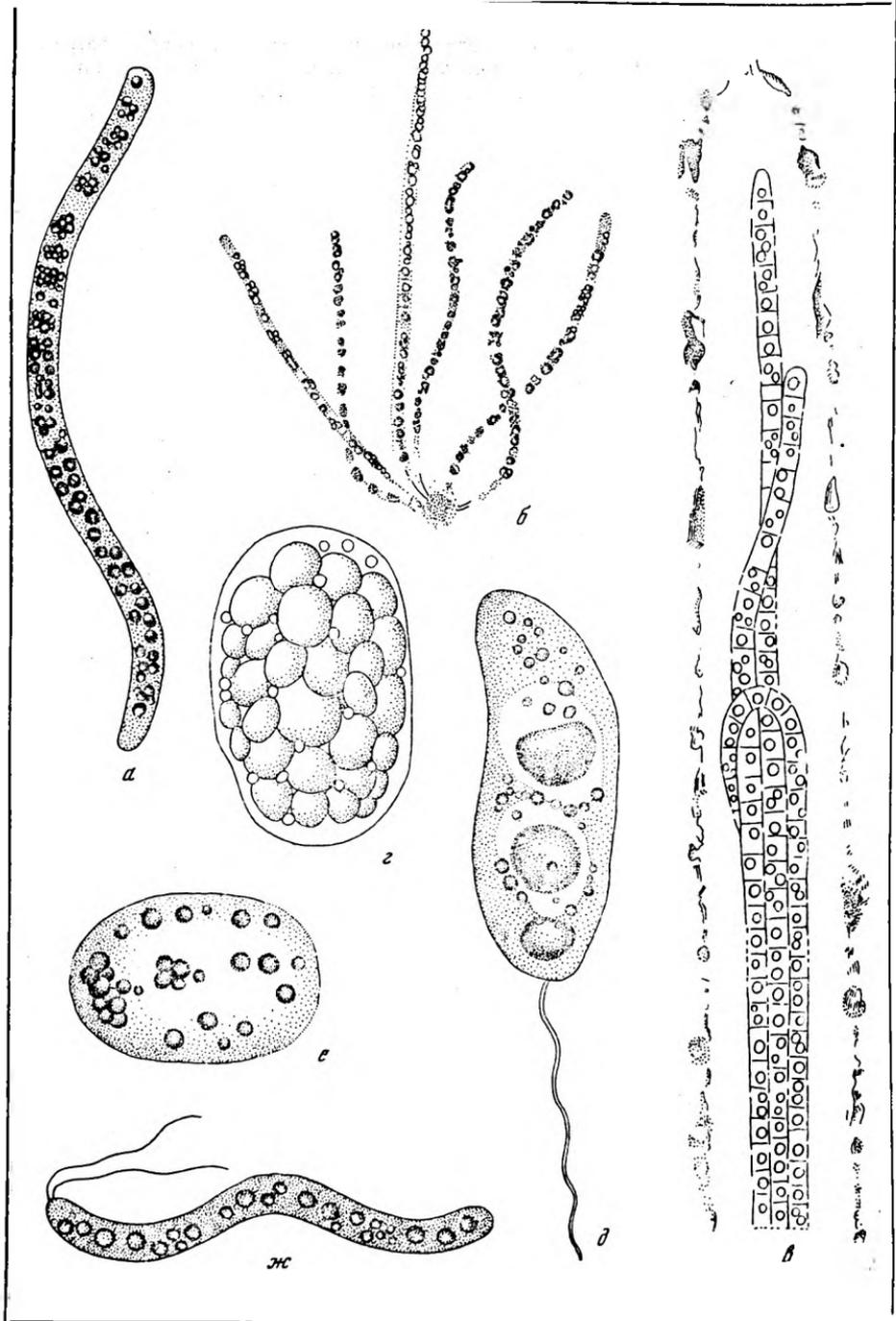


Рис. 33. Серобактерии. Увеличение 500 раз

а — *Beggiatoa*; б — *Thiotrix*; в — *Thioploca*; г — *Achromatium*; д — *Macromonas*
 е — *Thiovulum*; ж — *Thiospira*

которых они отличаются наличием включений серы. Трихом *Beggiatoa*, как было установлено Виноградским, растет интеркалярно, концевые клетки могут возникнуть только во время образования подвижных коротких трихомов — гормогониев. Деление и рост клеток внутри трихома происходит неравномерно, встречаются короткие и длинные клетки.

В трихомах *Beggiatoa* различать отдельные клетки удастся только после окраски. Между клетками трихома, по-видимому, существует внутренняя связь и в отличие от других нитчатых организмов, таких как *Vitreoscilla*, *Leucothrix*, трихомы *Beggiatoa* легко повреждаются механически. Подвижность обусловлена выделением слизи. Вопрос о типе питания *Beggiatoa* до сих пор остается открытым. Несомненно, что существуют гетеротрофные организмы, мало отличимые от *Beggiatoa*.

Виды *Beggiatoa* широко распространены в природе в малоподвижных водах с невысоким содержанием сероводорода.

Наблюдая за микрокультурами, Виноградский пришел к выводу, что поперечник нити *Beggiatoa*, несмотря на изменение условий, остается постоянным. За неимением лучшего, он предложил этот признак для диагностики видов. Этот признак продолжает использоваться и до настоящего времени, хотя биометрическими исследованиями не обоснован. Различают следующие виды *Beggiatoa*:

Виды <i>Beggiatoa</i>	Диаметр трихома, мк
<i>B. alba</i> (Vaucher, 1803) Trevisan, 1845	2,5—5
<i>B. arachnoida</i> (Agardh, 1827) Rabenhorst, 1865	5—14
<i>B. leptomitiformis</i> Trevisan, 1842	1—2,5
<i>B. minima</i> Winogradski, 1888	<1
<i>B. gigantea</i> Klass, 1937	26,4—55
<i>B. mirabilis</i> Cohn, 1865	15—21,5

Thiospirillopsis Uphof, 1927

Организм имеет трихомы, подобные трихомам *Beggiatoa*, но спирально изогнутые. Диаметр трихом 2—3 мк. Найден в озерах Флориды, содержащих сероводород, и, подобно *Spirulina*, которую он напоминает, обладает скользящим движением. Клетки внутри переполнены серой. Организм практически не изучен. Единственный вид *Thiospirillopsis floridana* Uphof, 1927.

Thioploca Lauterborn, 1907

Thioploca отличается от *Beggiatoa* наличием толстой слизистой капсулы, покрытой снаружи кусочками детрита, в которую заключены трихомы организма (рис. 33, в). В одной капсуле бывает от одной до двадцати трихомов, которые переплетаются между собой и сохраняют подвижность. Пучки *Thioploca* располагаются в верх-

гих слоях ила вертикально, пересекая окислительный и восстановительный горизонты, и непрерывно движутся, мигрируя то за кислородом, то за сероводородом (Перфильев, Габе, 1964). Способность к движению связана с питанием (Maier, Murray, 1965).

Морфология этих организмов по общему мнению исследовавших их авторов сходна с морфологией синезеленых водорослей *Microcoleis* и *Hydrocoleus*. Вислоух (Wislouch, 1912) считал, что он нашел у *T. ingrlica* пигменты, свойственные синезеленым водорослям. Организмы, принадлежащие к этому роду, обнаружены в морском и пресноводном иле, богатом кальцием (Kolkwitz, 1912).

Хотя нити, заключенные в одном футляре, могут различаться по толщине, диаметр трихомов используется для диагностики видов:

Виды <i>Thioploca</i>	Диаметр трихома, мк
<i>T. schmidlei</i> Wislouch, 1912	5,0—9,0
<i>T. ingrlica</i> Wislouch, 1912	2,0—4,5
<i>T. minima</i> Корпе, 1923	0,8—1,5
<i>T. mixta</i> Корпе, 1923	Трихомы разные: 6,8 и 1,0

Thiothrix Winogradski, 1888

Род *Thiothrix* был введен Виноградским для того, чтобы отличать прикрепленные серобактерии от подвижных *Beggiatoa*, к которым *Thiothrix* близок по строению. *Thiothrix* имеет прямые нити, которые прикрепляются своим основанием к субстрату (рис. 33, б). Обычно нити настолько переполнены каплями серы, что кажутся черными, отдельных клеток в трихоме различить не удастся. У основания *Thiothrix* имеется прикрепительный слизистый диск. Клетки по длине трихома различные, клетки апикальной части быстрее накапливают и используют капли серы. Размножение происходит короткими кусками нити, которые отделяются от апикального конца трихома. Такие образования называют гормогониями (Bahr, Schwartz, 1956, 1957; Pringsheim, 1963).

Виноградский подробно описал отделение гормогониев от нити. Гормогонии обладают собственным медленным скользящим движением и хорошо выраженным хемотаксисом. Закончив движение, гормогонии прикрепляются к субстрату, образуя прикрепительный диск. Если гормогонии прикрепляются к трихому *Thiothrix*, то наблюдается ложное ветвление. *Thiothrix* обладает тонким слизистым влагалищем. Морфологически *Thiothrix* близок к гетеротрофному морскому организму, выделенному и изученному Гарольд и Стеннером (Harold, Stanier, 1955) и названному ими *Leucothrix*.

Thiothrix встречается обычно в быстро текущих сероводородных водах. В автотрофных условиях организм удалось культивировать Кейлю и Бавендамму (см. выше), Ордал и Палмер (Ordal, Palmer, 1964) сделали попытку культивировать его в проточных условиях.

Виды организма, по предложению Виноградского, различают на основании ширины трихомов:

Виды <i>Thiothrix</i>	Диаметр трихома, мк
<i>T. nivea</i> (Rabenhorst, 1865) Winogradski, 1888	У основания 2,0—3,0, у конца 1,4—1,0
<i>T. tenuis</i> Winogradski, 1888	1,0
<i>T. tenuissima</i> Winogradski, 1888	0,5
<i>T. vouki</i> , Klas, 1936	15—30
<i>T. longiarticulata</i> Klas, 1936	3,3—6,5 (клетки длинные 19—33 мк)
<i>T. anulata</i> Molisch, 1912	3,3—4,0
<i>T. marina</i> Molisch, 1912	1,0—1,3

Achromatium Schewiakoff, 1893

Achromatium — крупный одноклеточный организм овальной формы (рис. 33, з). Движение, если оно наблюдается, медленное, кувыркающееся, происходит только пока организм находится в соприкосновении с субстратом. Клетки делятся перетяжкой в середине. Они не обладают фотосинтетическими пигментами. Обычно содержат такие включения, как капли серы и углекислого кальция. Причины появления последнего включения неясны. Кроме размножения перешнуровыванием, *Achromatium* приписывается способность образовывать нанноциты (Virieux, 1912, 1913), как это свойственно некоторым синезеленым водорослям. В микрокультуре по Виноградскому организм размножался в сероводородной воде и откладывал серу внутри клеток (Devide, 1954). Микроаэрофил; размеры *Achromatium* сильно варьируют. Обычные размеры 30—40 мк длиной и 10—18 мк шириной, но встречаются клетки длиной и в 3 и 10 мк. По своему строению *Achromatium* близок к синезеленой водоросли *Synechococcus*.

Ван Ниль (van Niel, 1957) отнес к роду *Achromatium* такие организмы, как *Thiophysa macrophysa*, *Thiosphaerella amyliifera*, которые имеют включения серы, но не углекислого кальция и встречаются в море. Девиде (Devide, 1949, 1954) описал сходный организм, неспособный к движению, под названием *Thiogloea*.

Точку зрения ван Нилья о том, что *Achromatium* нельзя различать по размерам, подтвердил Перфильев (Перфильев, Габе, 1964), который изолировал организм в коллоидной камере и наблюдал за потомками одной клетки. Он нашел, что размеры клетки сильно варьируют. Типовым видом признается *Achromatium oxaliferum*.

Thiovulum Hintze, 1913

Этот микроорганизм имеет круглые или овальные клетки диаметром 5—25 мк (рис. 33, е). Серные включения располагаются обычно на одном конце клетки, но иногда заполняют всю клетку.

Размножается делением, которому предшествует образование перетяжки. Оживленно подвижен, при движении вращается вокруг оси. Жгутики перитрихиальные бактериального типа, обнаруживаются лишь при фиксации подвижных клеток. Клетки обладают выраженным хемотаксисом и собираются в зоне оптимального содержания сероводорода и кислорода. Цитологию *Thiovulum* исследовали на ультратонких срезах (Faugé-Fremiet, Ruiller, 1958; de Boer et al., 1961); организм имеет ядро бактериального типа, и деление его напоминает бактериальное. У *Thiovulum* обнаружена система мембран, в том числе своеобразная фибриллярная органелла, расположенная у поверхности клетки между наружной и внутренней мембранами. Организм удалось выращивать в чистой культуре, отделив его от сопутствующей микрофлоры вследствие подвижности. Культивирование вели в специальной колбе, где создавался градиент окислительно-восстановительных условий. На органических средах организм не рос и добавление органических веществ не стимулировало рост. Изучение варибельности организма по размерам привело к выводу, что следует сохранить один вид *Thiovulum majus* Hintze.

Macromonas Utermöhl, Koppe, 1923

Macromonas представляет крупную, иногда изогнутую цилиндрическую бактерию, размножающуюся перетяжкой посередине (рис. 33, *д*). Единственный жгутик располагается при движении сзади. Внутри клетки, так же как у *Achromatium*, имеются включения в виде мелких капелек серы и иногда углекислого кальция. Жгутик у *Macromonas* значительно больше бактериального; его можно увидеть в световом микроскопе без специальной окраски. Организм напоминает *Achromatium*, с которым он встречается в сообществе, но таксономическое положение *Macromonas* среди бактерий несколько неопределенно. Различают два вида:

Macromonas mobilis (Lauterborn, 1915) Utermöhl, Koppe, 1923. Клетки слегка изогнутые, 8—14 × 12—30 мк. Жгутик виден без специальной окраски.

Macromonas bipunctata (Gicklhorn, 1920) Utermöhl, Koppe, 1925. Клетки цилиндрические, бесцветные, 3—5 × 8—12 мк.

Thiospira Vislouch, 1914

К этому роду отнесены крупные подвижные спириллы, содержащие внутри клеток капли серы (рис. 33, *ж*). Описано большое число видов этих бактерий, но подробно они не изучены. Владимирова (1958) полагала, что они могут окислять сероводород только в присутствии дрожжевого автолизата. Из морских сероводородных илов была выделена очень тонкая спирилла диаметром 0,1—0,2 мк, которая образовывала на агаре большие диффузные колонии, бе-

лые от выпавшей серы. Организм был аналогичен *T. thioparus* в отношении рН и температурного оптимума, максимальной удельной скорости роста, образования серы из тиосульфата и облигатной литотрофии. Ацетат увеличивал урожай на среде с тиосульфатом на 10—15%, и примерно такая же часть углерода включалась в клетки (Kuenen, Veldkamp, 1970). Среди *Thiospira* различают: *T. winogradskyi* (Omelianskii, 1905) Vislouch, 1914 с клетками 2,0—3,5×50 мк и одним-двумя полярными жгутниками, *T. bipunctata* (Molisch, 1912) Vislouch, 1914 со слегка изогнутыми клетками 1,7—2,4×6,6—14 мк, с зернами волютина на полюсах и небольшими каплями серы; *T. elongata* Perfiliev с заостренными концами и кристой как у трепонем; *T. agilis* Kolkwitz, напоминающая, за исключением капель серы, *Spirillum undula*. Поскольку многие спириллы являются микроаэрофилами и хорошо развиваются в среде, где есть такие восстановители, как водород или сероводород, нет уверенности, что наблюдавшиеся морфологические формы представляют самостоятельные виды, а не формы роста гетеротрофных спирилл.

Thiobacterium Janke, 1925

Здесь относятся мелкие неподвижные палочки, способные отлагать серу внутри клеток (*T. bovista*) или вне их (*T. cristallyferum*, *T. retiformans*). В последнем случае отличия от микроорганизмов рода *Thiobacillus* выражены недостаточно.

T. bovista (Molisch, 1912) Janke, 1925 образуют шаровидные колонии в виде пузырьков. В клетках находятся одна-две капли серы. В культуре не получены.

Thiospirillum pistiense Czurda, 1935 (syn: *Thermus aquaticus*)

Под этим названием Чурда (Czurda, 1935) описал спириллы, развивавшиеся в термальных сероводородных источниках Чехословакии. Впоследствии Кузнецов (1955) под тем же названием описал своеобразный облигатно термофильный микроорганизм, встречающийся в термальных источниках Камчатки, Карпат, Курильских островов. По нашим наблюдениям, этот организм не развивается при температуре ниже 50°, верхний предел лежит около 75°. Организм растет только в местах с быстрым течением воды, обрамляя грифоны. Космы его имеют ярко-белый цвет от отложений серы, которая покрывает нити организма. При температуре выше 70° сера не откладывается, и тогда нити имеют красноватый цвет. Нити состоят из цепочек крупных изогнутых палочек диаметром 1 мк. Содержимое клеток гомогенно, влагалитце отсутствует. Соединенные в цепочки клетки могут вращаться в местах соединения, и таким образом соседние нити заплетаются друг за друга и не отрываются,

несмотря на скорость течения. Космы организма могут достигать длины многих десятков сантиметров.

Источники, в которых развивался организм, имели нейтральную или слабощелочную реакцию до pH 8,4, содержали очень небольшое количество сероводорода. Серобактерии, растущие в источниках Йеллоустонского парка при 80—90°, описали Брок и соавторы (Brock et al., 1971). Таксономическое положение организма неясно.

Thiodendron latens Perfiliev, 1969

Обнаружен в Крыму в Чокракском сульфидном источнике, где концентрация сероводорода периодически варьировала от 20 до 200 мг/л. Колонии организма состоят из множества тончайших нитей на пределе разрешающей способности микроскопа. Колония раскалывается вдоль нитей с образованием граней, на которых видны концентрические слои. Иногда вместо серы откладывается гидросернистое железо. Тончайшие нити могут образовывать на концах вибриноподобные клетки со жгутами. В толще ила или песка организм развивается в виде невзрачных паутинок. Судя по описанию, он близок к группе *Metallogenium*.

T. latens, по мнению Перфильева (1969), обладает типичным гифомикробным строением и циклом развития, включающим следующие стадии: подвижная одноклеточная в виде вибрионов размерами около 1×3—7 мк; зооглейная; гифомикробная с образованием тонких нитей с почками.

Под названием *Thiobacter uniguttatum* Perfiliev, Pelsch, 1936 Пельш (1936) описал обнаруженные в соленых озерах Крыма и Кара-Богаз-Голе мелкие бактериальные клетки, соединенные тонкими нитями, наподобие того, как это наблюдается у гифомикробов.

ТИОНОВЫЕ БАКТЕРИИ

Тионовые бактерии представляют единую в морфологическом и биохимическом отношении группу. Все тионовые бактерии способны использовать энергию окисления восстановленных соединений серы в серную кислоту для ассимиляции углерода, построения клеточного тела и всех остальных функций. Некоторые из тионовых бактерий могут использовать для своей жизнедеятельности, кроме окисления серы, окисление других соединений, например органических веществ или закисного железа. Большинство тионовых бактерий способно к автотрофной ассимиляции углекислоты, и для некоторых из них углекислота является единственным источником углерода, другие могут использовать также органические вещества.

От гетеротрофных бактерий, способных окислять соединения серы, тионовые бактерии отличаются тем, что используют энергию

этого окисления для своей жизнедеятельности. От бесцветных серобактерий тионовые отличаются морфологическими признаками и отсутствием заметных включений серы внутри клетки.

Род *Thiobacillus* объединяет организмы в соответствии с единством их морфологических и биохимических признаков. Это позволяет рассматривать основные биохимические механизмы и морфологию всего рода в целом. Вместе с тем разделение рода на виды обусловлено преимущественно физиологическими признаками и второстепенными биохимическими механизмами. Именно физиологические признаки играют определяющую роль в экологии и геохимии тионовых бактерий.

Морфологически тионовые бактерии представляют собой мелкие палочки с округлыми концами и полярным жгутиком — типичные псевдомонады. Клетки большей частью встречаются одиночно или в парах, редко образуя короткие цепочки. Размеры клеток варьируют в пределах 0,5—0,8 мк в ширину и 0,9—1,5 мк в длину. Размножение клеток происходит путем деления пополам. Клетки грамотрицательны. Хотя различным штаммам тионовых бактерий присущи некоторые второстепенные морфологические различия, достаточно стойкие при определенных условиях культивирования, они не выходят за пределы различий, свойственных *Pseudomonas*.

Сравнительное изучение семи видов тиобацилл на ультратонких срезах показало, что они очень похожи на другие грамотрицательные бактерии (Shively et al., 1970). Клеточная стенка типичного для грамотрицательных бактерий трехслойного строения имеет волнистую наружную мембрану толщиной 7—8 нм. Срединная пластинка варьирует от очень выраженной у *T. thiooxidans* до диффузной у *T. novellus*. Из интрацитоплазматических мембранных образований обнаружены мезосомы и пачки мембран у полюсов клеток *T. thiooxidans*, но, вообще говоря, внутриклеточные мембраны далеко не так развиты, как у других бактерий. В цитоплазме располагаются рибосомы. Ядерная область содержит либо нити, либо компактный материал. Вакуоли отсутствовали. Из включений были отмечены гранулы полиоксимагния кислоты, волютина, возможно гликогена. В клетках тиобацилл нашли гексагональные включения размером около 100 нм, иногда до 60 на клетку. В клетках *T. intermedius* были найдены большие паракристаллические включения неизвестной природы. В полярных областях клетки иногда располагаются малоплотные для электронов полярные шапочки, которые хорошо наблюдаются в световом микроскопе. В ранних работах была попытка связать эти шапочки с механизмом проникновения серы в клетку и рассматривать их как серные вакуоли.

Деление клеток тионовых бактерий происходит типичным для грамотрицательных палочек образом. Клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана впячиваются внутрь клетки. На послед-

нем этапе деления цитоплазматическая мембрана уже отделяет сестринские клетки друг от друга, а клеточная стенка еще не сомкнулась.

Таким образом, несмотря на своеобразие тионовых бактерий как в отношении обмена, так и способности существовать в исключительно кислой среде, внутреннее строение этих организмов, насколько позволяют судить современные методы, не несет существенных отличий от обычных граммотрицательных гетеротрофов, таких, как *Pseudomonas*. Особенно следует подчеркнуть отсутствие у этих хемоавтотрофных организмов развитой системы внутренних мембран, свойственных, например, нитрифицирующим бактериям. Жгутики имеют типичное для бактерий строение и нормально функционируют даже в весьма кислой среде.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ТИПЫ И СИСТЕМАТИКА ТИОНОВЫХ БАКТЕРИЙ

Бактерии, принадлежащие к роду *Thiobacillus*, несмотря на единообразие биохимических механизмов, обнаруживают удивительную физиологическую приспособленность к условиям обитания. Если оставить в стороне обычные для бактерий варианты, обусловленные приспособлением к условиям температуры и солености, которые представлены у тионовых бактерий крайне галофильными (25% поваренной соли в среде) и термофильными штаммами, то разнообразие тионовых бактерий определяется прежде всего устойчивостью используемых соединений серы. Как следует из диаграммы $E_h - pH$ (см. рис. 30), область развития тионовых бактерий совпадает с метастабильным состоянием восстановленных соединений серы.

Между тиобациллами, развивающимися в кислой, щелочной или нейтральной средах, существует различие, обусловленное тем, что сероводород неустойчив в кислой среде. Вместе с тем подкисленные среды при образовании серной кислоты приводит к тому, что ацидофобные тионовые бактерии могут существовать только в том случае, если среда обладает достаточными буферными свойствами, например за счет большого резерва карбонатов или удаления образующейся серной кислоты в проточных условиях.

По способности к денитрификации и росту в анаэробных условиях выделяется группа денитрифицирующих тионовых бактерий.

Наконец, последнюю группу составляют бактерии, способные в той или иной степени использовать органическое вещество.

Самостоятельный признак представляет использование в качестве энергетического субстрата окисления закисного железа, которым обладает ацидофильный *T. ferrooxidans*. Ввиду особых

свойств этого организма он будет рассмотрен отдельно, так как при росте на железе он представляет физиологический тип автотрофной железобактерии. Показано (Заварзин, 1964), что существующие физиологические виды тионовых бактерий соответствуют всем возможным сочетаниям руководящих физиологических признаков. Отсутствующие «виды» невозможны, потому что сочетания признаков, которые характеризовали бы такие виды, содержат хотя бы пару несовместимых признаков. Руководящими признаками являются: а) облигатная автотрофия (антитеза — способность к гетеротрофному росту), б) развитие в кислой среде (антитеза — отмирание при низком рН), в) способность к денитрификации (антитеза — облигатные аэробы), г) окисление железа. Поскольку окисление железа возможно только в кислой среде, а денитрификация идет в нейтральной или щелочной, число логических возможностей для видов тионовых бактерий сокращается, так как ни одна комбинация признаков не может содержать несовместимой пары. Отсюда остаются разрешенными комбинации: автотрофных тиобацилл, 1) развивающихся в кислой среде — *T. thiooxidans*, 2) окисляющих железо — *T. ferrooxidans*, 3) развивающихся в нейтральной среде — *T. thioparus*, 4) денитрифицирующих — *T. denitrificans*; гетеротрофных: 5) развивающихся в нейтральной или щелочной среде — *T. novellus*; 6) денитрифицирующих — неназванные тиобациллы, описанные Бейеринком, Тюльпановой-Мосевич, Тейлором и Гоаром (см. ниже). По неизвестным причинам пока не удалось выделить гетеротрофные тиобациллы, развивающиеся в кислой среде.

Сравнение большого числа штаммов тионовых бактерий методами нумерической систематики подтвердило обоснованность такой таксономической схемы.

Тиобациллы, развивающиеся в кислой среде, на основании нумерического анализа, в котором сравнению было подвергнуто большое количество штаммов, отчетливо распались на две группы: *T. thiooxidans* и *T. ferrooxidans*; *T. concretivorus* (способный расти на нитрате как источнике азота) не был обнаружен, и его статус представляется сомнительным (Hutchinson et al., 1966). Денитрифицирующие тиобациллы вполне отчетливо отличимы от *T. thioparus*. *T. denitrificans* способен окислять тиоцианат анаэробно, *T. thioparus* неспособен к этой реакции. *T. thioparus* и «*T. trautweinii*» слабо росли в анаэробных условиях, но не образовывали заметных количеств газа. *T. denitrificans* при аэробном росте был более чувствительным к кислотности среды, останавливаясь в развитии при рН 5,0.

Тиобациллы, которые развивались при нейтральной реакции среды и не были устойчивыми к кислотности, разделились на группы, соответствующие *T. novellus*, *T. thioparus* и *T. neapolitanus*. Различие между последними двумя видами основывалось на разной устойчивости к подкислению. *T. thioparus* не снижал рН ниже рН

3,5, а *T. neapolitanus* доводит рН до 2,8, но между ними есть и более глубокая биохимическая разница. Использованный набор тестов не обнаружил существенных различий между *T. thioparus* и *T. thiooxyanooxidans* (Hutchinson et al., 1965, 1966, 1967).

С последним выводом нельзя вполне согласиться, так как исследованные нами штаммы значительно отличаются по отношению к тиоцианату. Гутчинсон с соавторами рассматривают *T. intermedius* как гетеротрофный кислотоустойчивый организм, но штамм-голотип при рН 2,8 отмирает, поэтому его нельзя считать кислотоустойчивым. Нумерический анализ подтвердил также мнение о том, что гетеротрофные микроорганизмы типа «*T. trautweinii*» не относятся к тионовым бактериям.

Таким образом, нумерические методы не прибавили ничего существенного к тому, что могло быть получено при традиционном сравнении штаммов. Выделение культур тионовых бактерий осуществляется с помощью высокоэлективных сред, которые до опыта предопределяют различия между группами. Состав ДНК тиобацилл исследован Джексоном и соавторами (Jackson et al., 1968).

Список тионовых бактерий включает большое число «видов», которые в настоящее время не признаны. Более удобным представляется рассмотрение тионовых бактерий по «физиологическим видам», приведенным ниже.

Искусственный ключ к определению видов *Thiobacillus*

1. Бактерии, развивающиеся в нейтральной и щелочной среде.

А. Строго автотрофные.

1. Способные к денитрификации с образованием свободного азота.

T. denitrificans

2. Неспособные к денитрификации с образованием свободного азота.

а) Снижают рН среды не ниже 3,5.

T. thioparus

б) Снижают рН среды до 2,8.

T. neapolitanus

Б. Способные к использованию органических веществ.

1. Способные к денитрификации с образованием свободного азота.

«*T. denitrificans*» (Beijerinck, Тюльпанова-Мосевич) *Thiobacillus* A2
(Taylor, Hoar)

2. Неспособные к денитрификации с образованием свободного азота.

а) Миксотрофные, растут и на органических и на неорганических средах, кислотоустойчивые.

T. novellus

б) Литогетеротрофные, конечное значение рН 2,8.

При этой кислотности культуры могут отмирать. Потребность в органическом веществе при росте на тиосульфате облигатная (*T. perometabolis*) или же органическое вещество значительно усиливает рост на средах с тиосульфатом (*T. intermedius*)

II. Бактерии, развивающиеся в кислой среде.

А. Окисляют только молекулярную серу, штаммы, окисляющие тиосульфат, образуются как мутанты и не выделены в самостоятельный вид.

T. thiooxidans.

Б. Кроме молекулярной серы способны окислять сульфидные минералы и закисное железо.

T. ferrooxidans

Типичным представителем автотрофных тионовых бактерий, развивающихся при нейтральной реакции среды, является *T. thioparus*, выделенный сначала Натансоном (Nathanson, 1902), затем Бейеринком (Beijerinck, 1904), Старки (Starkey, 1934), Вишняком (Vishniac, 1952) и Соколовой (1963), которые детально изучали его физиологию. Штаммы, выделенные этими исследователями, рассматриваются как типичные для вида, хотя между ними имеются некоторые второстепенные различия.

Выделение проводят на среде с тиосульфатом натрия при pH 7—9. Развитие сопровождается появлением на поверхности среды более или менее обильной пленки серы. На агаризованной среде *T. thioparus* образует характерные мелкие приподнятые колонии, ярко-белые от покрывающей их среды. Для обнаружения и выделения организмов используют среду, содержащую 5—10 г/л тиосульфата натрия и по возможности хорошо забуференную, так как организм очень чувствителен к снижению pH и в незабуференной среде быстро погибает. В качестве буфера в среде часто применяют карбонаты. Примером может служить среда Бейеринка.

Морфологически *T. thioparus* — мелкая $0,5 \times 1,0$ — $1,5$ мк палочка, одиночная или в парах, подвижная благодаря одному полярному жгутику, граммотрицательная. Организмы, относящиеся к типичному *T. thioparus*, строго автотрофны и не растут на органических средах. Организм окисляет сероводород и гидросульфид-ион. Доступность сульфидов определяется их спонтанным разложением в воде. Большинство сульфидов не используется, в том числе плохо окисляется сульфид натрия. Исключение представляет хорошо окисляющийся сульфид кальция (Соколова, Каравайко, 1964).

Тиосульфат быстро используется *T. thioparus* с образованием различных промежуточных продуктов, но, как правило, в среде появляется либо сера, либо полиитионаты. Конечным продуктом окисления является сульфат.

Тетратионат, как образованный во время развития культуры, так и внесенный извне, быстро окисляется. Окисление серы, наблюдавшееся уже в первых опытах Натансона и Бейеринка, было исследовано Якобсеном (Jacobsen, 1912), и его отмечали многие исследователи. Соколова (1963) показала, что серная руда, содержащая 25% серы и 75% карбонатов, служит хорошим субстратом для развития *T. thioparus*, продуктом окисления является серная кислота. На этой среде концентрация клеток *T. thioparus* очень высока. Окисление сульфита, несмотря на малую энергетическую

эффективность процесса, может служить источником энергии для *T. thioparus*. Считается, что типичный *T. thioparus* не окисляет другие соединения.

Продуктами окисления являются сера, политионаты (прежде всего тетратионат) и серная кислота. Только последняя является обязательным продуктом обмена, появление остальных соединений зависит от условий культивирования и от штамма. Например, в одинаковых условиях культивирования только у штамма Соколовой не образовывался тетратионат. Образование серы зависит от условий культивирования, прежде всего оно обуславливается возрастанием концентрации субстрата и ограничением поступления кислорода. При хорошо отрегулированном и стабильном значении pH, аэрации и невысокой концентрации субстрата сера не образуется, тиосульфат количественно окисляется в сульфат. Образование серы из тиосульфата, по-видимому, обусловлено биологическими реакциями, так как оно происходит с заметной скоростью и не коррелирует с образованием политионатов.

Скорость образования серной кислоты в значительной степени определяется аэрацией, при энергичной аэрации вообще не образуются ни политионаты, ни сера. Напротив, при недостаточной аэрации происходит накопление политионатов, которое может идти и в анаэробных условиях. Кузнецовым и Соколовой (1960) было показано, что развитие *T. thioparus* может идти при крайне ограниченном поступлении кислорода в среду. Более того, повышенная аэрация подавляла развитие *T. thioparus*. Этим объясняется нахождение таких бактерий в природе в «анаэробных» условиях.

Тщательное исследование роста *T. neapolitanus* в проточной культуре было проведено Гемпфлингом и Вишняком (Hempfling, Vishniac, 1967) с целью определения урожая клеток на моль окисленного до серной кислоты тиосульфата. Урожай возрастал линейно от 4,5 г сухого веса клеток на моль окисленного тиосульфата при скорости протока $D=0,15 \text{ час.}^{-1}$ до 8 г/моль при $D=4,5 \text{ час.}^{-1}$

Существенным признаком *T. thioparus* является его кислото-неустойчивость. По ходу развития культуры pH снижается по мере образования серной кислоты. Накопление политионатов и молекулярной серы до некоторой степени замедляет этот процесс при росте культуры на тиосульфате. Оптимальное значение pH для роста было определено Соколовой при pH 8,5—9,8, но у других штаммов развитие идет нормально вплоть до pH 7. Около pH 5 развитие культуры прекращается, но клетки продолжают окислять соединения серы до pH 3,5, при котором культура погибает. На основании своих опытов Соколова и Каравайко (1964, стр. 77) сделали вывод, что «в отношении кислотности изученные штаммы *T. thioparus* резко отграничены от *T. thiooxidans*». Штаммы, выделенные другими исследователями, отличались от описанных Соколовой в отношении pH. Вишняк определил оптимум pH своих культур при pH 7, Баалсруд и Баалсруд (Baalsrud, Baalsrud,

1952) — при рН 6—4,5 для разных штаммов, Старки (Starkey, 1934) нашел оптимум в пределах рН 9—6, штаммы, выделенные из термальных источников, имели оптимум при рН 5—6 (Заварзин, Жилина, 1964). Таким образом, имеется широкий набор штаммов, различающихся устойчивостью к кислотности среды. Типичный *T. thioparus*, который развивается при наиболее высоких рН, образует значительное количество серы и не образует тетратрионата, хорошо опознается по образованию на агаризованной среде Бейеринка снежно-белых от выпавшей серы колоний. Штаммы, развивающиеся при более низких рН, имеют характерные розоватые или желтоватые колонии и не покрыты белым осадком серы; их следует относить к *T. neapolitanus* («*Thiobacillus X*» Parker et Prisk) (Parker, 1945, 1947; Parker, Prisk, 1953). В отличие от *T. thioparus* этот организм образует во время развития тетратрионат и способен окислять это соединение. Выделение в самостоятельный вид штаммов, отличающихся большей устойчивостью к кислотности среды и образующих преимущественно политрионаты, а не серу как продукт неполного окисления, позволяет объяснить многие различия в описании тионовых бактерий разными авторами.

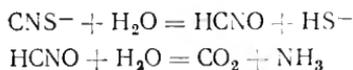
Особенности развития тионовых бактерий в среде с непостоянным рН обусловлены разной чувствительностью системы конструктивного обмена, в первую очередь системы автотрофной фиксации углекислоты и энергетической системы, к изменениям рН. Если окисление соединений серы продолжает идти вплоть до рН 2,5, то ассимиляция углекислоты прекращается значительно раньше: при рН 5 все исследованные штаммы прекращали фиксацию CO_2 , хотя максимум фиксации располагался у *T. thioparus* при рН 7, а у штаммов, выделенных из термальных источников, — при рН 5,5 (Заварзин и др., 1968).

Типичные штаммы вида *T. thioparus* не окисляют сульфиды, если эти соединения не разлагаются химически с образованием сероводорода. Ляликова (1967), исследуя окисление сульфида сурьмы — антимонита, выделила и кратко описала организм, который в щелочной среде вызывал окисление этого минерала. Рост организма на среде Бейеринка практически не отличался от *T. thioparus*. Окисление серы минерала сопровождалось появлением окисных соединений сурьмы. Ляликова допускала возможность того, что окисление сурьмы служит дополнительным источником энергии для организма, обозначенного как «*Thiobacillus Y*».

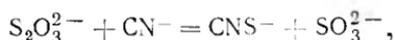
В самостоятельный вид *T. issachenkoi* Заславский (1952) объединил облигатно галофильные организмы, описанные Исаченко и Салимовской (1928), близкие по физиологии *T. thioparus*. Эти бактерии, способные развиваться в насыщенном растворе солей в лагунах и лиманах, играют важную роль в круговороте серы. По отношению к солёности у тиобацилл существуют самые различные градации, от развития в 26%-ном растворе поваренной соли до отмирания, когда концентрация превышает 0,2—1%. Вместе с тем

облигатно галофильные формы довольно быстро меняют оптимум солености путем приспособления к новым условиям (Заславский, 1952).

Компонентом, часто загрязняющим сточные воды, является роданид. Бактерии, способные разлагать роданид, были обнаружены Хаппольдом и выделены в чистую культуру (Happold, Key, 1937; Happold et al., 1954). При развитии на среде Бейеринка с тиосульфатом организм практически не отличим от *T. thioparus*, но обладает способностью расти на среде с роданидом как единственным источником окисляемой в энергетической реакции серы и используемых для энергетических целей углерода и азота. Юатт (Youatt, 1954) показала, что механизм разложения роданида включает прежде всего энзиматический гидролиз с образованием сероводорода и спонтанно разлагающегося цианита:



Сероводород окисляется до сульфата без накопления промежуточных продуктов. При развитии в присутствии серы, тиосульфата и сульфида клетки не могли сразу же переходить на окисление роданида, фаза задержки указывала на адаптивный синтез фермента. Организмы, выращенные на среде с роданидом, сразу же окисляли тиосульфат. *T. thiocyanooxidans* обладает роданазой — ферментом, катализирующим реакцию:

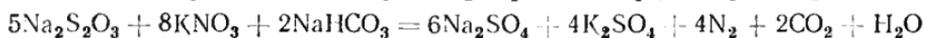


которая способствует освобождению среды от цианидов (McChesney, 1958). Роданаза оказалась ферментом, стоящим на пути основных превращений соединений серы и у других тиобацилл (Le John et al., 1967). В связи с этим неудивительно, что у различных штаммов тионовых бактерий в различной степени наблюдалась способность окислять роданид (Van der Walt, de Kruyff, 1955; de Kruyff et al., 1957; Wooley et al., 1962). Кроме автотрофных тионовых бактерий, окисляющих роданид, имеется в сточных водах большое число различных гетеротрофных форм, способных разлагать это соединение.

Денитрифицирующие тионовые бактерии впервые были обнаружены Бейеринком (Beijerinck, 1904). Их широкое распространение было установлено начиная с работы Геринга (Göhring, 1915) и подтверждено в последующем. Однако выделение в чистую культуру сопряжено с некоторыми затруднениями. Лиске (Lieske, 1912) получил накопительную культуру в цилиндре, засевая его сероводородным илом из пруда. В жидкости на определенном расстоянии от поверхности образовывались три-четыре опалесцирующие зоны одна под другой. Из нижней зоны была выделена мелкая неспоровая палочка, которая не росла при давлении кислорода выше

$\frac{1}{5}$ атмосферного. Лиске писал (Lieske, 1912, стр. 21): «Совершенно бесспорно, что имеются все мыслимые переходы от сильно аэробных серных бактерий к денитрифицирующим». Организм окислял сероводород, серу, тиосульфат и гидросульфит до серной кислоты, причем окисление шло ступенчато: сначала образовывались неполностью окисленные продукты, потом серная кислота. Выделенный Лиске денитрификатор был неспособен к гетеротрофному росту. К тому же типу принадлежали денитрификаторы, выделенные из морского или пресноводного ила (Baalsrud, Baalsrud, 1954).

В связи с тем, что образование серной кислоты уравнивается у денитрифицирующих бактерий разложением нитрата, при их развитии не происходит такого резкого подкисления среды:



Организм может окислять тиосульфат и молекулярную серу либо за счет нитрата анаэробно, либо за счет кислорода. В последнем случае он не отличим от организмов группы *T. thioparus*. Первым продуктом окисления является тетрагидрат, который образуется, если культура мало активна. Из тиосульфата может образовываться и молекулярная сера. Наибольшая скорость окисления наблюдалась при pH 5,9—6,8; уже при pH 7,6 скорость окисления снижалась. Токсичными оказываются даже низкие концентрации нитрита, который образуется при недостатке окисляемого субстрата: 0,005% нитрита на 90% подавлял денитрификацию на среде с серой, но на среде с тиосульфатом нитрит мог служить окислителем и восстанавливался до N_2 .

Одной из своеобразных особенностей денитрификаторов этой группы, которую они разделяют, например, с *Micrococcus denitrificans* (см. главу 2), является их неспособность к восстановлению нитрата в конструктивном процессе. Для нормального роста им необходимо присутствие в среде аммония, который добавляют в виде 0,083% хлористого аммония. Организм нуждается также в большом количестве железа, не менее 0,25 мг/л.

T. denitrificans послужил объектом, на котором был установлен механизм усвоения углекислоты хемоавтотрофными организмами в работах Трудингера (Trudinger, 1955, 1956) и французских исследователей (Aubert et al., 1956, 1957 a, b). Эти работы подробно обсуждаются в главе 1. Углекислота усваивалась по рибулозодифосфатному циклу и лишь 3% углекислоты поступали через иные карбоксилирующие реакции.

Если организмы, выделенные Лиске и Баалсрудами, были строгими автотрофами, то организм, обнаруженный Бейеринком (Beijerinck, 1904) и затем Тюльпановой-Мосевич (1930), был способен к гетеротрофному росту. Организм выделен из ила пруда на среде Бейеринка с молекулярной серой и 0,05% нитрата. Как

и все денитрификаторы, эти организмы факультативные анаэробы и при росте в аэробных условиях они мало отличаются от микроорганизмов группы *T. thioparus*. В анаэробных условиях их развитие идет с выделением молекулярного азота. Это мелкие бесспорные палочки $0,5 \times 1,0$ мк. Подвижны благодаря наличию жгутиков, у штамма Бейеринка — 6—8 жгутиков, у штамма Тюльпановой — один полярный. Штамм Тюльпановой был описан как грамположительный. На агаре с тиосульфатом уже на второй день образуются разрывы в нижней части столбика за счет выделения азота. Организм рос на мясопептонном бульоне и на среде Бейеринка, где сера была заменена глюкозой, левулозой, лактатом. Оптимальная концентрация нитратов была 0,05%, при более высоком содержании развитие задерживалось, при 4% прекращалось. Продуктом окисления серы были сульфаты: более 90% потребленной серы обнаружено в серной кислоте. При развитии на среде Бейеринка происходило подщелачивание среды от pH 7,2 до 8,4. Сходные, но галофильные, микроорганизмы были обнаружены в образцах грязей Сакского, Чокракского, Бердянского, Майнакского, Старо-Русских озер.

Галофильные бактерии, неспособные к денитрификации, грамотрицательные перитрихи, получившие название *T. beijerinckii*, были выделены Исаченко и Салимовской (1928). Они образовывали сульфаты, но могли расти и на органических средах. Остается неясным, были ли все эти бактерии миксотрофного или же литогетеротрофного типа. Денитрифицирующие тионовые бактерии, прежде всего способные и к гетеротрофному росту, имеют большое значение в формировании подземных вод в районе Казахстана (Крамаренко, Призренова, 1961).

Тионовые бактерии, развивающиеся при кислой реакции среды, имеют своим типичным представителем *Thiobacillus thiooxidans*, открытого Ваксманом при изучении разложения серы в почве.

T. thiooxidans — палочка с закругленными концами размерами $0,5—0,8 \times 1,0—1,2$ мк, имеющая один полярный жгутик. Подвижность организма наблюдается в молодых культурах. Окраска по Граму давала неотчетливые результаты, но тонкое строение организма типично для грамотрицательных бактерий. Трудности с окраской, вероятно, обусловлены высокой кислотностью среды. Клетки *T. thiooxidans* иногда образуют слизь. Размножение происходит делением пополам, причем чаще всего клетки после деления расходятся, хотя иногда приходится наблюдать и цепочки. Клетки содержат биполярные липонидные включения. Пока не найдено никаких морфологических отличий в тонком строении клетки, соответствующих исключительной способности организма развиваться в кислой среде.

T. thiooxidans способен развиваться в сильно кислой среде вплоть до pH 0,6. В нейтральной среде организм не развивается, являясьацидофильной, а не ацидотолерантной формой. Основной субстрат,

который окисляет *T. thiooxidans*, молекулярная сера. Способность организма использовать сероводород, сульфиды, тиосульфат оспаривается, так как в кислой среде, где развивается *T. thiooxidans*, все эти соединения неустойчивы. Так, верхняя граница развития *T. thiooxidans* приблизительно совпадает с нижней границей устойчивости тиосульфата и находится при pH 4—5. Все перечисленные соединения разлагаются с образованием серы, что, конечно, не мешает применять их в лабораторных средах для культивирования *T. thiooxidans*. В настоящее время принимается, что тиосульфат-использующие штаммы *T. thiooxidans* образуются в результате мутаций, но такие формы легко могут быть выделены и непосредственно из природы.

Значительную трудность для объяснения физиологии *T. thiooxidans* представляет то обстоятельство, что сера совершенно нерастворима в воде. Чтобы объяснить, каким образом она проникает в клетки, было предложено несколько гипотез. Самые ранние из них предполагали непосредственный контакт между клеткой и частицами серы. Из культуры *T. thiooxidans* были сделаны углеродные реплики с частиц серы. На поверхности частиц найдены клетки, но это ничего не говорит о необходимости прямого контакта между клетками и серой. С этим предположением согласуются наблюдения о выделении клетками *T. thiooxidans* в среду смачивающих веществ, которые приводят к тому, что плавающая на поверхности среды сера с началом развития погружается на дно. Добавление смачивающих веществ несколько ускоряет развитие организма. По другой гипотезе окисление серы обусловлено участием восстановительного механизма, ведущего к образованию соединений типа политионатов, которые и окисляются бактериями. Эти соединения устойчивы в кислой среде и растворимы в воде. По современным представлениям, так называемая гидрофильная сера аналогична по строению политионатам. Наблюдения, что скорость окисления серы прямо пропорциональна логарифму поверхности серы, не противоречит ни той, ни другой гипотезе.

Способность *T. thiooxidans* окислять сульфидные минералы ограничена. В более старых работах окисление сульфидных минералов могло приписываться *T. ferrooxidans*, который при росте на соединениях серы мало отличим от *T. thiooxidans*. По современным взглядам, *T. thiooxidans* сульфидные минералы не окисляет.

Во всех случаях единственным продуктом окисления серы является серная кислота. Отмечено промежуточное образование тетратионата.

T. thiooxidans рассматривается как строго автотрофный организм, который не растет на органических средах, получая весь углерод путем автотрофной ассимиляции углекислоты в рибулозодифосфатном цикле и фиксации на фосфоенолпировиноградной кислоте. *T. thiooxidans* относительно нечувствителен к органическим веществам, за исключением кетокислот, прежде всего пиро-

виноградной кислоты. Было предположено, что неспособность *T. thiooxidans* окислять органические вещества (глюкозу) обусловлена накоплением токсического продукта окисления — пирувата. При выращивании в диализуемой культуре удалось получить рост *T. thiooxidans* на глюкозе, а в диализованной жидкости обнаружить токсические концентрации пировиноградной кислоты (Borichewski, Umbreit, 1966). Добавление пирувата при pH 2,3 приводит к быстрому накоплению его внутри клетки, в результате тормозится и окисление серы и ассимиляция углекислоты (Sivaji Rao, Berger, 1970). Данные о росте *T. thiooxidans* на глюкозе были подвергнуты критике (Rittenberg, 1969). Исследованные нами штаммы не росли на глюкозе и не усиливали роста в ее присутствии.

Кроме типового вида *T. thiooxidans*, разные исследователи выделили из природы еще ряд штаммов, отличавшихся от типового некоторыми второстепенными признаками.

По отношению к pH среды организмы группы *T. thiooxidans* различаются. Ваксман и Старки (Waksman, Starkey, 1923) нашли у своего штамма оптимум развития при pH 2,5, при pH 6,5 окисление снижалось наполовину и прекращалось при pH 7. Организм мог накапливать до 1% серной кислоты, но высокая начальная кислотность тормозила развитие. Штамм Каравайко (1962) с оптимумом при pH 2,2 не развивался при начальном pH 5,5. Напротив, Баалсруд и Баалсруд (Baalsrud, Baalsrud, 1952) обнаружили, что их штаммы могли расти в пределах pH 1—7, с оптимумом pH 3—5. Выделение из природы штаммов на среде с начальным pH 5 показало, что такие организмы существуют и что между *T. thioparus* и *T. thiooxidans* нет «ничьей земли». Штаммы, выделяемые при этом pH, имеют характерную форму колоний, которая сохраняется в течение многих пересевов. Организмы этого типа были описаны Эмото (Emoto, 1929, 1933), который выделял их, так же как впоследствии другие авторы (Czurda, 1935; Кузнецов, 1955; Заварзин, Жилина, 1964), из термальных источников. Организмы эти можно рассматривать как кислотоустойчивые варианты *T. neopolitanus* или щелочустойчивые варианты *T. thiooxidans*. Они отличаются сдвинутыми к pH 5 оптимумами поглощения углекислоты (Романова и др., 1969), способностью образовывать тетраионат и оптимумом окисления тиосульфата при pH 5—6. Несмотря на то, что и колонии организмов на плотной среде Эмото имеют характерную, отличную от *T. thioparus* форму, нам представляется излишним выделять такие организмы в самостоятельные виды, хотя, возможно, их следует рассматривать как подвиды или вариации.

Паркер и Приск (Parker, 1945, 1947; Parker, Prisk, 1953) выделили из корродированного бетона *T. concretivorus*, отличавшийся от *T. thiooxidans* способностью использовать в качестве источника азота не только соли аммония, но и нитраты.

Среди тионовых бактерий имеются все типы отношения микроорганизмов к органическому веществу:

Tun 1. Гетеротрофные микроорганизмы, окисляющие неорганический субстрат в ходе побочной реакции. У тионовых бактерий этот тип обмена представлен группой «*Thiobacillus trautweini*».

Tun 2. Миксотрофные микроорганизмы, способные полностью переключаться с автотрофного на гетеротрофный обмен, подобно водородным бактериям; эти организмы должны обладать весьма совершенными механизмами регуляции. У тионовых бактерий этот тип представлен *T. novellus*.

Tun 3. Литогетеротрофные микроорганизмы, способные расти только в присутствии одновременно и органического вещества, используемого для синтеза, и неорганического окисляемого субстрата. Обмен такого типа может быть обусловлен либо недостаточной мощностью карбоксилирующей системы (*Micrococcus denitrificans*, *T. intermedius*), либо ее полным отсутствием (*T. perometa-bolis*).

Tun 4. Литоавтотрофные микроорганизмы, которые неспособны расти с органическим веществом. Они могут включать органические вещества в состав своего тела, подвергая лишь незначительным превращениям. Обычно такое прямое включение приводит к дисбалансу, и рост организма замедляется или останавливается. К этой группе относятся основные виды тионовых бактерий.

Тионовые бактерии, способные в той или иной степени использовать органические вещества, были обнаружены в 20-х годах, но затем эти работы были забыты и новый интерес к группе литогетеротрофных бактерий возник в связи с работами Риттенберга (Rittenberg, 1969).

Давно известна способность гетеротрофных микроорганизмов окислять соединения серы (Güittoneau, 1925). Траутвейн (Trautwein, 1921, 1924), затем Старки (Starkey, 1935), Паркер и Приск (Parker, Prisk, 1953), Трудингер (Trudinger, 1967 b) выделяли гетеротрофные микроорганизмы, которые окисляли тиосульфат с подщелачиванием среды за счет реакции:



На агаризованных средах без органического вещества они образуют мелкие колонии. Такие реакции способны осуществлять *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Achromobacter stutzeri*. Поэтому сохранение самостоятельного вида «*T. trautweini*» сейчас не обосновано. Упоминание об этих организмах, однако, необходимо, так как с ними часто приходится сталкиваться при изучении окисления соединений серы в природных условиях.

Тиосульфатоокисляющая система этих организмов может быть конституитивной или индуцируемой. Она связана с цитохромсодержащими частицами, и окисление тиосульфата сопровождается восстановлением цитохрома *c*. Тиосульфат не влиял на скорость роста или урожай клеток, но сера тиосульфата, преимущественно двух-

валентная, использовалась для роста. Тиосульфат подавлял использование сульфата, а цистеин — потребление тиосульфата. Таким образом, скорее всего окисление тиосульфата в тетратонат является побочной функцией ферментов конструктивного обмена, хотя корреляции между окисленным и включенным тиосульфатом нет.

Организмы с аналогичным типом обмена были найдены и среди денитрифицирующих бактерий.

Сравнение оригинальных штаммов Траутвейна со вновь выделенными штаммами и культурами *Pseudomonas stutzeri* показало, что методами нумерической систематики эти организмы могут быть объединены в одну группу (Hutchinson et al., 1965).

Thiobacillus novellus, выделенный Старки (Starkey, 1934, 1935) из почвы, был объектом детальных физиологических исследований. Этот организм способен расти на среде с тиосульфатом аналогично *T. thioparus* и может развиваться на органической среде. Морфологически *T. novellus* — маленькая эллипсоидная неподвижная палочка размером $0,5 \times 1$ мк. Тонкое строение организма заметно отличается от *Micrococcus denitrificans*, с которым его иногда объединяли: организм имеет типичную для грамотрицательных бактерий оболочку, у него отсутствует развитая мембранная система. На полюсах клетки расположены характерные полярные шапочки из электронпрозрачного материала. Размножение происходит делением пополам с вращением мембраны в виде диафрагмы. ГЦ 59,0 мол % (Kokig et al., 1968), 68 мол % (Taylor, Hoare, 1969). Единственным источником углерода при росте на тиосульфате служит углекислота, которая усваивается через рибулозодифосфатный путь. Клетки, выросшие в отсутствие тиосульфата на органической среде, могли приступить к окислению тиосульфата и усвоению углекислоты только после периода адаптации, в гетеротрофных условиях организм сохранял лишь около 2% активности карбоксидисмутазы. Переход от автотрофного способа питания к гетеротрофному также требовал периода адаптации. При росте в автотрофных условиях организм был сходен по своим основным биохимическим механизмам с *T. thioparus*.

T. novellus хорошо растет на сложных органических средах, например мясоептонном агаре, причем каждая клетка способна и к автотрофному и гетеротрофному росту, как было установлено методом реплик (Santer et al., 1959). Относительно роста на индивидуальных органических веществах как единственных источниках углерода и энергии данные расходятся. Тейлор и Хоар (Taylor, Hoare, 1969) указывают глюкозу, фруктозу, глюконат, маннит, мальтозу, глицерин, пируват, формиат, ацетат, метанол, этанол, пропанол, гистидин, пролин. Компоненты цикла Кребса, по их данным, не используются. Цепь переноса электрона у *T. novellus* сходна с *T. thioparus*, при автотрофном росте также наблюдается обратный перенос электрона (Aleem, 1966). По мнению Алима

(Aleem, 1965), окисление формиата у *T. novellus* осуществляется с помощью тех же ферментов, что и окисление тиосульфата.

Организм, очень сходный с *T. novellus*, но отличающийся от него способностью к денитрификации на органических средах и большим набором окисляемых органических веществ, был подробно исследован Тейлором и Хоаром (Taylor, Hoare, 1969). Морфологически это тоже неподвижная почти кокковидная палочка, которая автотрофно растет на среде с тиосульфатом при pH 8—9 и снижает pH до 5,5. Из других соединений серы окисляются сульфид, сера и сульфит, но не роданид или тетратионат. Организм окисляет большое число органических соединений, в том числе циклических. В анаэробных условиях с нитратом как акцептором электрона организм денитрифицировал, образуя азот; формиат, ацетат, карбоксилированный циклогексан могли служить донорами электрона. Однако с тиосульфатом анаэробного роста не наблюдалось. При окислении тиосульфата и при денитрификации организм содержал в 2 раза больше цитохрома *c*, чем при органотрофном росте. В отличие от *T. novellus*, у денитрифицирующего организма формиатдегидрогеназа и ферменты окисления серы индуцировались отдельно: у клеток, выращенных автотрофно, активность растворимой НАД-зависимой формиатдегидрогеназы была в 6 раз ниже, а сульфитоксидазы в 4 раза выше, чем у клеток, выращенных на формиате.

Факультативно автотрофные тионовые бактерии представляют любопытную аналогию водородным бактериям. У тех и других есть штаммы, способные к органотрофной, но не литотрофной денитрификации. Сходным является и отношение к формиату. Обе группы сходны также морфологически, отличаясь по своему тонкому строению от других литотрофов. Возможно, что появившиеся время от времени указания на способность тионовых бактерий окислять водород имеют какие-то основания.

Thiobacillus intermedius — штамм, выделенный Лондоном и Риттенбергом (London, Rittenberg, 1966) и сходный по морфологии клеток и характеру окисления соединений серы с *T. novellus*, но отличающийся слабым ростом в отсутствие органического вещества. Добавление к среде с тиосульфатом органических веществ, таких, как дрожжевой экстракт, пептон, казаминовые кислоты или высоких концентраций глюкозы резко увеличивало рост. В присутствии дрожжевого экстракта рост был пропорционален использованию тиосульфата, а увеличение концентрации дрожжевого экстракта соответственно увеличивало и рост. При росте на глюкозе она окислялась через путь Энтнера — Дудорова, причем урожай был очень низким, если в среду не добавляли дрожжевой экстракт или казаминовые кислоты. У этого организма окисление глюкозы служило источником энергии, в то время как казаминовые кислоты потреблялись для конструктивных целей. В присутствии тиосульфата глюкоза, аналогично тому, что наблюдается у водород-

ных бактерий, не могла служить источником энергии. Потребление глюкозы для конструктивного обмена шло через ферменты гликолитического пути (Abdul Matin, Rittenberg, 1970 a, b). На дрожжевом экстракте *T. intermedius* растет без тиосульфата. Активность карбоксилазы рибулозодифосфата падала на 74% в присутствии уже 0,05% дрожжевого экстракта, а при более высоких концентрациях органического вещества автотрофной фиксации углекислоты не происходило. Способность окислять тиосульфат не снижалась, однако, ниже 20% от уровня автотрофного обмена. При росте на среде с тиосульфатом и органическими веществами *T. intermedius* строил свое тело из глюкозы на 39,4%, из пирувата на 4,6%, ацетата 43,6%, сукцината 86,0%, глутамата 87,8%.

Способность организма усиливать рост при одновременном присутствии тиосульфата и органического вещества является весьма примечательной, но по всем остальным признакам он мало отличим от тионовых бактерий группы *T. neapolitanus*. Распространение организмов такого типа остается неизвестным. Возможно, что это единственный мутант.

Организмы того же физиологического типа, но полностью лишённые способности использовать для конструктивного обмена углекислоту и зависящие от поступления органических веществ, были описаны теми же авторами (London, Rittenberg, 1967) под названием *T. perometabolis*. Эти организмы росли на сложных органических средах, таких, как мясопептонный агар, не развивались в отсутствие органического вещества на средах с тиосульфатом. В отличие от организмов типа «*T. trautweinii*», *T. perometabolis* подкислял среду при своем развитии с образованием серной кислоты, а в отличие от обычных гетеротрофов группы *Pseudomonas* — не рос на средах с единственным органическим веществом в качестве источника углерода и энергии. Лондон и Риттенберг рассматривали выделенные ими организмы как мутанты *T. intermedius*, полностью лишённые способности ассимилировать углекислоту. На среде с тиосульфатом или серой рост происходил в присутствии дрожжевого экстракта, гидролизата казеина, фруктозы, ксилозы, рибозы или арабинозы. Среда подкислялась до pH 2,8. При низких концентрациях дрожжевого экстракта или гидролизата казеина рост мог происходить в присутствии ряда органических веществ.

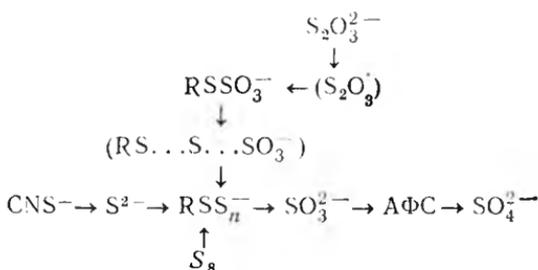
Таким образом, все эти организмы представляют литогетеротрофный тип тионовых бактерий.

БИОХИМИЯ ТИОНОВЫХ БАКТЕРИЙ

Окисление соединений серы тионовыми бактериями протекает ступенчато, через этапы, соответствующие соединениям разного уровня восстановленности. Некоторые из промежуточных продуктов реакции появляются в среде и, реагируя с субстратами и про-

дуктами обмена, дают сложную смесь разнообразных соединений серы. Разобраться в том, какие соединения лежат на основном пути превращений, а какие являются продуктами побочных и ферментативных и химических реакций, довольно сложно. Начиная с первых работ Натансона и Бейеринка установлено, что наиболее важными продуктами обмена являются сульфид, тиосульфат, сера, тетратрионат, сульфат. Исчерпывающие обзоры по окислению соединений серы написаны Трудингером (Trudinger, 1967a, 1969); в них обсуждается значение этих соединений в промежуточном обмене серы у тионовых бактерий и приводятся аналитические методы для ферментов и субстратов (Roy, Trudinger; 1970). Трудингер предложил обобщенную схему обмена соединений серы у всех тионовых бактерий. Эта схема, безусловно, является предварительной и служит только для того, чтобы облегчить ориентировку в ходе реакций. В полном виде реакции этой схемы, по-видимому, не осуществляет ни один организм.

Конечным продуктом окисления соединений серы у всех тионовых бактерий является сульфат. Предшественником сульфата может быть аденозинфосфосульфат (АФС), образуемый из сульфита или соединения на уровне окисленности сульфита. Сульфит, по-видимому, первый стабильный продукт окисления элементарной серы. Образование тиосульфата и полиитрионатов склонны рассматривать сейчас как результат побочных реакций, хотя они быстро вовлекаются в обмен тионовыми бактериями. Соединение, находящееся на уровне молекулярной серы, является вероятным промежуточным продуктом окисления сульфида. Вовлечение тиосульфата осуществляется через боковую цепь:



Разные этапы этой схемы обоснованы с различной полнотой.

Механизм окисления сульфита в сульфат был выяснен Пекком (Pesch jr., 1962) и характеризуется участием аденозинфосфосульфата, которое характерно для реакций диссимиляторного обмена серы.

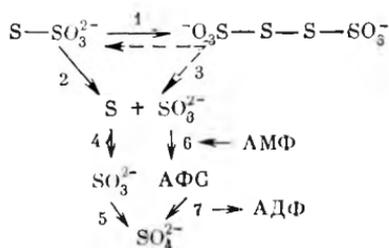
Схема Пека включает реакции:

1. $2\text{SO}_3^{2-} + 2\text{АМФ} \xrightarrow{\text{АФС-редуктаза}} 2\text{АФС} + 4e^-$
2. $2\text{АФС} + 2\text{P}_{\text{неорг.}} \xrightarrow{\text{АДФ-сульфурилаза}} 2\text{АДФ} + 2\text{SO}_4^{2-}$
3. $2\text{АДФ} \xrightarrow{\text{аденилаткиназа}} \text{АМФ} + \text{АТФ}$

При этом происходит образование АТФ на уровне субстратного фосфорилирования.

Схема Пека хорошо обоснована ферментативно: в экстрактах тиобацилл найдены все три фермента; показано, что АМФ стимулирует окисление сульфита, АФС образуется при реакции и происходит этерификация неорганического фосфата. Меченый кислород переносится с фосфата на кислородный мостик АДФ.

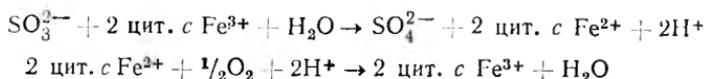
АФС-редуктаза была выделена и очищена из *T. thioparus*, *T. denitrificans*, *Desulfovibrio*; все препараты фермента оказались сходными. Они содержали флавинадениндинуклеотид, лабильную серу и железо в молярных соотношениях 1 : 4—5 : 8—10. Это лабильный трудно очищаемый фермент, по сульфиту $K_M=2$ мМ. АФС-редуктазной активностью обладает 3% белка у *T. thioparus*, 4—5% у *T. denitrificans* и 1—2% у *Desulfovibrio* (Lyric, Suzuki, 1970 b). Однако АФС-редуктаза, по-видимому, не участвует в окислении сульфита *T. thiooxidans*, *T. novellus*, и, следовательно, АМФ-зависимый путь нельзя считать единственным и даже основным. Изучение ферментов окисления тиосульфата привело Сузуки с соавторами к следующей схеме, которая наиболее полно отвечает имеющимся экспериментальным данным:



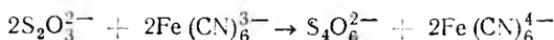
Тиосульфат либо превращается в тетратрионат под действием тиосульфатокисляющего фермента (1), либо распадается на серу и сульфит под действием тиосульфатрасщепляющего фермента (2). Скорее всего идет прямое расщепление при низкой концентрации тиосульфата и образование тетратрионата при высоком содержании тиосульфата. Тетратрионат под действием неизученного фермента (3) гидролизуеться с восстановлением в тиосульфат, серу и сульфит. Окисление серы ведет к образованию сульфита, но не тиосульфата. Реакцию осуществляет серуокисляющий фермент (4), который, возможно, является оксигеназой, так как реакция идет только в присутствии кислорода и в продуктах реакции обнаруживается включение O^{18} . Окисление сульфита может осуществляться сульфитоксидазой (5), аналогичной той, которая имеется в тканях животных. АМФ-зависимое окисление сульфита с участием АФС-редуктазы (6) и АДФ-сульфуриказы (7) идет с субстратным фосфорилированием, но акцептором электрона сульфатредуктазы может быть

и цитохром *c*, окисление которого, по-видимому, может сопровождаться окислительным фосфорилированием.

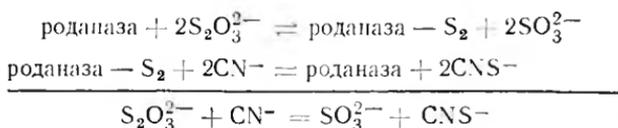
Сульфит : цитохром *c* оксидоредуктаза, выделенная и очищенная из *T. novellus* (Charles, Suzuki, 1966 a, b), где она является единственным ферментом, участвующим в окислении сульфита, и из *T. thioparus* (Lygic, Suzuki, 1970 a), где имеется также АФС-редуктаза, осуществляет реакции:



Тиосульфатокисляющий фермент определяют по реакции с феррицианидом:



Этот фермент сильно подавляется сульфитом. Он был обнаружен у *T. thioparus*, *T. ferrooxidans*, *T. neapolitanus* (Trudinger, 1967 a). В расщеплении тиосульфата на сульфит и «серу» возможно участвует роданаза — фермент, который связывает цианид тиосульфатом при участии тиольных групп:



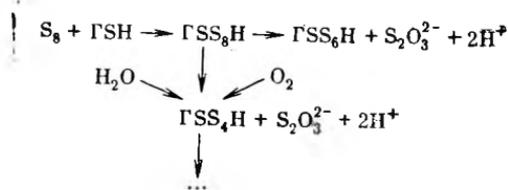
Роданаза широко распространена в тканях животных и обнаружена у многих бактерий, в том числе бацилл, псевдомонад, *Alcaligenes*, серных и несерных пурпурных бактерий и тиобацилл. Определяют ее по образованию тиоцианата в присутствии тиосульфата и цианида, но вероятная ее функция в организме — перенос восстановленных соединений серы в реакциях с липоевой кислотой, дисульфидами, тиоцистином (Roy, Trudinger, 1970). Данные об индуцированном синтезе ферментов тиобациллами подтвердили предположение, что роданаза действует на основном пути диссимиляторных превращений серы у тионовых бактерий, в то время как образование тетратнионата тетратнионазой является либо боковой реакцией, либо связано с ассимиляторным путем (Le John et al., 1967).

Экстракты из *T. thiooxidans* окисляют элементарную серу в присутствии каталитических количеств глутатиона с образованием тиосульфата:



Эта реакция отличалась от обнаруженных ранее реакций (Suzuki, Werkman, 1960) с участием субстратных количеств глутатиона, которые приводили к образованию политионатов. Элементарная сера неэниматически реагирует с сульфидами, образуя полисуль-

фиды, и Сузуки предположил, что полисульфид глютамина — истинный субстрат серуокисляющей системы:



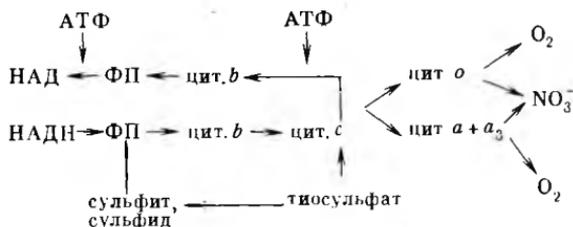
Серуокисляющий фермент содержал негеминные железо и лабильную серу.

Сходный фермент был выделен из *T. ferrooxidans* (Silver, Lundgren, 1968 b) и найден у *T. thioparus*, *T. novellus*. Применяв формальдегид как ловушку, удалось показать, что при окислении серы образуется сульфит, а тиосульфат, по-видимому, есть продукт побочной химической конденсации. Конденсация сульфита и серы с образованием тиосульфата может происходить как энзиматически, так и химически. Наиболее быстро происходит окисление гидрофильной серы, такой, какая образуется, например, при подкислении тиосульфата. Препараты гидрофильной серы ведут себя как политионаты.

Энзиматическое окисление сульфида *T. concretivorus*, *T. thiooxidans*, *T. thioparus* было исследовано электрометрически с помощью сульфидного и кислородного электродов (Moriarty, Nicholas, 1969). Сульфид окислялся целыми клетками и бесклеточными экстрактами при pH 5,0—9,0. Реакция шла в две стадии: быструю и медленную. В анаэробных условиях потребления сульфида не было. Окисление шло через цитохромы, содержащиеся во фракции мембран, с кислородом как конечным акцептором. При добавлении сульфида появлялась полоса поглощения при 300—400 нм на дифференциальных спектрах (восстановленный сульфидом минус окисленный), возможно, за счет образования полисульфидов. Для окисления сульфида бесклеточными препаратами был необходим убихинон-8.

Перенос электрона осуществляется у тиобацилл через цитохромы, которые впервые были обнаружены Эмото (Emoto, 1933). Тиобациллы содержат цитохромы *b*, *c*, *a*, причем количество цитохрома *c* бывает так велико, что суспензия клеток окрашивается в ярко-розовый цвет, и составляет от 10 до 100 мкмоль цитохрома на 1 г белка. Цитохрома *b* сравнительно очень мало. Цитохромов, реагирующих с O₂, также мало. Из других переносчиков электрона у тиобацилл функционируют флавопротеиды и убихинон-8. Перенос электрона у тиобацилл был исследован Алимом (Aleem, 1966, 1969; Peeters, Aleem, 1970) с применением ингибиторного анализа и спектроскопии. Электроны с окисляемого субстрата постулают на уровне цитохрома *c*, что вполне согласуется с результатами энзиматических опытов по окислению соединений серы. В переносе

электрона у *T. denitrificans* участвовали цитохромы *c*, *a*, *o*. Окисление тиосульфата, сульфита и сульфида было чувствительно к ингибиторам флавопротеидов в анаэробных условиях. В аэробных условиях окисление тиосульфата было нечувствительно к этим ингибиторам, так как тиосульфат окислялся через цитохром *c* и цитохром *c*: кислород-оксидоредуктазу. В бесклеточных экстрактах происходило окисление НАДН и сукцината через флавопротеиды и цитохромы *b*, *c*, *a*, *o*. Перенос электрона у *T. denitrificans* представлен на следующей схеме:



Обратный, АТФ-зависимый, перенос электрона у тиобацилл идет через цитохром *b*. Этот процесс обеспечивает организмы НАДН, необходимым для ассимиляции углекислоты. Окисление НАДН и НАДФН обнаружено у всех автотрофных тиобацилл. У *T. concretionivorus* были особенно подробно исследованы терминальные оксидазы, состав которых менялся в зависимости от условий культивирования (Moriarty, Nicholas, 1970). При окислении сульфида до серы перенос электрона шел через медьсодержащий белок, флавин (?), цитохромы *b*, *c*, *d*; при окислении сульфита функционировали флавин (?), убихинон-8, цитохромы *b*, *c*, *a*₁.

Образование АТФ у тионовых бактерий было установлено еще в 40-х годах (см. главу 1). Основная часть АТФ образуется при окислительном фосфорилировании, но часть, разная у разных штаммов, образуется при субстратном фосфорилировании, не подавляемом разобщителями.

Ассимиляция углекислоты тионовыми бактериями была изучена уже давно. Основным механизмом фиксации углекислоты у них является восстановительный рибулозодифосфатный цикл, который был обнаружен у всех исследованных видов: *Thiobacillus denitrificans*, *T. thiooxidans*, *T. novellus*, *T. thioparus* (см. главу 1). Побочным путем ассимиляции углекислоты служит карбоксилирование трехуглеродного соединения, которое может отвечать за 10—30% от всего ассимилированного углерода. У *T. thiooxidans* и *T. ferrooxidans* карбоксилированию подвергается фосфоенолпирувиноградная кислота.

На бесклеточных экстрактах показано, что действие карбоксилазы рибулозодифосфата у тионовых бактерий регулируется соотношением АТФ/АДФ или АТФ/АМФ: при недостатке АТФ карбоксилирование подавляется. Отсутствие углекислоты в среде при-

водит к смещению равновесия в клетке, при внезапном введении углекислоты такие клетки способны к «глотку» углекислоты даже в отсутствие окисляемого субстрата. Впрочем, величина этого «глотка» очень невелика, и даже такая операция, как однократное промывание бактерий на мембранном фильтре средой, лишенной окисляемых субстратов, останавливает последующую фиксацию углекислоты; это указывает на отсутствие значительных внутриклеточных запасов окисляемого субстрата.

Интересная проблема возникает в связи с фиксацией углекислоты тионовыми бактериями, развивающимися в кислой среде. При рН 2 углекислота находится в недиссоциированной форме и улетучивается из раствора. Ферментативные механизмы тионовых бактерий, развивающихся в кислой среде, ничем принципиально не отличаются от механизмов бактерий, развивающихся в щелочной среде. Ферменты имеют тот же оптимум рН и то же сродство к углекислоте. Исходя из этих данных можно было бы думать, что существование автотрофных микроорганизмов в кислой среде вообще невозможно из-за недоступности углекислоты. Однако исследования с целыми клетками показывают, что тионовые бактерии в краткосрочных опытах обнаруживают максимум фиксации углекислоты при оптимальных для роста значениях рН (Заварзин и др., 1968; Романова и др., 1969). Отсюда следует, что либо все тионовые бактерии используют для ассимиляции одну и ту же форму углекислоты, именно CO_2 , а не бикарбонат-ион, либо все формы углекислоты уравниваются с каким-то внутренним акцептором углекислоты, который предшествует карбоксилазе рибулозодифосфата.

Обмен органических веществ у автотрофных тиобацилл был изучен особенно тщательно в связи с гипотезой о причинах облигатной автотрофии. Следует различать два процесса: использование органического вещества как источника энергии или включение органических веществ в состав клетки либо непосредственно, либо после превращений по обычным путям конструктивного обмена. Было несколько утверждений о том, что удалось получить органотрофный рост *T. thiooxidans* на глюкозе (Borichewski, Umbreit, 1966), но ни Риттенбергу (Rittenberg, 1969), ни нам не удалось получить развитие *T. thiooxidans* на этом веществе.

Меченные по углероду органические вещества быстро обмениваются с внутриклеточными органическими соединениями у тионовых бактерий и вступают в реакции конструктивного обмена. Часть углерода может выделяться в виде углекислоты. При добавлении меченого пирувата больше всего углекислоты выделялось из карбоксильной группы. Углерод пирувата включался в яблочную кислоту. У *T. thiooparus* добавление тиосульфата подавляло ассимиляцию пирувата, а у *T. neapolitanus* — стимулировало ее (Johnson, Abraham, 1969 a). Превращение органических кислот у тиобацилл происходит в соответствии с циклом Кребса, хотя активность α -кетоглутаратдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы

может быть очень низкой. У *T. thioparus* и *T. neapolitanus* была исследована активность ферментов углеводного обмена (Johnson, Abraham, 1969 b). Высокая активность была обнаружена у ферментов, входящих в цикл Кальвина, активность всех остальных была низкой. Фосфофруктокиназа отсутствовала. Таким образом, обмен органических веществ по амфиболитическим реакциям направлен преимущественно в сторону биосинтеза. При ассимиляции аминокислот и их предшественников некоторые аминокислоты, такие как фенилаланин и тирозин, включаются без изменения, меченый ацетат у *T. thioparus* появляется только в лейцине и производных глутаминовой кислоты, в то время как углерод аланина распределяется среди многих аминокислот (Rittenberg, 1969).

Некоторые индивидуальные аминокислоты вызывают подавление роста тиобацилл, особенно метионин, гистидин, треонин, фенилаланин, но эквимолекулярная смесь их не оказывает подавляющего действия (Johnson, Vishniac, 1970).

На основании изложенного можно составить обобщенную схему обмена тионовых бактерий (схема 13). Окисляемые соединения

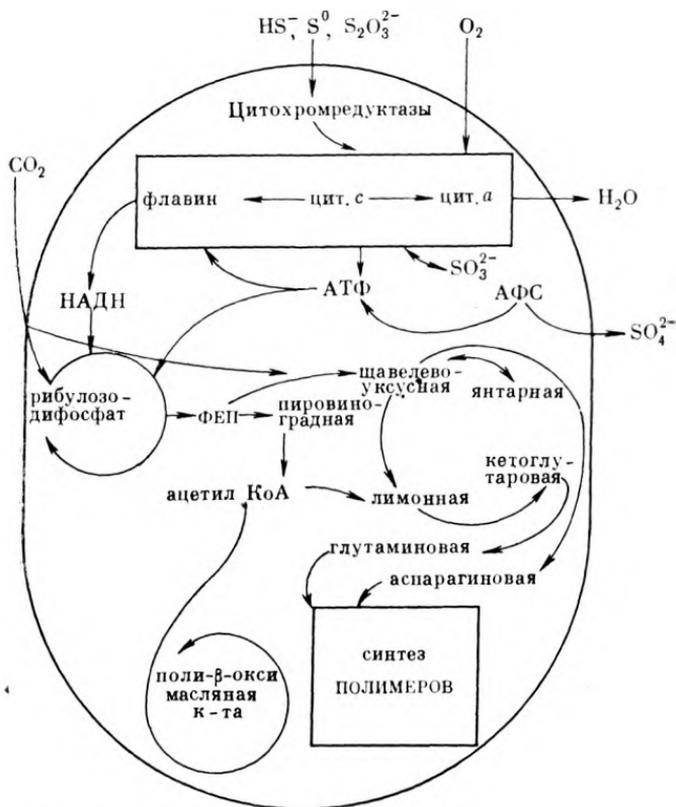


Схема 13. Обмен тионовых бактерий

серы через цитохром *c* редуктазы восстанавливают цитохром *c*, который окисляется кислородом в цепи переноса электрона с сопровождающим окислительным фосфорилированием. Образующийся сульфит может быть также окислен через цитохромы, но может, реагируя с АМФ, окисляться в сульфат через АФС-путь с сопровождающим субстратным фосфорилированием. Обратный перенос электрона обеспечивает организм восстановителем на уровне НАДН. Ассимиляция углекислоты происходит через рибулозодифосфатный цикл, регулируемый энергетическим потенциалом клетки, причем повышение уровня АМФ тормозит усвоение углекислоты. Существенную роль в ассимиляции углекислоты играет карбоксилирование фосфоенолпировиноградной кислоты. Реакции амфиболлизма различны у тиобацилл, по-разному относящихся к органическому веществу. У автотрофных тиобацилл цикл Кребса разорван между янтарной и α -кетоглутаровой кислотами. Литогетеротрофные и миксотрофные тиобациллы обладают обычно ферментами пути Энтнера — Дудорова.

THIOBACILLUS FERROOXIDANS COLMER ET HINKLE, 1947

Thiobacillus ferrooxidans (*Ferrobacillus ferrooxidans*) занимает исключительное положение среди тионовых бактерий, так как помимо способности к автотрофному росту за счет окисления соединений серы он может использовать энергию окисления закисного железа в окисное. В кислой среде при $\text{pH} < 4$ ион Fe^{2+} вполне устойчив против окисления кислородом воздуха. На этом основании *T. ferrooxidans* мог бы быть отнесен к железобактериям, где он занимает определенную экологическую нишу (см. рис. 45, главу 7). Однако по таксономическим признакам он ближе к тионовым бактериям, особенно *T. thiooxidans*.

Thiobacillus ferrooxidans был открыт в 1947 г. Колмером и Хинклем (Colmer, Hinkle, 1947) при изучении причин образования кислых шахтных вод. Пробы кислой воды стерилизовали либо добавлением антисептика (сулемы, фенола, формалина, толуола), либо фильтрованием через бактериальный фильтр. В простерилизованной воде окисления железа не происходило. Добавление нестерильной воды к стерилизованной приводило к окислению железа. Таким образом, биологическая природа процесса окисления железа была доказана. Чистая культура возбудителя была выделена на агаризованной рудничной воде. Организм оказался мелкой подвижной палочкой, внешне похожей на *Pseudomonas*, способной развиваться автотрофно за счет окисления железа в кислой среде. Источником углерода служила углекислота. Было установлено также, что организм может использовать в качестве окисляемого субстрата, кроме железа, восстановленные соединения серы. Итак, уже в первой работе, описывающей выделение и культиви-

рование микроорганизма, были даны его основные принципиальные характеристики.

Вслед за исследованием Колмера и Хинкля последовал целый ряд уточняющих работ, в которых решающее значение придавалось второстепенным отличиям. Так, Летен выделил организм, не способный окислять тиосульфат, и создал новый род *Ferrobacillus* (Leathen, Braley, 1955; Leathen et al., 1956). Кинзель (Kinsel, 1959) нашла штамм, не окисляющий тиосульфат, но окисляющий молекулярную серу, и создала вид *F. sulfoxidans*. Все эти организмы сходны между собой, различаясь лишь по способности окислять соединения серы:

	Fe ²⁺	Сера	Тио- сульфат
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (Colmer et al., 1949; Colmer, 1960)	+	+	+
<i>Ferrobacillus ferrooxidans</i> (Leathen, Braley, 1955; Silverman, 1960)	+	—	—
<i>Ferrobacillus sulfoxidans</i> (Kinsel, 1959)	+	+	—

При сравнении физиологических свойств этих организмов следующие авторы пришли к выводу, что различия в способности окислять соединения серы — это не более, чем различия между штаммами (Иванов, Ляликова, 1962; Unz, Lundgren, 1961; McGowan et al., 1969; Silver, 1970). Штамм Летена также окисляет соединения серы. Вместе с тем организмы, выращенные на среде с железом, переходят к окислению молекулярной серы только после длительной адаптации, которая может затягиваться до 20 дней.

Выращенные на среде с серой клетки *T. ferrooxidans* окисляют серу, сульфид, тиосульфат, тетратонат, гидросульфид, сульфит. Окисление всех субстратов сопровождается ассимиляцией углекислоты и отношение $CO_{2\text{асс}}/O_{2\text{потр}} = 0,01—0,02$. Штаммы организма, выделенные из природы, могут заметно отличаться как по отношению к окислению соединений серы, так и по другим физиологическим характеристикам. Название *Ferrobacillus* следует рассматривать лишь как синоним *Thiobacillus ferrooxidans*.

Микроорганизм имеет вид коротких палочек, расположенных иногда парами, большей частью поодиночке, размерами $0,4 \times 0,8—1$ мк. Красится по Граму отрицательно, не образует спор. Размножение происходит поперечным делением. Подвижен благодаря наличию одного полярного жгутика. Обычно плохо окрашивается метиленовой синей, эритрозинном. Окисленное железо не образует каких-либо оформленных структур, клетки большей частью свободные. Тонкое строение *T. ferrooxidans* подробно исследовано, но не было обнаружено существенных отличий в общей морфологии от типичных грамотрицательных бактерий, таких, как *Pseudomonas*; у организма отсутствовала развитая система внутрититоплазматических мембран, ядерная область имела типичное строение. В клеточной стенке *T. ferrooxidans* иногда обнаруживался дополнитель-

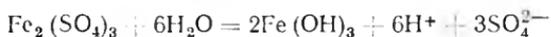
ный третий слой с характерной структурой на внутренней стороне наружного слоя клеточной оболочки (Remsen, Lundgren, 1966). Авакян и Каравайко (1970) нашли на срезах свособразные пачки мембран, пересекающие клетку по диагонали (рис. 34).

Колонии *T. ferrooxidans* на агаризованных средах образуются с большим трудом. Они мелкие, янтарно-желтого цвета от осадка гидроокиси железа. Образование осадка обычно начинается в центре колонии, откуда он распространяется дальше, иногда образуя лопасти.

Жидкая среда при развитии *T. ferrooxidans* приобретает желтый цвет от образования окисного железа, на дне появляется рыхлый осадок гидроокиси железа. Изменение окраски позволяет легко учитывать развитие организма, а образование комплекса с HCl дает количественный метод определения Fe³⁺ (Schnaitman et al., 1970). Окисление железа организм осуществляет в соответствии с уравнением:



Окисление железа приводит к некоторому подщелачиванию среды, а это вызывает гидролиз соли с образованием гидрата окиси железа и освобождением серной кислоты:



Таким образом поддерживается оптимальная для организма реакция среды. Реакция окисления закисного железа дает малый выход энергии: 11 ккал/г-атом окисленного железа. Поэтому для синтеза клеточного тела расходуется большое количество железа; для получения урожая в 1 г сырого веса бактерии должны окислить около 500 г сернокислого железа. На 100 молей O₂ фиксируется 2 моля CO₂ при окислении железа и 8 молей при окислении серы.

Углеродное питание *T. ferrooxidans* обеспечивается углекислотой, и он является строгим автотрофом. В последнее время появился ряд сообщений о росте этого организма на глюкозе (Shafia, Wilkinson, 1969). Однако эти работы вызывают ряд сомнений. Авторы не уверены, что в культурах был только один тип клеток; далее допускается мутация, которая приводит у выращенных гетеротрофно культур к потери способности окислять железо. Бесклеточные экстракты *T. ferrooxidans* неспособны окислять глюкозу, хотя в присутствии фосфорилированных сахаров и компонентов цикла Кребса в этих экстрактах происходит потребление кислорода. Нам удалось обнаружить развитие при pH 3 на среде с железом и глюкозой гетеротрофных бактерий, которые не росли в нейтральной среде и были близки, по-видимому, к *Acetobacter acidophila*. Чистые культуры *T. ferrooxidans* (штамм Каравайко) на глюкозе не росли.

В качестве источника азота обычно используется аммоний. Организм нуждается в значительном количестве фосфата, и увеличе-



Рис. 34. Тонкое строение *Thiobacillus ferrooxidans* (Авакян, Каравайко, 1970)

ние скорости окисления железа находилось в прямой зависимости от количества добавленного фосфата, причем железо образует с фосфатом обнаруживаемый полихромографически комплекс.

T. ferrooxidans чувствителен к анионному составу среды; для нормального развития ему необходимо присутствие в среде сульфатионов. В присутствии хлоридов или нитратов организм не развивается, однако могут появляться мутанты с частотой 10^{-5} , устойчивые к хлорид-иону. Систематическое сравнение выделенных штаммов *T. ferrooxidans* не было произведено, но на основании сопоставления разрозненных литературных данных вырисовывается следующая картина (Ляликова, 1968).

Отношение организма к кислотности среды определяется поведением иона железа в растворе. При pH 4,5 и выше двухвалентное железо неустойчиво и окисляется кислородом воздуха. Окисное железо удерживается в растворе при pH 3 и ниже. Поэтому развитие организма невозможно в стационарных условиях при pH 6 и выше, когда химическое окисление происходит слишком быстро. При pH 4 и выше продукты окисления препятствуют дальнейшему контакту клетки со средой и поэтому скорость окисления замедляется. Экспериментальные данные подтверждают эти предположения: оптимальные значения pH, варьирующие у разных штаммов и при использовании разных субстратов, заключаются между pH 1,7 и 3,5. Вне этих пределов скорость окисления железа быстро падает.

В природных водах *T. ferrooxidans* встречается при значениях pH, значительно отличающихся от тех, которые установлены в лабораторных условиях. Организм также обнаружен в водах с pH 7—7,6, но, вероятно, был неактивен в них. Выдерживание бактерий при pH 8 значительно снижает их активность, а суточное выдерживание при pH 9 убивает микроорганизм. Напротив, к низким значениям pH *T. ferrooxidans* необычайно устойчив. По данным Ляликовой, организм легко выдерживал суточную инкубацию в растворе, содержащем 18 г/л серной кислоты, но при 20—21 г/л наблюдалась значительная задержка в последующем развитии. При концентрации 22 г/л, что соответствует pH 0,3, неадаптированная культура погибала. Для *T. thiooxidans* соответствующая максимальная кислотность составляет pH 0,6. Внутриклеточный pH организма, определенный с помощью индикаторов в суспензии клеток и электродами в бесклеточном экстракте, находится около pH 4,8—5,0.

Концентрация кислорода в среде обычно не оказывает существенного влияния на развитие организма: *T. ferrooxidans* способен развиваться при полном насыщении среды кислородом атмосферы, однако при культивировании в ферментерах избыточная аэрация (около 60—100 объемов/час) приводит к снижению скорости окисления железа. В связи с невысокой скоростью роста (время удвоения порядка 7 час.) наиболее эффективно продувание 1—3 объемами/час.

Максимальная скорость роста наблюдается около 35°, при температуре 50° организм погибает. Оптимальная температура для роста 28—30°, при 40° размножения клеток не происходит. Существует уверенность в том, что в природе есть термофильные штаммы *T. ferrooxidans*, однако в чистой культуре они не были получены и не исследованы. Точно так же не выделены психрофильные штаммы.

Оптимальная минеральная среда для развития *T. ferrooxidans* не разработана. Чаще всего используют для выделения среду Летена, а для массового культивирования — среду 9К Лундгрена. Согласно Ляликовой (1968), следующие условия обеспечивают развитие культуры в природе.

1. Наличие закисного железа или сульфидных минералов. Оптимальное количество железа составляет около 9 г/л, но эта величина колеблется для разных штаммов.
2. Наличие углекислоты для построения тела клеток.
3. Высокая кислотность среды, оптимум для большей части культур рН 1,7—2,5.
4. Наличие доступных соединений азота, фосфора и минеральных солей.
5. Присутствие ионов тяжелых металлов и других вредных для бактерий веществ в количествах, не угнетающих культуру.
6. Оптимальная температура порядка 30—35°.
7. Защита от ультрафиолета.
8. Наличие кислорода, продувание 1—3 объемов воздуха через объем среды в час.
9. Циркуляция раствора. При соблюдении всех этих условий можно добиться скорости окисления 5—7 г/л железа за сутки.

Очень интересна способность *T. ferrooxidans* развиваться за счет относительно небольших количеств железа в среде, если существует механизм регенерации восстановленного железа. Такой механизм может быть либо химическим, например, за счет вещества, не окисляемого кислородом воздуха, но быстро реагирующего с окисным железом, либо электрохимическим. Химическое восстановление железа протекает, например, при окислении сульфидов по схеме:



Образующееся при реакции закисное железо может быть окислено микроорганизмом с образованием серной кислоты и окисного железа, которые снова вступают в реакцию. Окисляемым веществом оказывается сера сульфида, а железо служит посредником.

Электрохимическое восстановление железа было изучено Кинзель и Умбрейтом (Kinsel, Umbreit, 1964) и воспроизведено Тихоновой (1967). В этих опытах железо восстанавливалось на платиновом катоде при потенциале — 0,5 в и силе тока порядка 100 мА. Урожай клеток в культуре при электролизе значительно превосходил урожай в контроле. Железо при этом функционировало как переносчик электронов между дыхательной цепью бактерий и электродом. Аналогичные эксперименты были поставлены с водородными бактериями и за счет электролиза получены высокие урожаи

этих организмов. Однако в природе можно представить гораздо больше процессов, в которых переносчиком между восстановителем и бактериями служит железо, а не водород. Таким образом, *T. ferrooxidans* может вовлекать в обмен и окислять большое количество соединений, непосредственно ему недоступных.

Как уже отмечалось, *T. ferrooxidans* способен окислять восстановленные соединения серы, тиосульфат и молекулярную серу, практически не отличаясь при этом от *T. thiooxidans*.

Однако в отличие от других тионовых бактерий, *T. ferrooxidans* способен воздействовать на широкий набор сульфидных минералов; установлено окисление следующих соединений (Ляликова, 1968):

Пирит и марказит	Полидимит	Реальгар
Халькопирит	Молибденит	Кобальтин
Ковеллин	Марматит	Виоларит
Тетраэдрит	Геокранит	Миллерит
Арсенопирит	Пирротин	Антимонит
Аурипигмент	Борнит	Сфалерит
Пентландит	Халькозин	Галенит
Бравит	Энаргит	

Механизм окисления сульфидных минералов, которые в высокой степени нерастворимы, остается не вполне ясным. Допускают два способа воздействия: во-первых, выщелачивание окисным железом по приведенной выше реакции, когда не требуется непосредственного контакта между клетками и минералом; во-вторых, непосредственное ферментативное воздействие на сульфид, когда между клеткой и минералом есть контакт (Beck, Dugan, 1968).

Для *T. ferrooxidans* характерна необычная устойчивость к тяжелым металлам, причем разные штаммы варьируют в этом отношении. Так, штамм Ляликовой, выделенный из пульпы гидрометаллургического завода, удалось адаптировать к содержанию 20 г/л меди, т. е. 5%-ному раствору медного купороса. Аналогичной устойчивостью обладает и *T. thiooxidans*. Удаётся адаптировать *T. ferrooxidans* к концентрации 2 г/л цинка, 1 г/л уранила, 1 г/л мышьяка. Эта устойчивость *T. ferrooxidans* важна для выщелачивания руд, так как позволяет значительно повышать концентрацию раствора. Биохимические механизмы *T. ferrooxidans* изучены довольно подробно. Ассимиляция углекислоты осуществляется главным образом через восстановительный пентозофосфатный цикл (Gale, Beck, 1966, 1967; Maciag, Lundgren, 1964; Din et al., 1967 а) с образованием типичных для этого цикла продуктов кратковременной фиксации углекислоты. Карбоксилирование фосфоенолпирувата протекает аналогично тому, что наблюдалось у *T. thiooxidans*.

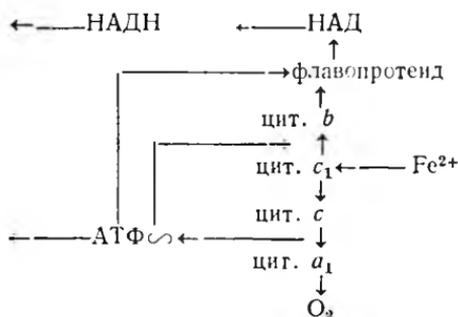
Бесклеточные экстракты *T. ferrooxidans* окисляют фосфорилированные компоненты гликолитического пути и цикла Кребса. Глю-

коза и 6-фосфоглюконат не окисляются экстрактами. Спектрофотометрически в экстрактах была обнаружена высокая активность большинства ферментов, за исключением гексокиназы и лактат-, изоцитрат-, сукцинат-, α -кетоглутаратдегидрогеназ. Вместе с тем в манометрических опытах кетокислоты окислялись с потреблением кислорода. Это заставило авторов решить, что цикл Кребса функционирует (Andersen, Lundgren, 1969).

Соединения серы окисляются, как и у *T. thiooxidans*, с участием тиосульфатоксилирующего фермента, роданазы, серуоксилирующего фермента (Silver, Lundgren, 1968 a, b, c). Железо окисляется Fe^{2+} : цитохром *c* оксидоредуктазой (Blaylock, Nason, 1962; Din, Suzuki, 1967; Din et al., 1967 b). При pH 5,7 фермент имел $K_m = 1,5 \cdot 10^{-5} M$ для железа, $K_m = 8 \cdot 10^{-5} M$ для цитохрома *c* и подавлялся акрихином, что указывало на участие флавина.

Система переноса электрона у *T. ferrooxidans* представлена полным набором цитохромов; на низкотемпературных спектрах были обнаружены пики, свойственные цитохромам *c*, цитохрому *b*, пигменту с максимумом 585 нм и цитохрому *a*. Содержание цитохромов у *T. ferrooxidans* необычайно высоко; оно составляет в $\mu M \times 10^{-4}/mg$ белка для цитохромов группы *c* 14,3, *b* — 4,4 и *a* — 10,6. Эти величины, рассчитанные по спектрам поглощения, совпадают с данными прямого выделения цитохромов. Прямые анализы установили наличие хинонов в цепи переноса электрона, а ингибиторный анализ и энзиматические опыты дали указание на участие флавиновых ферментов. Этот набор переносчиков качественно сходен с набором переносчиков в митохондриях.

Интересные особенности функционирования цепи переноса электрона у *T. ferrooxidans* возникают в связи с использованием этим организмом дыхательного субстрата с положительным потенциалом. Закисное железо может восстановить только такие переносчики, как цитохромы *c* и *a*, между тем организм для фиксации углекислоты в цикле Кальвина должен потреблять не только АТФ, но и восстановленный НАДН. Изучение переноса электрона на целых клетках с помощью чувствительной спектроскопии и ингибиторного анализа привело Тихонову (1967) к следующей схеме:



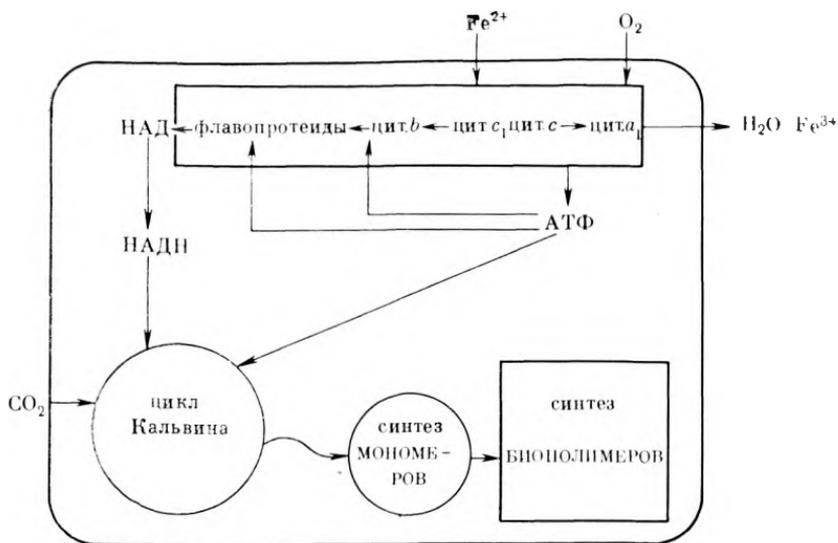


Схема 14. Обмен *Thiobacillus ferrooxidans*

Прямой перенос электронов, вероятно, осуществляется через цитохромы *c*, *c*₁ и цитохромоксидазу, при этом цитохром *b* и НАД не восстанавливаются. В пользу такого пути говорит отсутствие торможения окисления железа амиталом и ротеноном, блокирующими цепь переноса между НАД и цитохромом *b*. Окисление железа тормозят азид и цианид, блокирующие цитохромоксидазу.

Образование восстановленного НАДН осуществляется через обратный перенос электрона, при котором в присутствии АТФ происходит восстановление добавленного НАД за счет окисления цитохрома *c*. Этот процесс полностью тормозится амиталом в концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ М.

В связи с тем, что и энергия, идущая на синтез АТФ, и энергия, необходимая для восстановления НАД при росте *T. ferrooxidans* на железе, могут быть получены только за счет работы последнего участка цепи переноса электрона, концентрации цитохромов *c* и *a* и потребление кислорода этим организмом достигают исключительно высоких значений.

Таким образом, биохимические механизмы *T. ferrooxidans* могут быть представлены в виде схемы 14.

СЕРНОКИСЛОТНОЕ ВЫВЕТРИВАНИЕ И ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕТАЛЛОВ ИЗ РУД

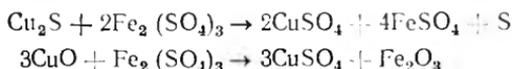
Геохимическая деятельность тионовых бактерий была тщательно изучена С. И. Кузнецовым и его сотрудниками и обобщена в ряде монографий (Кузнецов и др., 1962; Иванов, 1964; Соколова, Ка-

равайко, 1964). Характернейший геохимический процесс, вызываемый тионовыми бактериями, — сернокислотное выветривание. Окисляя соединения серы, тионовые бактерии меняют геохимическую обстановку. На диаграмме E_h — рН (см. рис. 30) это изменение можно характеризовать как движение в область малых значений рН и высокого окислительно-восстановительного потенциала. Физиологические типы тионовых бактерий достаточно разнообразны, чтобы обеспечить сукцессию видов при таком изменении условий. *T. denitrificans* и литогетеротрофные формы начинают процесс в области, соприкасающейся с зоной сульфатредукции. При появлении следов кислорода начинает развиваться *T. thioparus*, причем образующаяся серная кислота сменяет условия в область устойчивости молекулярной серы и приводит к отмиранию *T. thioparus*. Окисление серы *T. thiooxidans* происходит при достаточном притоке кислорода и вызывает резкое подкисление среды, в которой большинство металлов переходит в раствор. Скорость изменения условий определяется буферностью окружающей среды. Например, в карбонатных породах развитие *T. thioparus* может идти очень долго и приводит к частичному замещению известняка гипсом. Нечто подобное можно наблюдать в горах, где окисление осаждающихся из атмосферы соединений серы на поверхности мраморной облицовки и образование гипса, имеющего больший объем, вызывает растрескивание и шелушивание верхних слоев и иногда искривление тонких мраморных плит. В природе образование сульфатов уравнивается деятельностью сульфатовосстанавливающих бактерий, и при нейтральных значениях рН действует малый круговорот серы. В специфических геологических условиях частичное окисление сероводорода при ограниченном доступе воздуха приводит к отложению серы в эпигенетических месторождениях, цементированию вмещающих пород, уменьшению проницаемости и консервации отложений. Если же буферность системы недостаточна, то окисление соединений серы вызывает избыточное образование серной кислоты, отмирание *Desulfovibrio* и *T. thioparus* и выход системы из равновесия. Начинается сернокислотное выветривание (Иванов и др., 1958), которое в типичном виде можно наблюдать на выходящих на поверхность месторождениях серы. Зона сернокислотного выветривания обнаруживается по ярко-белому цвету выщелоченных пород. Там, где деятельность тионовых бактерий еще продолжается и окисление серы не закончилось, сохраняется низкое значение рН 1—3. В зоне сернокислотного выветривания формируются кислые воды, их иногда называют купоросными из-за высокого содержания сульфата железа. При смешении этих вод с пресными сульфат железа гидролизует и выпадает осадок гидрата окиси железа. Поэтому зона сернокислотного выветривания бывает окружена ржавыми отложениями лимонита. Предполагается, что аналогично может происходить образование осадочных месторождений и других металлов. Если окисляется сера, то вероят-

ным агентом является *T. thiooxidans*. При окислении сульфидов действует *T. ferrooxidans*.

Кислые воды могут представлять нежелательное явление, загрязняя реки, вызывая коррозию оборудования. Типичным примером служат кислые шахтные воды, из которых и был выделен *T. ferrooxidans*. Борьба с этими водами заключается в их нейтрализации. Возможен и биологический путь. При этом кислые воды фильтруются через органические вещества, например опилки. Разложение грибами органического вещества в кислой среде даст органические кислоты, которые могут служить субстратом для сульфатвосстанавливающих бактерий. Сероводород осаждает железо из среды, и таким образом происходит удаление обоих элементов: и серы, и железа. Окисление тионовыми бактериями соединений серы в углях и нефтепродуктах применяется для их обессеривания.

Важное практическое применение имеет выщелачивание бедных руд, прежде всего меди и урана, но также и других элементов (Каравайко, 1970; Кузнецова, 1970; Каравайко и др., 1972). Выщелачивание выгодно тогда, когда имеется дешевая вода, руды содержат окисляемое вещество, такое, как железо или марганец, условия позволяют обеспечить рост соответствующих микробов, имеется дешевый метод экстракции добываемого металла из жидкости. Биологическая сущность метода сводится к окислению сульфидов металлов *T. ferrooxidans*. Образующийся при развитии этого организма сульфат железа реагирует с минералами меди по реакциям:



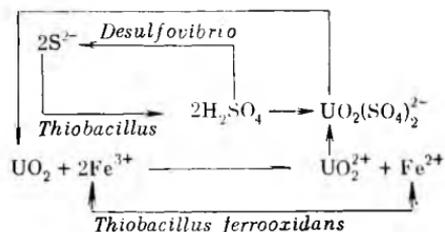
Для извлечения меди из раствора используется обменная реакция



Этот процесс широко применяется в промышленности, и после 1954 г., когда был обнаружен *T. ferrooxidans*, установки для бактериального выщелачивания предусматриваются на месторождениях меди (Ehrlich, Fox, 1967; Beck, 1967). Бактерии осуществляют окисление и растворение сульфидов, регенерацию выщелачивающего раствора сульфата окисного железа. Процесс включает орошение руд кислым раствором либо непосредственно в рудном теле, либо в отвалах. Выщелачивающий раствор собирается в отстойнике, а оттуда поступает на экстракцию. Такой раствор при pH 2—3 содержит 1—2 г/л меди, которая извлекается из него. Раствор поступает в регенерационный пруд, где при аэрации бактерии окисляют железо в окисную форму. При этом приходится соблюдать условия, оптимальные для развития микроорганизмов, концентрация которых составляет величину порядка 10^5 — 10^6 клеток/мл. Регенерированный раствор вновь поступает на орошение. В таких установках обрабатываются одновременно большие количества руды, по-

рядка, например, 20 млн. *m*, и, соответственно, условия для развития бактерий значительно отличаются от лабораторных. Аналогичные предложения были сделаны для выщелачивания цинка, никеля, мышьяка, марганца, ванадия.

Несколько отличается процесс выщелачивания урана (Кузнецова, 1970). В восстановительной области уран отлагается в четырехвалентном состоянии в виде нерастворимого карнотита UO_2 . Растворимые гексавалентные соединения урана выщелачиваются либо кислотами с образованием уранила, либо в щелочной среде в виде комплексов с карбонатными ионами $[Na_4UO_2(CO_3)_3]$. Окислителем в этом случае может служить MnO_2 , который, как известно, образуется *Metallogenium*. Выщелачивание кислыми растворами происходит за счет окисления пирита бактериями по схеме:



Геохимическое значение превращения минералов в зоне окисления сульфидных месторождений описано в ряде обзоров (Ляликова, 1970; Silverman, Ehrlich, 1964; Ehrlich, 1971).

ЛИТЕРАТУРА

- Авакян А. А., Каравайко Г. И. 1970. Субмикроскопическая организация *Thiobacillus ferrooxidans*. — Микробиол., 39, 855.
- Виноградский С. Н. 1952. Серобактерии. — В кн. «Микробиология почвы». М., Изд-во АН СССР.
- Владимирова М. Г. 1958. О развитии бесцветных тиоспирилл в бактериальной пленке совместно с гетеротрофными микроорганизмами. — Докл. АН СССР, 119, 598.
- Гайдуков Н. 1926. О конвергенциях, осложнениях и филогенетической системе дробянок и водорослей. — Русский Архив Протистологии, 5, 269.
- Егорова А. А., Дерюгина З. П. 1963. О спороспособной термофильной тиобактерии. — Микробиол., 32, 439.
- Егунов М. А. 1894. Бактериальные общества. — Труды Варшавского общества естествоиспытателей, вып. 8, стр. 6.
- Заварзин Г. А. 1964. Система тионовых бактерий. — Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 287.
- Заварзин Г. А., Жилина Т. Н. 1964. Тионовые бактерии из термальных источников. — Микробиол. 33, 844.
- Заварзин Г. А., Романова А. К., Жилина Т. Н. 1968. Зависимость фиксации углекислоты тионовыми бактериями от кислотности среды. — Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 582.
- Заславский А. С. 1952. О солелюбивых тионовокислых бактериях соляных водоемов. — Микробиол., 21, 31.

- Иванов М. В. 1964. Роль микробиологических процессов в генезисе месторождений серы. — М., «Наука».
- Иванов В. И., Ляликова Н. Н. 1962. О систематике железоокисляющих тионовых бактерий. — Микробиол., **31**, 3.
- Иванов М. В., Ляликова Н. Н., Кузнецов С. И. 1958. Роль тионовых бактерий в выветривании горных пород и сульфидных руд. — Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 183.
- Исаченко Б. Л. 1927. Биологические наблюдения над серными бактериями. — В кн.: Избр. труды, **2**, 188, 1951. М., Изд-во АН СССР.
- Исаченко Б. Л., Салимовская А. Г. 1928. К морфологии и физиологии тионовокислых бактерий. — В кн.: Избр. труды, **2**, 176, 1951. М., Изд-во АН СССР.
- Каравайко Г. И. 1962. Геохимическая деятельность *Thiobacillus thiooxidans* в месторождениях самородной серы. М., Канд. дисс.
- Каравайко Г. И. 1970. Роль микроорганизмов в выщелачивании цветных и редких металлов из руд. — Успехи микробиол., **6**, 174.
- Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голомзик А. И. 1972. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., «Наука».
- Комаратьева Е. И. 1963. Фотосинтезирующие бактерии. М., Изд-во АН СССР.
- Крамаренко Л. Е., Призренова И. И. 1961. Денитрифицирующие окисляющие серу бактерии в сульфидных месторождениях и метод их выявления при поисковых работах. — Материалы по региональной и поисковой гидрогеологии ВСЕГЕИ, нов. сер., **61**, 209.
- Кузнецов С. И. 1955. Микроорганизмы горячих ключей Камчатки. — Труды Ин-та микробиологии АН СССР, **4**, 130.
- Кузнецов С. И., Иванов М. В., Ляликова Н. Н. 1962. Введение в геологическую микробиологию. М., Изд-во АН СССР.
- Кузнецов С. И., Соколова Г. А. 1960. Некоторые данные по физиологии *Thiobacillus thioparus*. — Микробиол., **29**, 170.
- Кузнецова Э. Г. 1970. Зарубежный опыт применения микробиологических методов для извлечения урана из бедных руд. — Успехи микробиол., **6**, 153.
- Ляликова Н. Н. 1959. Физиология и экология *Thiobacillus ferrooxidans* в связи с его ролью в окислении сульфидных руд. М. Канд. дисс.
- Ляликова Н. Н. 1967. Окисление антимонита новой культурой тионовокислых бактерий. — Докл. АН СССР, **176**, 1432.
- Ляликова Н. Н. 1968. Особенности физиологии микроорганизмов, окисляющих сульфиды металлов. — В кн.: Применение бактериального метода выщелачивания цветных металлов из забалансовых руд. Материалы Всесоюзн. Конф., стр. 5.
- Ляликова Н. Н. 1970. Роль микроорганизмов в образовании и разрушении сульфидов в рудных месторождениях. — Геология рудных месторождений, **12**, 63.
- Омелянский В. Л. 1904. Круговорот серы. — В кн. Избр. труды, **1**, 398, 1953. М., Изд-во АН СССР.
- Пельш А. Д. 1936. Гидробиология Кара-Бугаза. — Труды соляной лаб. АН СССР, **5**, 49.
- Перфильев Б. В. 1969. О новом серо-железном микроорганизме *Thiodendron latens* и способах его выращивания в элективных культурах. — Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 181.
- Перфильев Б. В., Габе Д. Р. 1961. Капиллярные методы изучения микроорганизмов М.—Л., Изд-во АН СССР.
- Перфильев Б. В., Габе Д. Р. 1964. Роль микроорганизмов в образовании железо-марганцевых руд. М.—Л., «Наука».
- Романова А. К., Заварзин Г. А., Чекина Н. Г. 1969. Влияние кислотности среды на продукты хемосинтеза тионовых бактерий. — Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 277.
- Соколова Г. А. 1963. Геохимическая деятельность *Thiobacillus thioparus*. М., Канд. дисс.

- Соколова Г. А., Карвайко Г. И. 1964. Физиология и геохимическая деятельность тионовых бактерий. М., «Наука».
- Тихонова Г. В. 1967. Исследование систем переноса электрона в железокисляющих бактериях. М. Канд. дисс.
- Тюльпанова-Мосевич М. В. 1930. Денитрификация на неорганической среде. — Архив биол. наук, **30**, 203.
- Abdul Matin, Rittenberg S. C. 1970a. Utilization of glucose in heterotrophic media by *Thiobacillus intermedius*. — J. Bacteriol., **104**, 234.
- Abdul Matin, Rittenberg S. C. 1970b. Regulation of glucose metabolism in *Thiobacillus intermedius*. — J. Bacteriol., **104**, 239.
- Aleem M. I. H. 1965. Thiosulphate oxidation and electron transport in *Thiobacillus novellus*. — J. Bacteriol., **90**, 95.
- Aleem M. I. H. 1966. Generation of reducing power in chemosynthesis. IV. Energy linked reduction of pyridine nucleotides by succinate in *Thiobacillus novellus*. — Biochim. et biophys. acta, **128**, 1.
- Aleem M. I. H. 1969. Generation of reducing power in chemosynthesis. VI. Energy linked reactions in the chemoautotroph *Thiobacillus neapolitanus*. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **35**, 379.
- Andersen K. J., Lundgren D. G. 1969. Enzymatic studies of the iron oxidizing bacterium, *Ferrobacillus ferrooxidans*: evidence for glycolytic pathway and Krebs cycle. — Canad. J. Microbiol., **15**, 73.
- Aubert J., Milhaud G., Millet J. 1956. Metabolism du carbone dans la chimioautotrophie. I. Mode d'incorporation de l'anhydride carbonique. — C. r. Acad. sci., **242**, 2059.
- Aubert J., Milhaud G., Millet J. 1957a. La metabolisme du carbone dans la chimioautotrophie. Fixation de l'anhydride carbonique sur l'acide phosphoenolpyruvique. — C. r. Acad. sci., **244**, 398.
- Aubert J., Milhaud G., Millet J. 1957b. L'assimilation de l'anhydride carbonique par les bactéries chimioautotrophes. — Ann. Inst. Pasteur, **92**, 515.
- Baalsrud K., Baalsrud K. S. 1952. The role of phosphate in CO₂ assimilation of thiobacilli. — In: Phosphorus metabolism, v. 2, McElroy and Glass (Eds), p. 544.
- Baalsrud K., Baalsrud K. S. 1954. Studies on *Thiobacillus denitrificans*. — Arch. Mikrobiol., **20**, 34.
- Bahr H., Schwartz W. 1956. Untersuchungen zur Ökologie farbloser fädiger Schwefelmikroben. — Biol. Zbl., **75**, 451.
- Bahr H., Schwartz W. 1957. Vergleichende cytologische Untersuchungen an farblosen fädigen Schwefelmikroben und anderen hormogonalen Cyanophyceen. — Biol. Zbl., **76**, 185.
- Bavendamm W. 1924. Die farblosen und roten Schwefelbakterien des Süß- und Salzwassers. — Pflanzenforschung, H. 2.
- Beck J. 1967. The role of bacteria in copper mining operation. — Biotechnol. and Bioengng., **9**, 487.
- Beck J. V., Dugan D. G. 1968. Direct sulphide oxidation in the solubilization of sulphide ores by *Thiobacillus ferrooxidans*. — J. Bacteriol., **96**, 1433.
- Beijerinck M. W. 1904. Über Bakterien, welche im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. — Zbl. Bakteriol., II. Abt., **11**, 597.
- Blaylock B. A., Nason A. 1962. Iron oxidation by the extracts of the chemoautotroph *Ferrobacillus ferrooxidans*. — Federat. Proc., **21**, 49.
- Borichewski R. M., Umbreit W. 1966. The growth of *Thiobacillus thiooxidans* on glucose. — Arch. Biochem. and Biophys., **116**, 97.
- Boer W. E. de, LaRiviere J. M., Hauvink A. L. 1961. Observation on the morphology of *Thiovulum majus* Hintze. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **27**, 477.
- Brock T. D., Brock M. L., Bott T. L., Edwards M. R. 1971. Microbial life at 90°C: the sulphur bacteria of Boulder Spring. — J. Bacteriol., **107**, 303.
- Burton S. D., Marita R. Y. 1964. Effects of catalase and cultural conditions on growth of *Beggiatoa*. — J. Bacteriol., **88**, 1755.

- Cataldi M. S. 1940. Aislamento de *Beggiatoa alba* en cultivo puro. — Rev. Inst. Bacteriol., **9**, 393. Цит. по Faust, Wolfe, 1961.
- Charles A. M., Suzuki I. 1966a. Mechanism of thiosulphate oxidation by *Thiobacillus novellus*. — Biochim. et biophys. acta, **128**, 510.
- Charles A. M., Suzuki I. 1966. Purification and properties of sulphite: cytochrome *c* oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. — Biochim. et biophys. acta, **128**, 522.
- Colmer A. R. 1960. Does *Thiobacillus ferrooxidans* utilize thiosulphate? — Bacteriol. Proc., 84.
- Colmer A. R., Hinkle M. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage. — Science, **106**, 253.
- Colmer A. R., Temple K., Hinkle M. 1949. An iron oxidizing bacterium from drainage of some bituminous coal mines. — J. Bacteriol., **59**, 317.
- Czurda V. 1935. Über eine neue autotrophe und thermophile Schwefelbakterien Gesellschaft. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., **92**, 407.
- Devidé Z. 1949. Report on cytological investigations of Leucothiobacteria. Ljetopis Jugosl. Akad. Snanosti Umjetnosti u Sagrebu, 55.
- Devidé Z. 1954. Investigations on cell on colourless sulphur bacteria. — Acta pharm. Jugosl., **4**, 147.
- Din G. A., Suzuki I. 1967. Mechanism of Fe²⁺ cytochrome *c* reductase of *Ferrobacillus ferrooxidans*. — Canad. J. Biochim., **45**, 1547.
- Din G. A., Suzuki I., Lees H. 1967a. Carbone dioxide fixation and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Ferrobacillus ferrooxidans*. — Canad. J. Microbiol., **13**, 1413.
- Din G. A., Suzuki I., Lees H. 1967b. Ferrous iron oxidation by *Ferrobacillus ferrooxidans*. Purification and properties of Fe²⁺ cytochrome reductase. — Canad. J. Biochem., **45**, 1523.
- Drawert H., Metzner-Küster J. 1958. Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Beggiatoa alba* und *Thiothrix nivea*. — Arch. Mikrobiol., **31**, 422.
- Ehrlich H. L. 1971. Biogeochemistry of the minor elements in soil. — In: Soil Biochemistry, v. 2, 361. A. D. McLaren. (Ed.), J. Skujns. M. Dekker. Inc NY.
- Ehrlich H. L., Fox S. I. 1967. Environmental effects on bacterial copper extraction from low-grade cooper sulphide ores. — Biotechnol. and Bioengng. **9**, 471.
- Emoto J. 1929. Über drei neue Arten der schwefeloxydierenden Bakterien. — Proc. Imp. Acad. (Japan), **5**, 148.
- Emoto J. 1933. Verbreitung der schwefeloxydierenden Bakterien in den Thermen Japan. — Bot. Mag. (Tokyo), **47**, 6.
- Faure-Fremiet E., Ruiller C. 1958. Etude au microscope électronique d'une bactérie sulfureuse *Thiosululum majus* Hintze. — Exptl Cell Res., **14**, 29.
- Faust L., Wolfe R. 1961. Enrichment and cultivation of *Beggiatoa alba*. — J. Bacteriol., **81**, 99.
- Gale N. L., Beck J. V. 1966. Competitive inhibition of phosphoribulokinase by AMP. — Biochim. et biophys. acta, **24**, 792.
- Gale N. L., Beck J. V. 1967. Evidence of the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. — J. Bacteriol., **94**, 1052.
- Gicklhorn J. 1920. Über neue farblose Schwefelbakterien. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., **50**, 415.
- Göhring A. 1915. Beiträge zur Kenntniss der Physiologie und Verbreitung denitrifizierenden Thiosulfat Bakterien. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., **42**, 402.
- Guittoneau G. C. 1925. Sur la formation d'hyposulfites aux dépends de soufre par les microorganismes du sol. — C. r. Acad. sci., **180**, 1142.
- Happold F. C., Johnstone K. I., Rogers H. J., Youatt J. B. 1954. Isolation and characterization of an organism oxidizing thiocyanate. — J. Gen. Microbiol., **10**, 261.
- Happold F. C., Key A. 1937. The bacterial purification of gasworks liquors. II. The biological oxidation of ammonium thiocyanate. — Biochem. J., **31**, 1323.

- Harold R., Stanier R. Y. 1955. The genera *Leucothrix* and *Thiothrix*. — Bacteriol. Revs., **19**, 49.
- Hempfling W. P., Vishniac W. 1967. Yield coefficients of *Thiobacillus neapolitanus* in continuous culture. — J. Bacteriol., **93**, 874.
- Hintze G. 1913. Beiträge zur Kenntnis der farblosen Schwefelbakterien. — Ber. Dtsch. bot. Ges., **31**, 189.
- Hutchinsone M., Johnstone K. J., White D. 1965. The taxonomy of certain thiobacilli. — J. Gen. Microbiol., **41**, 357.
- Hutchinsone M., Johnstone K. J., White D. 1966. Taxonomy of acidophilic thiobacilli. — J. Gen. Microbiol., **44**, 373.
- Hutchinsone M., Johnstone K. J., White D. 1967. Taxonomy of anaerobic thiobacilli. — J. Gen. Microbiol., **47**, 17.
- Jackson J. F., Moriarty D. J. W., Nicholas D. J. D. 1968. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of thiobacilli and some nitrifying bacteria. — J. Gen. Microbiol., **53**, 53.
- Jacobsen H. C. 1912. Oxidation von elementarem Schwefel durch Bakterien. — Folia Microbiol., **1**, 487.
- Jacobsen H. C. 1914. Die Oxidation von Schwefelwasserstoff durch Bakterien. — Folia Microbiol., **3**, 155.
- Johnson C. L., Vishniac W. V., 1970. Growth inhibition in *Thiobacillus neapolitanus* by histidine, methionine, phenylalanine and threonine. — J. Bacteriol., **104**, 1145.
- Johnson E. J., Abraham S. 1969a. Assimilation and metabolism of exogenous organic compounds by the strict autotrophs *Thiobacillus thioparus* and *Thiobacillus neapolitanus*. — J. Bacteriol., **97**, 1198.
- Johnson E. J., Abraham S. 1969b. Enzymes of intermediary carbohydrate metabolism in the obligate autotrophs *Thiobacillus thioparus* and *Thiobacillus neapolitanus*. — J. Bacteriol., **100**, 962.
- Keil F. 1912. Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. — Beitr. Biol. Pflanz., **12**, 335.
- Kinsel N. A. 1959. Studies on an autotrophic bacterium oxidizing ferrous iron and elemental sulphur in acid media. — Diss. Abstr., **20**, 1533.
- Kinsel N. A., Umbreit W. W. 1964. Method for electrolysis of culture medium to increase growth of the sulphur oxidizing iron bacterium *Ferrobacillus sulfooxidans*. — J. Bacteriol., **87**, 1243.
- Kluyver A. J., van Niel C. B. 1936. Prospects for a natural system of classification. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **94**, 391.
- Kokur M., Martinez T., Mazanez K. 1968. Fine structure of *Micrococcus denitrificans* and *M. halodenitrificans* in relation to their taxonomy. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **34**, 19.
- Kolkwitz R. 1912. Über die Schwefelbakterien *Thioplaca ingrlica* Wislouch. — Ber. Dtsch. bot. Ges., **30**, 622.
- Kruyff C. de, van der Walt J., Schwartz H. 1957. The utilization of thiocyanate and nitrate by thiobacilli. — Antonie Leeuwenhoek. F. Microbiol. and Serol. **23**, 305.
- Kuene J. G., Veldkamp H. 1970. Isolation and properties of a chemolithotrophic sulphur-oxidizing *Spirillum* spec. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **36**, 186.
- La Riviere J. W. M. 1963. Cultivation and properties of *Thiovulum majus* Hintze. — Sympos. Marine Microbiol. Oppenheimer C. (Ed) C. Thomas Publ. Ill., p. 61.
- Lauterborn R. 1915. Die sapropelische Lebewelt. Ein Beitrag zur Biologie des Faulschlammes natürlicher Gewässer. — Verh. Naturhist. Med. Ver. Heidelberg, N. F. **13**, 395.
- Leathen W. W., Braley S. A. 1955. Interpretation of reactions in acid thiosulphate media. — J. Bacteriol., **69**, 481.
- Leathen W. W., Kinsel N. A., Braley I. A. 1956. *Ferrobacillus ferrooxidans*: a chemosynthetic autotrophic bacterium. — J. Bacteriol., **72**, 700.

- Le John H. B., van Caesele L., Lees H. 1967. Catabolite repression in the facultative chemoautotroph *Thiobacillus novellus*. — J. Bacteriol., **94**, 1484.
- Lieske R. 1912. Untersuchungen über die Physiologie der denitrifizierenden Schwefelbakterien. — Ber. Dtsch. bot. Ges., **30**, 12.
- London J., Rittenberg S. C. 1964. Path of sulphur in sulphide and thiosulphate oxidation by thiobacilli. — Proc Nat. Acad. Sci. USA, **52**, 1183.
- London J., Rittenberg S. C. 1966. Effects of organic matter on the growth of *Thiobacillus intermedius*. — J. Bacteriol., **91**, 1062.
- London J., Rittenberg S. C. 1967. *Thiobacillus perometabolis* nov. s. a non-autotrophic thiobacillus. — Arch. Mikrobiol., **59**, 218.
- Lytic R. M., Suzuki I. 1970a. Enzymes involved in the metabolism of thiosulphate by *Thiobacillus thioparus*. I. Survey of enzymes and properties of sulphite: cytochrome *c* oxidoreductase. — Canad. J. Biochem., **48**, 334.
- Lytic R. M., Suzuki I. 1970b. Enzymes involved in the metabolism of thiosulphate by *Thiobacillus thioparus*. II. Properties of adenosine-5'-phosphosulphate reductase. — Canad. J. Biochem., **48**, 344.
- Lytic R. M., Suzuki I. 1970c. Enzymes involved in the metabolism of thiosulphate by *Thiobacillus thioparus*. III. Properties of thiosulphate-oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulphate oxidation. — Canad. J. Biochem., **48**, 355.
- Lytic R. M., Suzuki I. 1970d. Kinetic studies of sulphite: cytochrome *c* oxidoreductase, thiosulphate oxidizing enzyme and adenosine-5'-phosphosulphate reductase from *Thiobacillus thioparus*. — Canad. J. Biochem., **48**, 594.
- Maciag W. J., Lundgren D. C. 1964. Carbon dioxide fixation in the chemoautotrophe *Ferrobacillus ferrooxidans*. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., **17**, 603.
- Maier S., Murray R. G. E. 1965. The fine structure of *Thioplota ingraca* and a comparison with *Beggiatoa*. — Canad. J. Microbiol., **11**, 645.
- McChesney C. A. 1958. Occurrence of rhodanese in a species of *Thiobacillus*. — Nature, **181**, 347.
- McGoran C. J. M., Duncan D. W., Walden C. C. 1969. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on various substrates. — Canad. J. Microbiol., **15**, 135.
- Molisch H. 1912. Neue farblose Schwefelbakterien. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **33**, 55.
- Moriarty D. J. W., Nicholas D. J. D. 1969. Enzymic sulphide oxidation by *Thiobacillus concretivorus*. — Biochim et biophys. acta, **184**, 114.
- Moriarty D. J. W., Nicholas D. J. D. 1970. Electron transfer during sulphide and sulphite oxidation by *Thiobacillus concretivorus*. — Biochim. et biophys. acta, **216**, 130.
- Nadson G. A., Wislouch S. M. 1923. La structure et la vie de la bactérie geante *Achromatium oxaliferum* (Schew). — Bull. Princip. Jard. Bot. Republique Russe, **22**.
- Nathanson T. 1902. Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. — Mitt. Zool. Stat. Neapel., **15**, 655.
- Ordal F. J., Palmer E. 1964. Steady state enrichment cultures of bacteria. — In: Continuous cultivation of microorganisms. I. Malek, K. Beran, J. Hlospodka (Eds.). Prague, Publ. House Czech. Acad. Sci., p. 133.
- Parker C. D. 1945. The isolation of a species of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmospheres containing hydrogen sulphide. — Austral. J. Exptl Biol. and Med. Sci., **23**, 81.
- Parker C. D. 1947. Species of sulphur bacteria associated with the corrosion of concrete. — Nature, **159**.
- Parker C. D., Prisk T. 1953. The oxidation of inorganic sulphur compounds by various sulphur bacteria. — J. Gen. Microbiol., **8**, 344.
- Peck H. D. jr. 1962. Comparative metabolism of inorganic sulphur compounds in microorganisms. — Bacteriol. Revs. **26**, 67.
- Peeters T., Aleem M. I. H. 1970. Oxidation of sulfur compounds and electron transport in *Thiobacillus denitrificans*. — Arch. Mikrobiol., **71**, 319.

- Pringsheim E. G. 1963. Farblose Algen. Fischer Jena.
- Pringsheim E. G. 1967. Die Mixotrophie von *Beggiatoa*. — Arch. Mikrobiol., **59**, 247.
- Remsen C. C., Lundgren D. C. 1966. Electron microscopy of the cell envelope of *Ferrobacillus ferrooxidans* prepared by freeze etching and chemical fixation techniques. — J. Bacteriol., **92**, 1765.
- Rittenberg S. C. 1969. The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. — In: Advances Microbial. Physiol., v. 3, p. 159.
- Roy A. B., Trudinger P. A. 1970. The biochemistry of inorganic compounds of sulphur. Cambridge Univ. Press.
- Santer M., Boeyer J., Santer U. 1959. *Thiobacillus novellus*. I. Growth on organic and inorganic media. — J. Bacteriol., **78**, 197.
- Schewiakoff W. 1893. Über einen neuen Bakterienähnlichen Organismus des Süßwassers. Heidelberg.
- Schnaitman C. A., Korczynski M. S., Lundgren D. G. 1970. Kinetic studies of iron oxidation by whole cells of *Ferrobacillus ferrooxidans*. — J. Bacteriol., **99**, 552.
- Scotten H. L., Stokes J. L. 1962. Isolation and properties of *Beggiatoa*. — Arch. Microbiol., **42**, 353.
- Shafia F., Wilkinson R. F. 1969. Growth of *Ferrobacillus ferrooxidans* on organic matter. — J. Bacteriol., **97**, 256.
- Shively L. M., Ducker G. L., Greenawald L. W. 1970. Comparative ultrastructure of the thiobacilli. — J. Bacteriol., **101**, 618.
- Silver M. 1970. Oxidation of elemental sulphur and sulphur compounds by *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). — Canad. J. Microbiol., **16**, 845.
- Silver M., Lundgren D. G. 1968a. The thiosulphate oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). — Canad. J. Biochem., **46**, 1215.
- Silver M., Lundgren D. G. 1968b. Sulphur-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). — Canad. Biochem., **46**, 457.
- Silver M., Lundgren D. G. 1968c. The thiosulphate oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). — Canad. J. Biochem., **46**, 1215.
- Silver M., Margalith P., Lundgren D. G. 1967. Effect of glucose on carbone dioxide assimilation and substrate oxidation by *Ferrobacillus ferrooxidans*. — J. Bacteriol., **93**, 1765.
- Silverman M. P. 1960. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. — Diss. Abstr., **20**, 3473.
- Silverman M. P., Ehrlich H. L. 1964. Microbial formation and degradation of minerals. — Advanc. Appl. Microbiol.
- Silverman M., Lundgren D. G. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. — J. Bacteriol., **77**, 642.
- Sivaji Rao G., Berger L. P. 1970. Basis of pyruvate inhibition in *Thiobacillus thiooxidans*. — J. Bacteriol., **102**, 462.
- Skerman V. B. D., Dementjeva G., Carey B. 1957. Intracellular deposition of sulphur by *Sphaerotilus natans*. — J. Bacteriol., **73**, 504.
- Soriano S., Lewin R. A. 1965. Gliding microbes: some taxonomic reconsiderations. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **31**, 66.
- Starkey R. L. 1934. The production of polythionates from thiosulphate by microorganisms. — J. Bacteriol., **28**, 365.
- Starkey R. L. 1935. Isolation of some bacteria which oxidize thiosulphate. — Soil Sci., **39**, 197.
- Suckow R., Schwartz W. 1962. Redox conditions and precipitation of iron and copper in sulphureta. — Sympos. Marine Microbiol. C. Oppenheimer (Ed.). Springfield, C. Thomas, p. 187.

- Suzuki J., Werkman C. H. 1960. Glutathione reductase of *Thiobacillus thiooxidans*. — *Biochem. J.*, **74**, 319.
- Taylor B. F., Hoare D. S. 1969. New facultative *Thiobacillus* and a reevaluation of the heterotrophic potential of *Thiobacillus novellus*. — *J. Bacteriol.*, **100**, 487.
- Trautwein K. 1921. Beitrag zur Physiologie und Morphologie der Thiosäurebakterien (Omeljanskii). — *Zbl. Bakteriöl.*, II Abt., **53**, 513.
- Trautwein K. 1924. Die Physiologie und Morphologie der fakultativ autotrophen Thio Säurebakterien unter heterotrophen Ernährungsbedingungen. — *Zbl. Bakteriöl.*, II Abt., **61**, 1.
- Trudinger P. 1955. Phosphoglycerate formation from pentose phosphate by extracts of *Thiobacillus denitrificans*. — *Biochim. et biophys. acta*, **18**, 851.
- Trudinger P. 1956. Carbone dioxide fixation by extracts of the strict autotroph *Thiobacillus denitrificans*. — *Biochem. J.*, **64**, 274.
- Trudinger P. 1967a. The metabolism of inorganic sulphur compounds by thiobacilli. — *Rev. Pure and Appl. Chem.*, **17**, 1.
- Trudinger P. 1967b. The metabolism of thiosulphate and tetrathionate by heterotrophic bacteria from soil. — *J. Bacteriol.*, **93**, 550.
- Trudinger P. A. 1969. Assimilatory and dissimilatory metabolism of inorganic sulphur compounds by microorganisms. — *Advanc. Bacterial. Physiol.*, **11**.
- Unz F., Lundgren D. C. 1961. A comparative nutritional study of three chemoautotrophic bacteria: *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*. — *Soil Sci.*, **92**, 302.
- Van der Walt J. P., de Kruyff C. D. 1955. Anaerobic metabolism of thiocyanate by thiobacilli. — *Nature*, **176**, 310.
- Van Niel C. B. 1957. Achromatiaceae. — In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Virieux J. 1912. Sur l'*Achromatium oxaliferum* Schewiakoff. — *C. r. Acad. sci.*, **154**, 716.
- Virieux J. 1913. Recherches sur l'*Achromatium oxaliferum*. — *Ann. Sci. natur.*, ser., **18**, 265.
- Vishniac W. 1952. The metabolism of *Thiobacillus thioparus*. I. Oxidation of thiosulphate. — *J. Bacteriol.*, **64**.
- Vishniac W., Santer M. 1957. The thiobacilli. — *Bacteriol. Revs.*, **21**, 195.
- Waksman S. 1922. Microorganisms concerned in the oxidation of sulphur in the soil. IV. Bacteria oxidizing sulphur under acid and alkaline conditions. — *J. Bacteriol.*, **7**, 609.
- Waksman S. A., Joffe J. S. 1922. Microorganisms concerned in the oxidation of sulphur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans* a new sulphur oxidizing organism isolated from the soil. — *J. Bacteriol.*, **7**, 239.
- Waksman S. A., Starkey R. L. 1923. On the growth and respiration of autotrophic bacteria. — *J. Gen. Physiol.*, **5**, 285.
- Welsch H. 1961. Two new Cyanophytes from the Transvaal. — *Nova Hedwigia*, **3**, 37. Цит. по Pringsheim, 1963.
- Winogradsky S. 1888. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bacterien. Heft I. Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien. Leipzig. Verlag A. Felix.
- Wislouch S. M. 1912. *Thioploca ingraca* nov. sp. — *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **30**, 470.
- Wooley D., Jones G., Happold F. 1962. Some metabolic differences between *Thiobacillus thioparus*, *T. denitrificans* and *T. thiooxyanooxidans*. — *J. gen. Microbiol.*, **29**, 311.
- Youatt J. B. 1954. Studies on the metabolism of *Thiobacillus thiooxyanooxidans*. — *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 139.

НИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ НИТРИФИКАЦИИ

Нитрификация относится к одному из тех многочисленных микробиологических процессов, которые человечество стало использовать задолго до того, как поняло его природу. В течение столетий селитру, необходимую составную часть пороха, получали путем разложения азотистых органических веществ. В России производство буртовой селитры было прекращено в 1886 г. (Имшенецкий, 1956).

С прекращением использования буртовой селитры для промышленных целей внимание было обращено на значение нитрификации для сельского хозяйства. Открытие бактерий — возбудителей процесса нитрификации, благодаря Виноградскому, оказалось событием, совершившим революцию в микробиологии. Изучение нитрификаторов прошло этапы, характерные для изучения всех специфических процессов, вызываемых микроорганизмами.

После обнаружения химического процесса и овладения им по методу «черного ящика», как это называют теперь, наступила пора химических гипотез, но уже в 1879 г. Шлезинг и Мюнц (Schloesing, Müntz, 1879) доказали биологическую природу процесса: сточные воды, обработанные хлороформом, оказывались неспособны к нитрификации. Многочисленные опыты с разнообразными антисептиками подтвердили вывод, что нитрификацию вызывают микроорганизмы. Далее возник вопрос о специфичности агента нитрификации. Пастер писал по этому поводу (Pasteur, 1880) ...«Мне кажется маловероятным существование специального фермента — организма, находящегося в процессе развития, так как в этом состоянии он вызвал бы скорее денитрификацию; я считаю более вероятным, что нитрификация является физическим результатом абсорбции и переноса кислорода на аммиачные соединения бесчисленным количеством зародышей, содержащихся в земле, результатом переноса, аналогичного тому, который происходит под влиянием *Mycoderma acetii* в жидкостях, содержащих спирт и превращающихся в уксусную кислоту».

Многие исследователи нитрификации пытались, исходя из этих представлений, получить культуру нитрификаторов (см. Гутина, 1963), но все их опыты оказывались недоказательными: организ-

мы, росшие на органических средах, при выделении в чистую культуру переставали нитрифицировать.

Тем большее значение следует придать открытию Виноградского, которое утвердило в микробиологии представление об узкой специализации химических функций микроорганизмов. Открытие возбудителей нитрификации было подготовлено предыдущими исследованиями Виноградского с железобактериями и серобактериями, но вопреки тому, что Виноградский писал впоследствии, именно открытие нитрификаторов явилось бесспорным доказательством существования хемосинтеза, потому что здесь были выполнены два требования, отсутствовавшие в предыдущих работах: 1) получена чистая культура организма; 2) произведены количественные химические определения потребляемого неорганического субстрата и образованного органического углерода.

Виноградский сам описал ход мыслей, приведших его к установлению нового физиологического типа в статье «Нитрификация» (1904), послужившей тем шаблоном, «алгоритмом», по которому идут исследователи хемоавтотрофов.

К 1888 г. агрохимики окончательно установили природу нитрификации как биологического явления, показав ее связь с деятельностью почвенных микроорганизмов. Уоррингтон (Warrington, 1879, 1884 a, b, 1890) с несомненностью установил, что нитрификации органического азота всегда предшествует выделение аммиака и что образованию нитратов предшествует появление нитритов. Таким образом, была в общих чертах установлена последовательность реакций минерализации органического азота (нитрификации в понимании агрохимиков) и стало вероятным предположение, что каждый этап процесса осуществляется соответствующими микроорганизмами. Однако вопрос о существовании специфического возбудителя нитрификации оставался открытым: организм не удавалось обнаружить.

Постоянные неудачи с попытками выделить нитрификаторов общепринятыми методами привели Виноградского к заключению, что процесс вызывался небольшой группой организмов, возможно, одним-единственным видом, физиологические свойства которого были такими же, как у изученных ранее серобактерий и железобактерий. Поиски нитрификаторов осуществлялись с заранее сложившейся идеей об их физиологическом типе, что позволило применить принцип селективной культуры. При изучении культур, где единственным окисляемым субстратом был аммоний, сначала происходило образование нитрита и лишь после исчерпания аммония в среде начиналось образование нитратов за счет нитритов. Выделение организма, способного окислять аммиак в нитрит, но не в нитрат, заставляло искать и выделить организм, возбуждавший вторую фазу нитрификации. Открытие возбудителя второй фазы нитрификации — организма, который существует за счет вещества, практически не встречающегося в природе в сколько-нибудь заметных концент-

рациях, — наглядный пример того, как много может быть обнаружено при исследовании физиологических функций чистых культур микроорганизмов, входящих в метабиотические системы.

Культуры нитрифицирующих микроорганизмов, выделенных Виноградским, не могли быть собственно названы бактериологическими культурами в привычном понимании слова: в среде не происходило никаких видимых изменений, под микроскопом обнаруживались единичные клетки микроорганизмов, и только быстрый и закономерный ход химических изменений при посеве в стерильную среду свидетельствовал о том, что процесс имеет бактериальную природу.

Многие гетеротрофные организмы, в их числе *Fusarium*, *Nocardia*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, образуют нитриты из аминов, амидов, оксимов, гидроксилamina. Эта гетеротрофная нитрификация не служит источником энергии для организма, а скорее всего обусловлена побочной деятельностью ферментов (Alexander, 1965).

Превращение аммония в окисленные соединения подчиняется определенным термодинамическим закономерностям, которые были рассчитаны Пурбе и Зубовой (Pourbaix, de Zoubov, 1963). На диаграмме (рис. 35) представлены основные стабильные соединения азота, находящиеся в растворе.

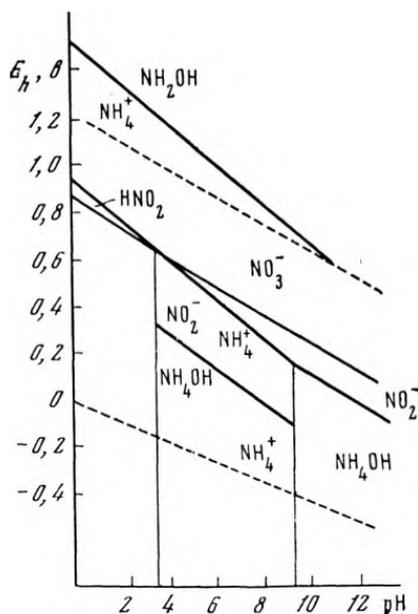


Рис. 35. Поля устойчивости соединений азота, важных при нитрификации, в координатах E_h — pH (Pourbaix, de Zoubov, 1963)

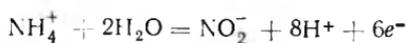
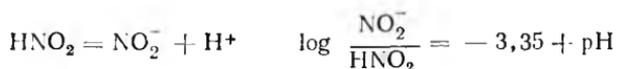
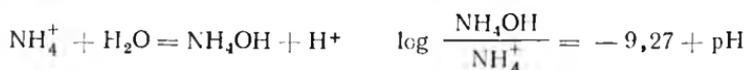
Пунктир — поле устойчивости воды

В окисленной области господствует нитрат-ион, в восстановленной — ион аммония. Между ними располагается узкая полса, в которой наиболее устойчивым является нитрит-ион. С биологической точки зрения важна граница, когда ион нитрита переходит в высокой степени ядовитую азотистую кислоту. Ниже значений pH 4 мы не вправе ожидать биологических превращений азота, проходящих через стадию азотистой кислоты, так как для клетки это было бы равносильно самоубийству через азотирование азотистых оснований нуклеиновых кислот. Верхнее значение pH для нитрификации располагается несколько выше 9, при котором проходит граница ион аммония/аммоний. Окисление аммиака может происходить только в области сравнительно высоких значений окислительно-восстановительного потенциала, для нитрифи-

каши первой фазы несколько ниже, чем для второй. Как будет видно из дальнейшего изложения, физиологические характеристики нитрификаторов хорошо согласуются с полями устойчивости продуктов и субстратов реакции.

Любопытное затруднение возникает в связи с тем, что ни одна из реакций, осуществляемых нитрификаторами, не может восстановить физиологические переносчики электрона, так как потенциал реакций аммоний→нитрит и нитрит→нитрат слишком высок. Отсюда следует рассмотреть возможность участия промежуточных продуктов, которые могли бы восстановить цитохром *c*. Таким соединением является гидроксилламин, участие которого в нитрификации первой фазы было убедительно показано многими исследователями. В связи с этим необходимо дополнительно рассмотреть переходы аммоний→гидроксилламин и гидроксилламин→нитрит. Соответствующие расчеты показывают, что окисление аммиака в гидроксилламин—энергетически невыгодная реакция (Anderson, 1964, 1965a, b), которая может осуществляться только под действием такого окислителя, потенциал которого при pH 7 положительнее 0,92 в. Таким образом, первая реакция должна представлять собой реакцию окисления аммония. Гидроксилламин обладает достаточно низким потенциалом, чтобы восстановить цитохром *c* в реакции гидроксилламин→нитрит, имеющей при pH 7 потенциал 0,07 в, т. е. примерно такой же величины, как естественный восстановитель цитохрома *c*—цитохром *b*. Можно думать далее, что нитрификаторы второй фазы, не нуждающиеся в мощном окислителе для превращения аммония в гидроксилламин, обладают нормальной цитохромоксидазой, в то время как для нитрификаторов первой фазы терминальный участок цепи переноса электрона должен быть представлен ферментами, способными окислять аммиак. Различные функции терминального участка цепи переноса электрона при окислении аммония или нитрита делают вероятным предположение, что эти реакции могут осуществлять разные микроорганизмы, т. е. что нужны специфические агенты для первой и второй фаз нитрификации.

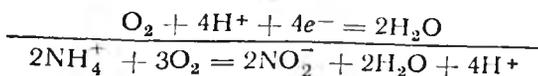
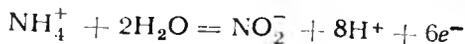
Относящиеся к диаграмме (см. рис. 35) уравнения приведены ниже:



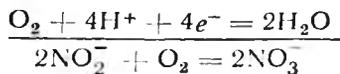
$$E_0 = 0,897 - 0,0788 \text{ pH} + 0,0098 \log \frac{\text{NO}_2^-}{\text{NH}_4^+}$$



$$E_0 = 0,835, - 0591 \text{ pH} + 0,0295 \log \frac{\text{NO}_3^-}{\text{NO}_2^-}$$

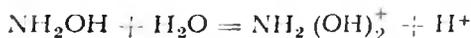


$$\Delta G^0 = - 91880 \text{ кал}$$



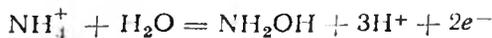
$$\Delta G^0 = - 36360 \text{ кал}$$

Промежуточный продукт нитрификации, гидроксилламин, в интересующей нас области существует в форме NH_2OH :



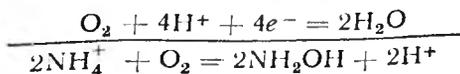
$$\log \frac{\text{NH}_2(\text{OH})_2^+}{\text{NH}_2\text{OH}} = \frac{- 13540 + 56690 + 5600}{1363} + \text{pH} = - 35,9 + \text{pH}$$

При окислении аммиака в гидроксилламин могут происходить следующие реакции:



$$E_0^0 = - \frac{- 5600 + 56690 + 19000}{23060 \times 2} = + 1,52 \text{ в}$$

$$E_0 = 1,52 - 0,0885 \text{ pH} + 0,295 \log \frac{\text{NH}_2\text{OH}}{\text{NH}_4^+}$$



$$\Delta G^0 = + 26800 \text{ кал}$$

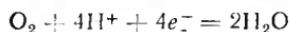


$$E_0^0 = \frac{- 8250 + 56690 + 5600}{23060 \times 4} = + 0,586 \text{ в}$$

$$E_0 = 0,586 - 0,0740 \text{ pH} + 0,0148 \log \frac{\text{NO}_2^-}{\text{NH}_2\text{OH}}$$

При pH 7: $E_0^0 = 0,586 - 0,0740 \times 7 = + 0,068 \text{ в}$.

В результате получаем:



$$\Delta G^0 = -59340 \text{ кал}$$

ВЫДЕЛЕНИЕ НИТРИФИКАТОРОВ

Наиболее надежным, хотя и трудоемким методом выделения нитрифицирующих бактерий, является метод разведений; несмотря на кажущуюся громоздкость, опыт работы с нитрификаторами позволяет рекомендовать именно эту методику.

Несколько исследователей добились успеха с помощью микроампуляции (Nelson, 1931; Kingma Boltjes, 1935). Имеется целый ряд вариантов плотных сред. Несмотря на кажущуюся привлекательность всех этих приемов, их практическое применение требует отработки методики. Трудность выделения чистых культур нитрифицирующих бактерий является причиной того, что пока исследовано ограниченное число штаммов.

Накопительную культуру нитрификаторов получают на жидкой минеральной среде с аммонием или нитритом. Садовая почва является надежным посевным материалом, если к происхождению организма не предъявляется каких-либо специальных требований. Высушенные образцы почвы малопригодны. Пересевы накопительной культуры нужно делать возможно чаще, как только использован субстрат. После того как установится регулярный ход нитрификации и, следовательно, будет доминировать микрофлора, приспособленная к выбранной среде, можно приступать к выделению. Особое внимание следует обратить на состояние посевного материала в момент выделения культуры. Для *Nitrosomonas* наиболее благоприятным является момент появления подвижных клеток в среде, для *Nitrobacter* — конец экспоненциальной фазы, который бывает примерно на 4—5-е сутки. Появление зооглей делает нецелесообразным применение посева каплей. И спутники и нитрификаторы достигают в момент посева концентрации порядка 10^5 — 10^7 клеток/мл. Культуру засевают в капилляр, которым можно наносить капли диаметром около 0,1 мм. Капли наносят на сухие стерильные обломки покровных стекол, которые тут же бросают в пробирки с 5 мл среды, защищенные поверх ватной пробки пергаментным колпачком. Число колб или пробирок должно превышать 200. Наибольшие шансы получить чистую культуру — в пробирках, где развитие начинается позже всего и срок инкубации составляет обычно 1—2 месяца. По истечении этого времени культуры, в которых прошла нитрификация, проверяют

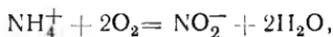
на чистоту. Очевидно, что применение сколько-нибудь сложных методов анализа при таком массовом посеве исключено. Поэтому определяют для первой фазы образование нитритов, а для второй фазы — использование нитритов по реакции с реактивом Грисса. Проверку на чистоту осуществляют либо посевом в МПБ, либо лучше на картофельный агар. Культуры, давшие рост на этих средах, сразу же отбраковываются, а оставшиеся подвергаются детальной проверке на чистоту путем микроскопирования и посева на большой набор различных сред, рекомендованных Рубан (1961).

Из описания методики очевидно, что выделение микроорганизмов, отличающихся от *Nitrosomonas* или *Nitrobacter*, при применении этого метода маловероятно, и в этом смысле метод надежен, но для поисков новых нитрификаторов нужны и иные среды и более подробные анализы продуктов.

Мы так подробно изложили здесь методику посева каплей, потому что она оказывается удобной для выделения других хемоавтотрофов, развивающихся в жидкой среде. У нитрифицирующих бактерий описано так называемое «физиологическое образование вида» (Beijerinck, 1914): при посеве на органическую среду возбудитель необратимо теряет свою специфическую функцию и становится обычным гетеротрофом. Хотя причиной ее является недостаточно критическое отношение к чистоте культуры, ошибка регулярно повторяется уже более полувека,

ПЕРВАЯ ФАЗА НИТРИФИКАЦИИ

В первой фазе нитрификации происходит окисление аммиака до нитрита по уравнению

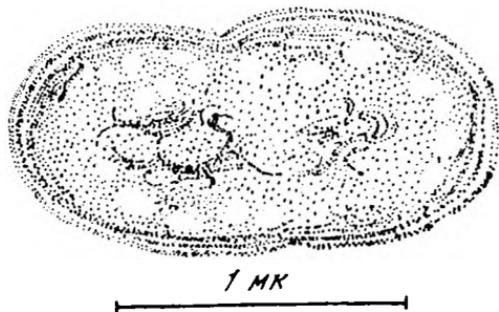


которое сопровождается ассимиляцией углекислоты. Единственный организм, который был детально изучен до последнего времени, — это *Nitrosomonas europaea*. Многие исследователи убеждены сейчас, что это единственный организм, ответственный за первую фазу нитрификации. Сам Виноградский (1952, стр. 241) считал в 1904 г., «что мы имеем дело не с одним-единственным видом — нитритным возбудителем старых авторов, но с целой группой видов или штаммов, в значительной мере сходных по своим морфологическим признакам, однако все же различимых друг от друга». В новых исследованиях над организмами нитрификации в 1933 г. Виноградский описал ряд морфологически различных организмов, обнаруженных на пластинках с кремниекислым гелем. Попытки воспроизвести эти работы оказывались большей частью неудачными: выделенные колонии оказывались загрязненными чаще всего миксобактериями (Имшенецкий, 1946, Grace, 1951). Однако

приготовленный по методу Виноградского кремнекислый гель не позволяет выделить чистые культуры, так как посторонние микроорганизмы быстро распространяются в поверхностной пленке воды. Тем не менее двум исследователям, по-видимому, удалось преодолеть трудности, связанные с выделением нитрификаторов, и описать ряд форм отчасти новых, отчасти совпадающих с ранее описанными (Watson, 1965; Watson, Waterbury, 1971; Soriano, 1963).

Рис. 36. Строение *Nitrosomona ciroraei*

Схематизировано по фотографии (Watson, 1965). Видны пачки мембран, окружающие клетку, нити ДНК, пустые места, где располагались гранулы полиоксимасляной кислоты



Морфологически *Nitrosomonas* представляет собой овальный, почти кокковидный организм размерами $0,6-1,0 \times 0,9-2$ мк, размножающийся делением пополам (рис. 36). В препарате накопительной культуры клетки *Nitrosomonas* легко обнаружить не только по их форме, но и по характерному блеску или окрашивая слабым раствором метиленовой синей: *Nitrosomonas* воспринимает окраску быстрее других бактерий. В жидкой культуре организм проходит несколько фаз развития, которые контролируются условиями среды. Основных фаз две: они представлены подвижной формой и неподвижными зооглеями.

Подвижные формы обладают жгутиком или пучком жгутиков, причем различные расы, как отметил уже Виноградский, различаются по характеру жгутикования. Последующие исследования организмов, выделенных в чистую культуру Ульяновой (1955), Рубан (1961), Ермаченко (1967), показали, что они мало отличались морфологически, а изменения организма по фазам развития культуры перекрывали различия между штаммами. Эти результаты находятся в некотором противоречии с описанием рода *Nitrosomonas* Виноградским и Виноградской (1933), которые отмечали, что организмы, отнесенные ими к роду *Nitrosomonas*, редко образуют агрегаты, а если и образуют, то в виде бесформенных скоплений, но не цист. Организмы, образующие плотные скопления, цисты, были отнесены Виноградскими к роду *Nitrosocystis*, который характеризуется именно образованием агрегатов. Развитие культуры в жидкой среде у обоих организмов включает появление подвижной стадии, а потом образование агрегатов.

Сразу же после опубликования работ Виноградских появились сообщения, что различие по форме колонии не является существенным признаком (Kingma Boltjes, 1935). Впоследствии к этому мнению присоединились и другие исследователи нитрификации.

Для *Nitrosomonas* были установлены следующие потребности в минеральных компонентах среды: фосфор — минимум 0,003 мг/л, оптимум (по поглощению кислорода) 120 мг/л, минимальная фаза задержки при 1—2 г/л; магний — 0,002 мг/л; железо — 6 мг/л (Meiklejohn, 1952); кальций — 0,5—1,0 мг/л (Kingma Boltjes, 1935; Skinner, Walker, 1961). Организм нуждается также в меди как микроэлементе. Наибышая скорость окисления устанавливается при концентрации аммония 180—1340 мг/л с характерным для многих организмов широким плато (Meyerhof, 1917; Hofman, Lees, 1953; Ермаченко, 1967). Оптимальные значения pH несколько различаются для разных штаммов, но обычно заключены в области 7—8 (Ульянова, 1955; Рубан, 1961; Ермаченко, 1967).

Для культивирования *Nitrosomonas* используются две основные среды: Виноградского с осадком карбоната кальция или магния и прозрачная среда Энгель и Александра, требующая непрерывной регуляции pH.

Среда Виноградского (Виноградский, 1904) в г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,5; K_2HPO_4 —1; NaCl —2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,01; CaCO_3 —10.

Среда Энгель и Александра (Engel, Alexander, 1958) в г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —3; K_2HPO_4 —0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,05; CaCl_2 —0,004; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,005 + 0,005 ЭДТА; K_2CO_3 до установления pH 8.

Развитие *Nitrosomonas* на этих средах было тщательно изучено Ермаченко (1967), результаты работы которой подтвердили общую теорию структурированного роста, изложенную Рамкрисханом с соавторами (см. главу 1) (рис. 37, 38). Скорость роста *Nitrosomonas* в экспоненциальной фазе не зависела от предыстории клеток или количества посевного материала, но эти факторы существенным образом влияли на величину фазы задержки роста, как это и предполагается теорией структурированного роста. Постоянство удельной скорости роста указывало на ограничение роста скорее всего какой-то внутренней реакцией синтеза.

Фазы развития культуры *Nitrosomonas* в жидкой среде протекают следующим образом (Рубан, 1961). Вплоть до 3—4-х суток клетки остаются прикрепленными к осадку и неподвижны. На 5—8-е сутки клетки активно подвижны, имеют жгутики. На этой фазе развития среда мутнеет. На 8—9-е сутки многие клетки задерживаются на стадии деления и начинают образовывать зооглеи. Ермаченко (1967) подробно исследовала условия перехода клеток в зооглеи и сохранения подвижности у выделенных ею штаммов. В ее опытах развитие культуры *Nitrosomonas* происходило исключительно закономерно и с фазами культуры согласовывались преобладающие морфологические формы.

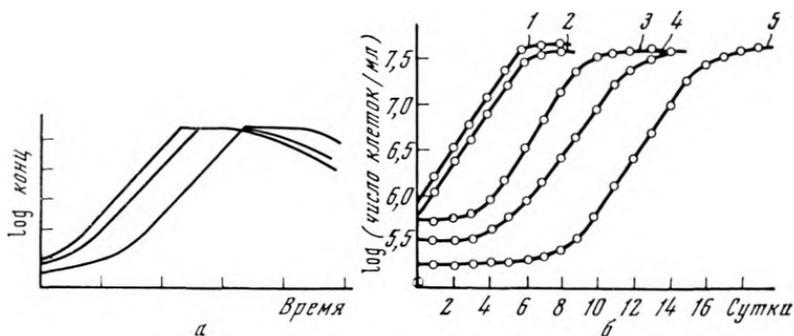


Рис. 37. Рост *Nitrosomonas* (Ермаченко, 1967) в сопоставлении с моделью структурированного роста (см. главу 1, рис. 4)

Влияние величины инокулята на уменьшение фазы задержки роста. Наклон кривых и урожай постоянны; а — структурированная модель в усл. ед.; б — рост *Nitrosomonas europaea*; посевной материал: 1 — $10,12 \cdot 10^5$; 2 — $6,64 \cdot 10^5$; 3 — $4,3 \cdot 10^5$; 4 — $3,32 \cdot 10^5$; 5 — $1,66 \cdot 10^5$ клеток/мл

Величина фазы задержки определялась состоянием и количеством посевного материала, а экспоненциальная фаза протекала вне зависимости от предыстории клеток со временем удвоения 24 часа, $\mu=0,029$. При этом интенсивность нитрификации была $3,5 \text{ мг NO}_2/\text{мг}$ сухого веса/час. В течение экспоненциального роста в культуре наблюдались только одиночные и жгутиковые делящиеся клетки. Замедление роста вызывается накоплением нитритов боль-

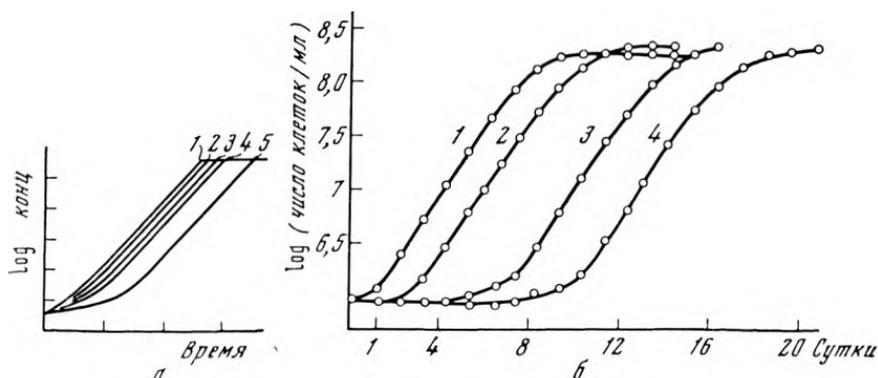


Рис. 38. Рост *Nitrosomonas* (Ермаченко, 1967) в сопоставлении с моделью структурированного роста (см. главу 1, рис. 4)

Зависимость от возраста посевного материала. Наклон кривых и урожай одинаковы, разница только в фазе задержки роста. а — структурированная модель в усл. ед. Отношение $G/(G+D+P)$: 1 — 0,17; 2 — 0,09; 3 — 0,05; 4 — 0,03; 5 — 0,01; б — рост *Nitrosomonas europaea*: 1 — посевной материал из начала экспоненциальной фазы; 2 — из экспоненциальной фазы; 3 — из фазы замедления роста; 4 — из начала стационарной фазы

ше 0,8 мг/мл. В это время начинают появляться слизистые зооглеи, соединенные тяжами, которые к началу стационарной фазы составляют 80% от числа всех клеток. Стационарная фаза начинается при концентрации 1100 мг/л NO_2^- . По наблюдениям Рубан, зооглеи обладают повышенной устойчивостью к внешним воздействиям и выносят 10 мин. нагревания до 60°. Напротив, подвижные одиночные клетки обладают повышенным содержанием цитохромов и большей окислительной активностью. Ермаченко показала, что клетки *Nitrosomonas* весьма чувствительны к отделению от среды: фильтрование снижает активность клеток в несколько раз, а центрифугирование с последующей отмывкой — общепринятая процедура для приготовления отмытых суспензий клеток — оставляет лишь одну десятую первоначальной активности.

Тонкое строение клеток *Nitrosomonas* в сравнении с другими нитрифицирующими бактериями исследовали Мюррей и Ватсон (Murray, Watson, 1965). Овальные клетки *Nitrosomonas* (см. рис. 36) обладали развитой системой мембран, которые располагались в несколько концентрических слоев под цитоплазматической мембраной, подобно той системе мембран, которая существует у почкующихся бактерий и позднее была обнаружена у метанооксиляющих. В остальном строение *Nitrosomonas* было сходно с грамотрицательными бактериями. Размножается *Nitrosomonas* делением пополам на две сестринские клетки.

Помимо морфологических различий между штаммами *Nitrosomonas* у этого организма можно найти расы, приспособившиеся к несколько различным условиям обитания. Рубан (1961) отмечает существование кроме мезофильных штаммов с оптимумом 26° организмы, имеющие оптимум 40°, и психрофильную культуру с оптимумом 4°. Виноградский отмечал, что нитрификаторы плохо выделяются из высушенных образцов почвы, но этого не нашли Рубан и другие исследователи. Организм поддается лиофилизации без применения защитных коллоидов.

Существуют так же галотолерантные формы. Оптимум рН несколько варьирует у разных штаммов, располагаясь в области рН 7,0—8,6.

В течение длительного времени аммоний рассматривался как единственный субстрат, который может использовать *Nitrosomonas*, окисляя его в строгом соответствии с уравнением, приведенным на стр. 228.

Рубан (1961) показала, что при нитрификации может быть использован еще ряд субстратов, в первую очередь связанных с разложением пуринов. Этими субстратами служат мочевина, аллантоин, мочевая кислота, гуанин. Окисляя азот этих соединений для нитрификации, *Nitrosomonas* не потреблял органическую часть молекулы, которая количественно обнаруживалась в культуральной среде. Использовались не все аминогруппы пуринов: азот

гетероциклов, по-видимому, оставался неиспользованным. В естественных условиях окисление органического азота происходит, вероятно, после того как сопутствующая микрофлора, обладающая повышенной уреазной активностью, освободит азот органических соединений в усвояемой для *Nitrosomonas* форме. При совместном воздействии нитрификаторов и аммонификаторов происходит полная минерализация органических соединений азота.

Nitrosomonas не использует органические вещества. У целых клеток не удается показать дегидрогеназной активности с большим набором органических веществ, в то время как эта активность обнаруживается с гидроксиламмином, промежуточным продуктом окисления аммония. Вместе с тем в бесклеточных экстрактах обнаруживаются ферменты, связанные с превращениями органических веществ. Обнаруженное Виноградским подавление нитрификации органическими веществами (Виноградский, 1952) послужило предметом длинной серии работ, в которых было выяснено, что различные органические вещества по-разному действуют на нитрификаторов, причем концентрации, которые в чистой культуре угнетают нитрификаторов, часто много выше тех, которые встречаются в естественных условиях. Биологический смысл подавления нитрификации органическими веществами можно, вероятно, видеть в том, что нитрификаторы начинают развиваться после того, как аммонифицирующая микрофлора разложит органические соединения азота и подготовит субстрат, т. е. органические вещества служат в данном случае регулирующим фактором метаболизма. Для объяснения подавляющего действия органических веществ был выдвинут ряд гипотез, исходивших из того, что внутри клетки осуществляется «нормальный» обмен органических веществ, сопровождающийся эндогенным дыханием (Вёйтеке, 1939). Естественно было предположить, что клетки нитрификаторов, как и других хемоавтотрофов, обладают особой проницаемостью. Это предположение оказалось неверным для хемоавтотрофов, в том числе и для нитрификаторов: меченые органические соединения, прежде всего аминокислоты, проникают в клетку и включаются в белки. При этом такие аминокислоты, которые являются нормальными конечными продуктами обмена органических кислот у хемоавтотрофов, — глутаминовая, аспарагиновая и серин, даже несколько усиливают рост *Nitrosomonas*, остальные аминокислоты, включаясь в состав белков, угнетают рост организма (Clark, Schmidt, 1966a, b; 1967).

Состав клеток *Nitrosomonas* исследовался неоднократно. Организм содержит обычный набор аминокислот, сахаров (Рубан, 1961), имеет содержание гуанина и цитозина в ДНК 54,3 мол %. Организм, по определениям Рубан, имеет повышенное содержание азота, причем с возрастом культуры соотношение это увеличивается в пользу углерода от C/N 3,17 до C/N 3,88, видимо, за счет использования азота в остаточной нитрификации.

В то время как большинство исследователей сомневалось в существовании других нитрификаторов кроме *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*, Ватсон за 10 лет выделил и описал, преимущественно морфологически, ряд новых форм, которые были физиологически совершенно сходны с *Nitrosomonas*, но отличались от него ультраструктурой.

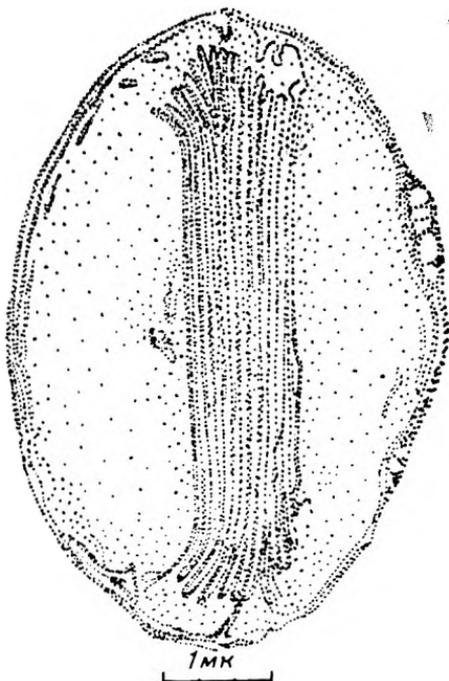
Nitrosocystis oceanus Watson 1962. Нитрифицирующий организм был накоплен в 5-литровых пробах воды из Атлантического океана, обогащенных добавлением аммония и фосфатов. В пробах началось экспоненциальное образование нитритов и был обнаружен ряд морфологически различных организмов, в том числе крупный протозоа-подобный организм. Накопительную культуру вели на среде состава: морская вода 1 л; в г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 13,2; CaCl_2 — 0,02; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; K_2HPO_4 — 0,114; микроэлементы в мг/л: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 2; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 20; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 100; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 1; $\text{Fe} + \text{ЭДТА}$ — 113.

В ферментерах с автоматической регулирующей рН исследуемый организм накапливался до концентрации 3×10^7 клеток/мл, а гетеротрофов было в 100 раз меньше. Выделение чистой культуры осуществляли методом разведений. Чистота проверялась микроскопически, что легко было сделать благодаря своеобразной морфологии и посевом на минеральную среду с добавлением различных органических веществ. Культура была признана чистой.

Клетки *Nitrosocystis oceanus* грамотрицательные, правильной круглой формы в чистой культуре, полиморфные в накопительной. Одиночные, парами или в тетрадах, размерами 1,8—2,2 мк, но бывают гигантские до 10 мк. Подвижные благодаря жгутику или пучку жгутиков, расположенному латерально на делящихся клетках. В жидкой среде клетки суспендированы в объеме, но, кроме того, образуют и зооглен. В накопительной культуре образуются цисты размером до 100 мк, в которых, кроме легко опознаваемых на ультратонких срезах клеток *N. oceanus*, имеются клетки посторонних бактерий. Колонии на агаре мелкие с характерной структурой ягоды ежевики.

Внутреннее строение клеток (рис. 39) характеризуется прежде всего наличием расположенного по диаметру пакета мембран, который может быть обнаружен в фазовом контрасте при заключении клеток в 30%-ную желатину. Пакет («тилакоид») состоит из 16 тройных мембран, плотно сложенных вместе в неповрежденной клетке, в лизированной клетке мембраны расходятся, и при этом видно, что каждая сложена из двух элементарных мембран. Элементарные мембраны несут на поверхности округлые частицы диаметром 80 Å. Мембраны *N. oceanus* закреплены на полюсах клетки, где обнаруживается структура, объединяющая мембраны. Плоскость деления клетки перпендикулярна плоскости пакета мембран, так что каждая сестринская клетка получает свою поло-

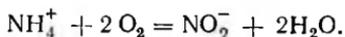
Рис. 39. Стросиие *Nitrosocystis oceanus*
Схематизировано по фотографии (Watson,
1965). Видна поперечная пачка мембран,
пересекающая клетку



вину пакета мембран. Несмотря на то, что мембраны пакета сходны с цитоплазматической мембраной, Ремзен и соавторы (Remsen et al., 1967) считают, что пакет мембран не представляет простой инвагинации цитоплазматической мембраны.

Физиологически *N. oceanus* во многом напоминает *Nitrosomonas*. Оптимум pH лежит между 7,5 и 7,8; ниже pH 7,0 роста не было, хотя клетки оставались живыми и при pH 5,5, но мгновенно погибали при pH 8,2. Время удвоения составляло 16 час. при 40° и 120 час. при 12°. Облигатный галофил, лизирующий в дистиллированной

воде. Чистая культура растет только в морской воде. Время удвоения постоянное, начиная с концентрации 1000 мМ аммония, при более низких концентрациях рост замедляется. Нитриты до концентрации 50—100 мМ не влияют на рост, начиная с 300 мМ — угнетают. На образование одной клетки затрачивается $2 \cdot 10^{-6}$ мкг-атомов азота, окисляемого в реакции



Органические вещества не используются.

В биохимическом отношении *N. oceanus* также очень мало отличается от *Nitrosomonas*. Ассимиляция углекислоты осуществляется через рибулозодифосфатный цикл. Окисление аммиака происходит с участием цитохромной цепи, содержащей цитохром *c*; у *N. oceanus* имеется большее, чем у *Nitrosomonas* количество связанной с частицами цитохромоксидазы и, кроме того, описанный для *Nitrosomonas* пигмент с максимумом 465 нм. Бесклеточные экстракты обоих организмов окисляют гидроксилламин, но не аммиак.

Nitrosococcus nitrosus (Winogradsky, 1892) Buchanan, 1925. Из американских почв Виноградский в 1891 г. выделил крупный неподвижный кокк диаметром 2 мк (Виноградский, 1904), названный им *Nitrosococcus*. Этот организм образовывал водянистые колонии на геле. Организм, соответствующий по описанию *Nitroso-*

coccus, был выделен Бонацци (Bonazzi, 1919), а позднее Сорiano (Soriano, 1963). Морфологически это крупные кокки 1—1,3 × 1—2,5 мк, размножающиеся делением пополам и образующие водянистые колонии на геле. Единственным отличием от *Nitrosocystis* служит форма колоний на геле, которая не является основанием для выделения самостоятельного рода.

Nitrosolobus multiformis (Watson et al., 1971) был выделен из почвы прибрежных районов. В фазово-контрастном микроскопе и на тотальных препаратах клетки *Nitrosolobus* выглядели так же, как клетки *Nitrosomonas*, но были перитрихами, обладая 1—20 жгутиками. Однако на срезах клетки никогда не были округлыми, а имели треугольную или четырехугольную форму. В центральной части клетки располагались 2—4 большие области, окруженные слоем из 5—20 меньших отсеков (рис. 40). Разделение клетки на отсеки возникало за счет инвагинации цитоплазматической мембраны вместе с внутренними слоями клеточной стенки, включая мукопептидный. Во всех отделениях клетки отмечались нити ДНК, но, кроме морфологической, существовала и физиологическая специализация, так как в периферических отсеках обнаруживалось обильное отложение гликогена в виде слабо окрашиваемых бесструктурных

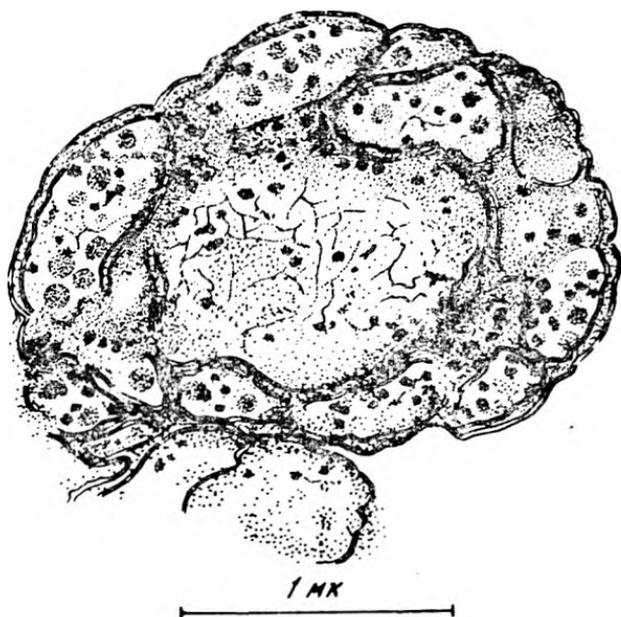


Рис. 40. Стрессные *Nitrosolobus multiformis*

Схематизировано по фотографии (Watson et al., 1971). Центральная часть с нитями ДНК и рибосомами окружена периферическими частями, в которых помимо ДНК и рибосом располагаются гранулы гликогена. В образовании перегородок участвует не только цитоплазматическая мембрана, но и внутренние слои клеточной стенки. Образуется многоклеточный или коэпоцитный организм

гранул. Клеточная стенка типичная для грамотрицательных бактерий.

Nitrosolobus рос в минеральной среде с 2,5—5 мМ аммония, в пределах рН 6—8,2 с оптимумом при рН 7,5. Окисление аммония происходило и при концентрации кислорода ниже 1,5 мг/л. Кроме аммония окислялась мочевины. Органические вещества не поддерживали роста, но ацетат в небольших количествах ассимилировался. У организма отсутствовала α -кетоглутаратдегидрогеназа. Набор цитохромов был полным и включал цитохромы *c*, *b*, *a* и обычный для нитрификаторов первой фазы пигмент, поглощавший при 465 нм. По мнению Сориапо, на которое ссылается Ватсон с соавторами, этот организм может быть сходен с *Nitrosocystis coccoides* (Watson et al., 1971). Мнение, что такие компартментализованные организмы составляют переход к эвкарриотам, не кажется обоснованным. Скорее это переход к многоклеточности на основе прокариотной структуры клетки.

Nitrosospira briensis Winogradsky et Winogradsky, 1933. Из жареных почв и почвы покрытого мхом луга во Франции Виноградский и Виноградская (1933) выделили на кремнекислом геле весьма медленно развивающуюся лептоспирру, которая растворяла карбонат кальция. Витки спирали расположены очень близко и под микроскопом организм выглядит как палочки различной длины. О выделении этого организма из почв Антарктиды сообщил Паллерони (Palleroni, 1950).

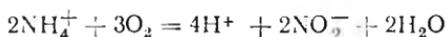
Nitrosospira briensis была вновь изолирована Ватсоном (Watson, 1971) из почвы о-ва Крит с помощью накопительной проточной культуры в рН-стате. Чистая культура выглядела как палочковидные клетки, но на самом деле представляла плотно свернутые спирали шириной диаметром 0,3—0,4 мк. Такая спираль имела размеры 1,5—2,5 × 0,8—1,0 мк. Все штаммы были исключительно подвижны. В отличие от других нитрификаторов у *Nitrosospira* не наблюдалось никаких внутренних мембранных структур. Физиологические свойства выделенной культуры были точно такие же, как у других нитрификаторов первой фазы.

При описании нитрифицирующих бактерий бросается в глаза их очевидная аналогия с метанооксиляющими организмами, которая заставляет думать, что между ними имеется неслучайное сходство. Обе группы организмов не только не используют органические вещества, но и подавляются ими. У обеих имеется развитая структура цитоплазматических мембран, сближающая их с фотосинтезирующими и почкующимися бактериями. Таких структур нет у литотрофных псевдомонад — водородных и тионовых бактерий. Наконец, окисление аммиака и метана требует на первом этапе окисления субстрата. Известно, что метанооксиляющие бактерии окисляют аммиак в нитрит, но не в нитрат. В накопительных культурах метанооксиляющих бактерий наблюдаются формы, подобные тем, которые описал Ватсон. Культуры нитрифицирующих бактерий

загрязняют те же метилотрофы, как *Nyphomicrobium*, которые развиваются в культурах метанокисляющих. Окисление аммиака конкурирует с окислением метана в ферментативных препаратах. Если добавить, что микробиологи до последнего времени не задавались вопросом о сходстве метилотрофов и нитрификаторов и не проверяли культуры на соответствующих субстратах, то можно допустить, что обе группы при более детальном исследовании сольются. По-видимому, в этом нужно искать объяснение озадачивающего положения, создавшегося в таксономии нитрификаторов: физиологически организмы чуть ли не идентичны, морфологически они резко различаются, а экологическая ниша, которую дает нитрификация, слишком мала, чтобы обеспечить процветание такого разнообразия форм. Морфологическая дивергенция нитрификаторов также маловероятна, как физиологическая конвергенция различных бактерий к нитрификации. Остается полагать, что дело в неполноте микробиологических исследований.

БИОХИМИЯ ОКИСЛЕНИЯ АММИАКА

Окисление аммиака *Nitrosomonas* протекает стехиометрически в соответствии с уравнением



Соответствие количественных отношений было установлено на отмытых суспензиях по кислороду, аммонии, нитриту (Meyerhof, 1917; Lees, 1954). Часто, однако, количество образовавшегося нитрита меньше того, которое следует по расчету из потребленного аммиака. Изучение нитрификации привело Мейергофа к выводу, что по своим основным характеристикам нитрификация эквивалентна дыхательному акту. Дальнейшая работа была посвящена расшифровке биохимических механизмов. Из чисто теоретических предпосылок Клуйвер и Донкер (Kluyver, Donker, 1926) предположили ступенчатую схему окисления аммиака с двухэлектронным переносом на каждой ступени:



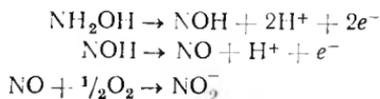
Гипотеза много лет спустя была подвергнута экспериментальной проверке сначала на суспензиях отмытых клеток, а затем на бесклеточных препаратах (см. обзор Wallace, Nicholas, 1969).

С целыми клетками удалось показать, что гидроксиламин является промежуточным продуктом (Lees, 1952). При концентрации от $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ М он окисляется интактными клетками с такой же скоростью, как аммиак, однако при более высоких концентрациях отравляет цитохромоксидазу (Hofman, Lees, 1953; Лозинов, Ермаченко, 1962). В присутствии гидразина клетки накапливают гидроксиламин в качестве продукта окисления аммиака (Lees, Simpson, 1954; Anderson, 1964, 1965b; Hofman, Lees, 1953).

Реакция окисления аммиака целыми клетками тормозится тиомочевинной и аллилтиомочевинной, которые не влияют на скорость окисления гидроксилламина (Quastel, Scholefield, 1951; Hofman, Lees, 1953). Разрушение клеток или повреждение их подавляет способность окислять аммиак, но не гидроксилламин. Таким образом, окисление аммиака в гидроксилламин представляет самостоятельное и чувствительное к внешним воздействиям звено в превращении субстрата. По расчетам Андерсена (Anderson, 1964) реакция образования гидроксилламина из аммиака протекает с затратой энергии, и, как можно рассчитать термодинамически, требует высокого окислительного потенциала. Исходя из действия тиомочевинны — ингибитора медьсодержащих ферментов, было предположено участие такого фермента на этом этапе превращения аммиака в гидроксилламин. Предполагалось, что этим ферментом может быть пероксидаза.

Пероксидазная активность *Nitrosomonas* очень высока (Рубан, 1961; Pokallus, Pramer, 1964). Фермент был выделен и очищен в 1500 раз (Anderson et al., 1968). Он имеет молекулярный вес 53 000, максимумы поглощения при 410, 524, 558 нм и широкий оптимум рН в области 7—8. С *n*-фенилендиаминном $K_m = 7 \cdot 10^{-6} M$ для H_2O_2 . При концентрации H_2O_2 0,21%, сульфата аммония 0,11% и рН 8,5 происходило химическое окисление аммиака до нитрита, но не гидроксилламина. Добавление пероксидазы из хрена или из *Nitrosomonas* не влияло на процесс. Это побудило Андерсена отказаться от своей гипотезы. Действительно, для окисления аммиака в гидроксилламин требуется более высокий окислительный потенциал, чем для превращения гидроксилламина в нитрит, на этом этапе возможна реакция окисгенирования, поскольку один из кислородов нитрита, как показано с O^{18} (Rees, Nason, 1966), происходит из молекулярного кислорода. Содержание цитохромоксидазы в клетках *Nitrosomonas* совершенно непропорционально содержанию цитохрома *c* по сравнению, например, с *Nitrobacter*, что может указывать на иной путь активации кислорода.

Промежуточные продукты окисления гидроксилламина нестабильны. Предполагаемый Клейверсом гипонитрит оказался заведомо исключенным (Lees, 1954; Anderson, 1964, 1965 a, b). Окисление нитрогидроксилламина NO_2NHOH , другого возможного продукта (Lees et al., 1962), протекало быстрее, но не через цитохром. Предполагается, что промежуточный продукт окисления между гидроксилламином и нитритом представлен радикалом нитроксила. В анаэробных условиях бесклеточные экстракты *Nitrosomonas* окисляли гидроксилламин в присутствии метиленовой сини как акцептера с образованием NO , N_2O , N_2 , но не нитрита. Таким образом, кислород — обязательный терминальный акцептор при образовании нитрита (Anderson, 1964):



Изучение окисления аммиака бесклеточными экстрактами было начато Имшенецким и Рубан (Имшенецкий, Рубан, 1952, 1954, а, б, в, 1956), которые обратили внимание на тщательность бактериологических критериев. Обнаруженная ими слабая способность экстрактов образовывать нитрит может быть приписана эндогенным процессам и действию пероксидазы. До сих пор получить окисление аммиака бесклеточными экстрактами не удалось. Окисление же гидроксилamina в бесклеточных препаратах изучено достаточно.

После первых работ (Имшенецкий, Рубан, 1956; Engel, Alexander, 1960) активные препараты гидроксилaminоксидазы были детально изучены (Falcone et al., 1962, 1963; Nicholas et al., 1962; Aleem, Lees, 1963; Hooper, Nason, 1965; Rees, 1968a; Nicholas, Jones, 1960).

Гидроксилaminоксидаза оказалась связанной с частицами; ее удалось разделить на гидроксилaminцитохром *c* редуктазу и цитохром *c* оксидазу. Исследование дифференциальных спектров показало присутствие переносчиков электрона в концентрации (в *нмолях/мг* белка): цитохром *c* 3,82; цитохром *b* 0,34; цитохром *a* 0,50; флавин 0,30. Участие флавинового компонента было подтверждено действием акрихина и снятием ингибирования при добавлении ФАД (Falkone et al., 1962, 1963). Спектры ЭПР показали, что в частицах при добавлении гидроксилamina происходит изменение состояния меди и, возможно, железа. Гидроксилaminцитохром *c* редуктаза была выделена и очищена. Она находится в частицах и очень стабильна, инактивируясь только при 70° в течение 15 мин. В качестве акцептора может быть использован цитохром *c* животных; один моль гидроксилamina восстанавливает два моля цитохрома *c*. Очищенный цитохром *c* *Nitrosomonas* имеет потенциал +0,245 в и медленно окисляется кислородом воздуха. Белковая часть этого цитохрома отличалась от цитохрома *c* животных (Левчук и др., 1967). Амнитал $2 \cdot 10^{-2}$ М подавлял окисление гидроксилamina на 43%, антимицин А $5 \cdot 10^{-3}$ М на 89%. Дальнейшая очистка препаратов, полученных после осмотического шока, позволила Рису (Rees, 1968 b) перевести гидроксилaminредуктазу в раствор и очистить в 60 раз. В очищенном препарате не обнаруживался флавиновый компонент. При окислении гидроксилamina обычно не более 70% его обнаруживается в нитрите.

Промежуточным продуктом окисления гидроксилamina может быть веселящий газ N_2O , который присутствует в атмосфере и образуется при денитрификации. Интактные клетки *Nitrosomonas* при высоких концентрациях гидроксилamina превращают в N_2O до 90% окисляемого азота. Образование N_2O стимулируется выдерживанием клеток на холоду и высокой концентрацией фосфата в среде. При более мягких условиях *Nitrosomonas* образует небольшое количество N_2O (Yoshida, Alexander, 1970).

Электронпереносящая цепь *Nitrosomonas* была подвергнута многократному исследованию, причем обнаружались некоторые различия, обусловленные использованием либо разных штаммов, либо методов. Так, цитохром *b* не был найден Ермаченко (1967), но обнаружен другими авторами (Aleem, Lees, 1963; Falcone et al., 1962, 1963; Hooper, Nason, 1965). Вместо цитохрома *a* (Rees, Nason, 1966) был найден цитохром *o*, однако другие авторы нашли цитохром *a* в количестве, непропорционально низком по отношению к цитохрому *c* (Ермаченко, 1967). Ермаченко объясняет это аутоокисляемостью цитохрома *c* и высокой пероксидазной активностью. Впоследствии и Рис (Rees, 1968a, b) нашел, что цитохром *a* имеется у его штамма *Nitrosomonas*, и определил молекулярный вес цитохромоксидазы 128 000.

Поскольку окислительно-восстановительный потенциал промежуточных продуктов окисления аммиака значительно выше потенциала НАД/НАДН, *Nitrosomonas* обладает системой обратного переноса электрона, зависящей от поступления энергии (Aleem et al., 1963; Aleem, 1965, 1966). Указанные авторы наблюдали за окислением восстановленного цитохрома *c* животных и одновременным восстановлением НАД. Образование последнего было подтверждено с использованием лактатдегидрогеназы как ловушки. Участие флавина было прослежено по спектральным изменениям и действительно ингибиторов. Разобидители окислительного фосфорилирования подавляли восстановление НАД.

Окислительное фосфорилирование с отношением P/O=0,20 было обнаружено у *Nitrosomonas* при окислении гидроксилламина (Ramiah, Nicholas, 1964) в частицах, приготовленных замораживанием и оттаиванием. При окислении НАДН окислительное фосфорилирование не было обнаружено (Hooper, 1969). У *Nitrosomonas* детально была исследована глутаматдегидрогеназа — НАДФ-специфический фермент, активность которого была в 80 раз выше того, что требовалось для синтеза азотистых соединений клетки. Возможно, что у *Nitrosomonas* глутаматдегидрогеназа играет специфическую роль в связывании аммиака (Hooper et al., 1967; Wallace, Nicholas, 1969).

В итоге можно представить следующую схему биохимических механизмов *Nitrosomonas*. Активация аммония происходит при участии медь-содержащих ферментов с затратой энергии и образованием гидроксилламина. Гидроксилламин является истинным энергетическим субстратом и окисляется при участии цепи переноса электрона, включающей большие количества цитохрома *c*. Окисление цитохрома осуществляется цитохромоксидазой, но возможны различия у разных штаммов, в частности участие пероксидазной системы. Имеется система окислительного фосфорилирования. Синтез НАДН осуществляется с помощью системы обратного переноса электрона. Ассимиляция углекислоты идет через фосфорилированные продукты рибулозодифосфатного цикла, синтез мономеров —

через цикл трикарбоновых кислот, который, как и у многих облигатных хемоавтотрофов, не замкнут. Особенности регуляции обмена мономеров обуславливают токсическое действие ряда органических веществ на *Nitrosomonas*.

ВТОРАЯ ФАЗА НИТРИФИКАЦИИ

Подробно описан и изучен единственный возбудитель второй фазы нитрификации — *Nitrobacter winogradskyi*.

Nitrobacter представляет собой исключительный организм в том отношении, что он для своего развития использует один-единственный субстрат, который к тому же не встречается в природе в сколько-нибудь заметных количествах. Энергию для своей жизнедеятельности *Nitrobacter* получает от окисления нитрита. Вещество это нестойко и образуется как результат окисления аммиака возбудителем первой фазы нитрификации и в многочисленных реакциях восстановления нитрата различными организмами. Таким образом, ничтожные концентрации нитрита в природе, обеспечиваемые окислением аммиака и восстановлением нитратов, дают возможность для существования строго специализированного вида микроорганизмов.

Открытие и выделение в чистую культуру *Nitrobacter* последовало за выделением *Nitrosomonas*. Обнаружив, что *Nitrosomonas* в качестве единственного продукта образует нитрит, Виноградский предположил, что окисление нитрита осуществляется организмом того же физиологического типа, что и возбудитель первой фазы нитрификации. Предположение оказалось верным, и метод элективных культур быстро привел к выделению *Nitrobacter*.

Виноградский в 1892 г. описывал *Nitrobacter* следующим образом: форма клеток всегда удлинённая, грушевидная, довольно правильных очертаний, более узкий конец часто загнут в виде клювика (Виноградский, 1952). Далее Виноградский отмечал, что в центральной части клеток *Nitrobacter* имеется зерно, которое красится иначе, чем периферическая часть. В отличие от возбудителя первой фазы, возбудители второй фазы были всегда очень сходны морфологически, вне зависимости от места выделения. Вследствие весьма мелких размеров *Nitrobacter* и того, что он плохо поддается окраске, организм этот мало исследовался морфологически. Единственное отличие, которое нашел у своего штамма Нельсон (Nelson, 1931), заключалось в подвижности благодаря наличию одного жгутика, что послужило основанием для создания двух видов: *N. winogradskyi* (неподвижный) и *N. agilis* (подвижный).

Более подробное исследование показало, что этих различий не существует (Zavarzin, Legunkova, 1959) и все имеющиеся штаммы относятся к одному и тому же виду, который является представителем почкующихся бактерий. В самом деле, как может происходить размножение клиновидной клетки? Простое деление пеплам дол-

жно давать маленькую и большую клетки, а этого в культуре не наблюдается. Продольное деление исключено для бактерий. Сопоставление наблюдений за живыми клетками с электронной микроскопией позволило установить наличие цикла развития у этого организма (Заварзин, 1958в).

Клетки *Nitrobacter* по форме напоминают куриное яйцо (рис. 41). Можно различить узкий и широкий концы клеток. На узком конце появляется выпячивание, придающее клетке удлиненную форму. На этой стадии *Nitrobacter* можно описать как клиновидную палочку. Внутри вытянутого конца клетки имеется плотное тело, которое увеличивается в размерах и выпячивает оболочку так, что появляется перетяжка. Эта форма наиболее характерна для *Nitrobacter*, и по ней его легко обнаружить в смешанных культурах. Увеличиваясь в размерах, дочерняя клетка иногда неравномерно растягивает оболочку, и тогда клетки бобовидно сгибаются. Когда дочерняя клетка достигает размеров материнской, она отделяется. В момент отделения клетка энергично раскачивается, растягивая оболочку. Отделившиеся клетки имеют округлую форму, у них нельзя отличить узкий и широкий концы. Эти клетки подвижны благо-



Рис. 41. *Nitrobacter winogradskyi*

Световой микроскоп, окраска фуксином Циля. Характерная для почкующихся бактерий грушевидная форма и неравномерное окрашивание. Темноокрашенные участки соответствуют местам расположения мембран на рис. 42. Клетки на разных стадиях размножения

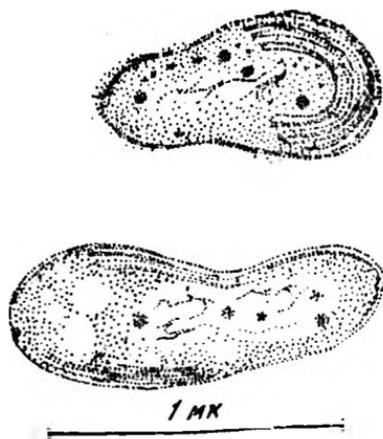


Рис. 42. Строение *Nitrobacter*
 Видны чашевидные пачки мембран
 в расширенной части клеток, нити
 ДНК, пустые места соответствуют
 отложению полиоксимасляной кис-
 лоты

даря одному длинному жгутику, прикрепленному латерально, по движению их не быстро и напоминает движение роющих насекомых. Сравнение *N. winogradski*, выделенного нами, с *N. agilis* (штамм Нельсона) не обнаружило никаких различий между штаммами по морфологии.

Цикл развития *Nitrobacter*, включающий чередование подвижных и неподвижных стадий, причем подвижная дочерняя клетка возникает на одном из полюсов по длинной оси материнской клетки, может быть characterized как почкование. Аналогичный способ размножения был затем обнаружен у многих других бактерий.

Изучение тонкого строения *Nitrobacter* (рис. 42), проведенное Мурреем (Murray, Watson, 1965), показало, что свесобразная форма клетки *Nitrobacter* связана с наличием чашевидной пачки мембран, которая располагается в широкой части клетки и просматривается как уплотнение в фазово-контрастном микроскопе (см. рис. 41). Ядерная область находится внутри чашевидной пачки мембран и имеет характерное для бактерий строение. Нам удавалось окрасить ее ацетокармином и наблюдать под световым микроскопом. Клеточная стенка *Nitrobacter* имеет характерное для грамотрицательных бактерий строение (Tsien et al., 1968, van Gool et al., 1969).

Сопоставление электрономикроскопических данных с фотографиями и описанием Виноградского полностью подтвердило точность наблюдений, сделанных Виноградским на заре микробиологии.

Стадии цикла развития *Nitrobacter* и фазы развития культуры обнаруживают некоторое соответствие. В фазе задержки роста, длящейся два-три дня, обнаруживаются клетки лишь посевного материала. К концу ее и в течение всей фазы логарифмического роста в культуре можно наблюдать подвижные клетки, которых несколько больше при аэрации культуры. С переходом к стационарной фазе появляются грушевидные клетки, не закончившие деления.

Как правило, клетки *Nitrobacter* не образуют никаких агрега-

тов, что связано с их способом размножения. В старых культурах на поверхности среды иногда обнаруживаются тонкие голубоватые пленочки, где клетки *Nitrobacter* располагаются в один слой вертикально. Такие пленки кажутся состоящими из кокков. Другой тип скопления клеток *Nitrobacter* наблюдается при их помещении в среду с органическими веществами. Если в пробирку со скошенным мясо-пептонным или картофельным агаром налить жидкую культуру *Nitrobacter*, то на следующий день клетки организма будут заключены в мощные слизистые комки.

Формы, наблюдаемые при нормальном цикле развития *Nitrobacter* и при помещении клеток в необычные условия, достаточно разнообразны, чтобы объяснить различия в описании организма разными авторами и проявить большую осторожность в описании новых видов, чем *N. winogradski*.

Выделение *Nitrobacter* лучше всего осуществлять методом рассева капель или разведения на жидкой среде. Ряд авторов описали выделение *Nitrobacter* на плотных средах, кремнекислом геле или нитритном агаре по Бейеринку. Наши штаммы на агаре вообще не росли, а при росте на кремнекислом геле вместо компактных колоний появлялись бурые диффузные образования, растекавшиеся по поверхности. Окраска прямо на геле показала, что клетки *Nitrobacter* располагаются в один слой и плотно врастают в гель, как это было описано Виноградским для «*Bactoderma alba*».

Культивирование *Nitrobacter* обычно осуществляют на жидкой минеральной среде с достаточно хорошей аэрацией. Нитрит представляет собой сильный яд, и *Nitrobacter* переносит невысокие концентрации его в среде, хотя лабораторные расы сравнительно более устойчивы. При выделении культуры не следует превышать концентрацию нитрита натрия более 1 г/л, при концентрациях порядка 0,5 г/л нитрита натрия следует учитывать возможность использования его не нитрифицирующей микрофлорой. Поскольку ядовита недиссоциированная молекула азотистой кислоты, *Nitrobacter* плохо развивается даже при незначительном подкислении среды. В щелочной области развитие *Nitrobacter* в природе ограничивается недиссоциированным аммиаком, который является регулирующим фактором в его метаболизме с *Nitrosomonas*. Таким образом, оптимальные значения pH, хотя и различаются для разных штаммов, лежат в очень узкой области нейтральных значений. Оптимальная концентрация нитрита для окисления суспензией клеток различается для разных штаммов: *N. agilis* потреблял кислород с наибольшей скоростью при концентрации $3-5 \cdot 10^{-2}$ M NO_2^- , штамм Лиса, как и штамм Мейергофа, — при $4 \cdot 10^{-3}$ M, а штамм Энгеля — при $14 \cdot 10^{-3}$ M. Батт и Лис (Butt, Lees, 1964) показали, что токсичность нитрита зависит от концентрации кислорода и возрастает со снижением давления кислорода. Более 0,5% нитрита натрия уже вызывает заметную задержку в развитии *Nitrobacter*, которая отсутствует при концентрации ниже 0,05%. Отсутствие нитрита в среде также подавляет развитие

организма, причем для реактивации необходима углекислота. В отсутствие углекислоты *Nitrobacter* окисляет нитрит с постоянной скоростью в течение длительного времени, показывая типичный пример «холостого» окисления.

Увеличение концентрации кислорода мало влияет на скорость нитрификации в суспензиях; еще Мейергоф (Meyerhof, 1916a) нашел, что в атмосфере чистого кислорода нитрификация тормозится только на 11%. Образование нитратов в почве шло с одинаковой скоростью при 20% O₂ и при 11% O₂, снижаясь наполовину лишь при концентрации 2% O₂.

Кинетика нитрификации тщательно исследована (Laudelout, van Ticheln, 1960; van Gool, Laudelout, 1967).

Минеральное питание *Nitrobacter* специально исследовалось рядом авторов (Meiklejohn, 1952, 1953; Kaufmann, Voquel, 1953; Bömeke, 1949; Aleem, Alexander, 1960; Finstein, Delwiche, 1965).

Необходимыми компонентами среды для *Nitrobacter* помимо нитрита являются магний и фосфор (Bömeke, 1949). Изменение концентрации фосфата в среде значительно меняет ход развития культуры. Необходимость железа для *Nitrobacter* была отмечена уже Мейергофом (Meyerhof, 1917), который показал, что *Nitrobacter*, выращенный на среде, где железо присутствовало лишь в виде следов, аккумулировал его в клетках. Майклджен нашла (Meiklejohn, 1953), что железо, начиная с концентрации 0,3 мг/л, усиливает нитрификацию, а оптимальное содержание железа весьма велико для бактерий: 6 мг/л. Такие ингибиторы, как *o*-фенантролин, подавляют нитрификацию.

Кроме железа, *Nitrobacter* нуждается в молибдене, причем отсутствие молибдена в среде может значительно подавлять рост. Минимальная стимулирующая концентрация молибдена составляет 10⁻⁷ М по нашим данным (Заварзин, 1958б) и 10⁻⁹ М для другого штамма (Finstein, Delwiche, 1965). Тормозящее действие Мо обнаруживалось начиная с концентрации 10⁻⁶ М для нашего штамма и лишь 10⁻³ М для штамма Финштейна и Делвича. Учитывая необычайно низкую концентрацию клеток в развивающейся культуре *Nitrobacter*, концентрация молибдена в среде в пересчете на клетку примерно соответствует той, которая наблюдалась для азотобактера. В наших опытах молибден можно было заменить вольфрамом, причем действие микроэлементов сильно зависело от рН среды. При совместном присутствии вольфрама и молибдена наблюдалось ингибирование нитрификации. Оба элемента оказывали стимулирующее действие на нитрификацию только на фоне достаточных концентраций железа. Хотя молибден включается в ряд систем, связанных с обменом неорганического азота, оставалось неясным, принимает ли он прямое участие в окислении нитрита. Финштейн (Finstein, Delwiche, 1965), исследовав распределение Мо⁹⁹ при выделении нитритоксилирующей системы, показал, что молибден не включается в нее, участвуя в боковых цепях переноса электрона.

При развитии культуры *N. winogradski* изменяется активность ферментных систем. Максимальная удельная скорость фиксации углекислоты наблюдается в период экспоненциального роста, а затем она снижается в 7 раз. Скорость образования нитрита также снижается до 40% первоначальной, но максимум располагается несколько позже, чем максимум удельной фиксации углекислоты. Еще дальше располагается максимум накопления полиоксимасляной кислоты, которая быстро начинает использоваться, когда нитрит в среде исчерпан. Эффективность использования свободной энергии, определенная двумя методами: по соотношению нитрит окисленный/углекислота ассимилированная и прямой калориметрией, закономерно падает по мере развития культуры. В 72-часовой культуре эффективность составляла 30—40%, в 96-часовой 15—19% (van Gool et al., 1971). Эта картина очень сходна с той, которая наблюдается для водородных бактерий (см. главу 2).

БИОХИМИЯ ОКИСЛЕНИЯ НИТРИТА

Первую работу по выяснению механизма нитрификации выполнил Мейергоф (Meuерhof, 1916a, b, 1917). Задолго до того, как были сформулированы принципы сравнительной биохимии, он поставил перед собой задачу сравнить нитрификацию с дыханием высших организмов. Мейергоф определял действие ингибиторов клеточного дыхания на потребление кислорода суспензией *Nitrobacter* в аппарате Варбурга и нашел, что уретаны и цианистый калий подавляют нитрификацию так же, как дыхание клеток высших организмов. Это позволило сделать вывод, употребляя современные термины, что механизм переноса электрона в обоих случаях существенно сходен.

В 1957 г. Лис и Симпсон (Lees, Simpson, 1957) показали, что, в присутствии нитрита в суспензии клеток *Nitrobacter* происходит восстановление цитохромов с максимумами при 551 и 580 нм. Эти данные подтверждены впоследствии многими авторами. Сам по себе факт восстановления цитохрома еще не означает его непосредственного участия в окислении вещества, восстановление может быть обусловлено побочными реакциями, — но Лис и Симпсон нашли, что нитрификация и восстановление цитохрома подавляются в одинаковой степени и что скорость нитрификации пропорциональна количеству оставшегося цитохрома. Следовательно, нитрификация, так же как у высших организмов дыхание, осуществлялась через цитохромную цепь.

Клетки *Nitrobacter* необычайно богаты цитохромами типа *c* и *a*, причем *Nitrobacter* является одним из немногих организмов с весьма высоким содержанием цитохрома *a* — цитохромоксидазы.

Батт и Лис (Butt, Lees, 1958) выделили цитохром с максимумом 551 нм из разрушенных клеток *Nitrobacter* и обнаружили, что он

очень похож на цитохром *c* животных, причем эти цитохромы были взаимозаменяемы. Цитохром *a* оставался связанным с частицами.

Окисление нитрита бесклеточными препаратами было получено Алимом и Александером (Aleem, Alexander, 1958), которые показали, что вся нитрификационная активность обусловлена фракцией частиц. Подробнее частицы нитритоксидазы были изучены Алимом и Нэзоном (Aleem, Nason, 1963); частицы содержали цитохромы *c* и *a*₁. Окисление нитрата без цитохромоксидазы (цитохрома *a*) не шло. Цитохромы частиц неэнзиматически восстанавливались Fe²⁺, которое стимулировало окисление нитрита. Константа Михаэлиса для нитрита была довольно высока, подавление не наступало даже при 8·10⁻² M нитрита. В качестве искусственных акцепторов электрона можно было использовать индофенол, феррицианид, менадион, когда донорами электрона были нитрит или НАДН. Нитритоксидаза чувствительна к цианиду, азиду, высоким концентрациям антимицина А, нуждается в железе, но не в молибдене или вольфраме и не зависит от флавина. Таким образом, перенос электрона в частицах происходил по следующему пути:



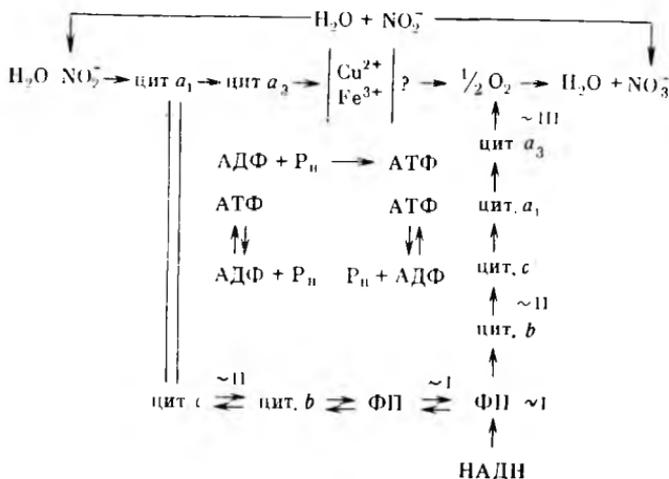
Окисление нитрита сочеталось с фосфорилированием, которое в целых клетках идет, однако, очень слабо (Butt, Lees, 1960b). Фосфорилирование в препаратах частиц при окислении нитрита не разобщалось 2,4-динитрофенолом, тироксином, дикумаролом (Aleem, Nason, 1960; Malavolta et al., 1960).

Потенциал системы нитрит/нитрат обеспечивает восстановление переносчиков электрона только со сравнительно высоким потенциалом. Между тем для своей жизнедеятельности клетки нуждаются в восстановителях. Поэтому *Nitrobacter* послужил моделью для изучения обратного переноса электрона. Алим (Aleem, 1968) удалось получить из *N. agilis* частицы, которые окисляли нитрит с фосфорилированием при P/O=1. Окисление феррицианида и аскорбата давало такие же значения P/O, а окисление экзогенного НАДН шло с P/O=2, что необычайно высоко для бактериальных систем.

Суспензия клеток *Nitrobacter* восстанавливает нитрат в анаэробных условиях. Организм обладает активными нитрат-нитрит-, гидроксилламинредуктазами; донором электрона при этом могут служить НАДН или НАДФН. Процесс стимулируется флавинами (Wallace, Nicholas, 1968). В аэробных условиях цитохром *c* также может служить донором электрона при восстановлении нитрата (Straat, Nason, 1965). Предполагается, что у *Nitrobacter* восстановление соединений азота служит для ассимиляционного пути. Это подтверждается включением N¹⁵ из нитрата в органические соединения клетки.

Облигатно хемосинтетический обмен *Nitrobacter* включает энзиматическое окисление нитрита в нитрат за счет кислорода воды и дегидрогенизацию гидратированной формы нитрита с последующим образованием воды. Алим (Alleem, 1968) полагает, что пара нитрит/нитрат не может по своему потенциалу прямо восстанавливать цитохром *c*, а его восстановление идет путем обратного переноса. Нитрит отдает электроны, по его мнению, на уровне цитохрома *a*₁: $\Delta F_{\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-} = -17,8 \text{ ккал}$; $\Delta F_{\text{АТФ}} = -7 \text{ ккал}$; $\Delta F_{\text{цит. а} \rightarrow \text{O}_2} = -14,6 \text{ ккал}$.

На основании полученных данных Алим дает следующую схему энергетического обмена *Nitrobacter*:



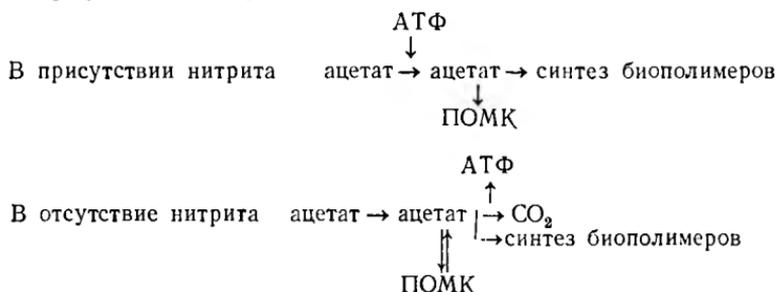
Не следует, однако, думать, что окисление нитрита, обратный перенос электрона и окисление НАДН с восстановлением нитрата осуществляется через разные цитохромы: эта одна и та же цепь, равновесные состояния компонентов которой сдвигаются под влиянием экзогенных доноров и акцепторов электрона.

Полученные данные позволяют думать, что у *Nitrobacter* существует самостоятельная цепь переноса электрона для восстановительных целей, конечным продуктом которой является НАДН. Эта цепь может включать цитохром *b*, флавины, молибден. В связи с этим интересно отметить, что *Nitrobacter* обладает хорошо выраженной нитратредуктазной активностью и восстанавливает нитрат в нитрит в анаэробных условиях за счет эндогенных доноров электрона.

Несмотря на то, что в бесклеточных экстрактах обнаружена активность ряда ферментов цикла трикарбоновых кислот (Smith, Noage, 1968), у целых клеток органические кислоты подавляют эндогенное восстановление искусственных акцепторов электрона. Исключение составляют такие органические вещества, как бензаль-

дегид, ксантин, гипоксантин и органические кислоты — пировиноградная и муравьиная. Окисление муравьиной кислоты было довольно подробно изучено у *Nitrobacter* (van Gool, Laudelout, 1966b; Silver, 1960), но организм этот не растет на формате в культуре. Смит и Хоар (Smith, Hoare, 1968) исследовали использование ацетата *Nitrobacter*. В присутствии нитрита ацетат в концентрации 1—10 мМ не стимулировал и не угнетал рост и окисление нитрита. Радиоактивный ацетат, однако, ассимилировался, причем до 30% углерода клетки поступало из ацетата во все основные аминокислоты клетки. После использования нитрита в культурах наблюдалось некоторое увеличение количества белка и полиоксималяной кислоты. В отсутствие нитрита включение ацетата также происходило, причем эндогенное дыхание усиливалось добавлением ацетата с выделением меченой углекислоты. Добавление нитрита останавливало выделение углекислоты. На среде с ацетатом 5 мМ и 0,05% (вес/объем) казаминовых кислот *Nitrobacter* медленно рос в течение 7 пересевов. Таким образом, авторам удалось показать способность *Nitrobacter* к медленному гетеротрофному росту. Соотношение скоростей окисления нитрита, формата, ацетата и эндогенного дыхания 215:39:33:22.

В экстрактах *Nitrobacter* были обнаружены все ферменты цикла трикарбоновых кислот и НАДН-оксидаза, связанная с фракцией частиц. Активность сукцинатдегидрогеназы была очень низкой и ее удалось показать только качественно. Уровень карбоксидсмутазы в присутствии ацетата снижался на 50%. Смит и Хоар полагают, что полученные ими результаты позволяют отнести *Nitrobacter* к группе факультативных автотрофов. Вместе с тем их результаты явно показывают, что включение ацетата имеет прямое отношение к обмену запасного вещества — полимера β-оксималяной кислоты (ПОМК), которое служит резервом углерода. Это можно иллюстрировать следующими схемами:



Изучение ассимиляции органических соединений у 20 штаммов *Nitrobacter* привело к заключению, что организмы заметно различаются. На среде Смита и Хоара с ацетатом не росли гетеротрофно 6 штаммов (Watson, Waterbury, 1971). Штамм *N. winogradskyi*, выделенный Энгелем, быстро включал меченый ацетат в полиок-

сималяную кислоту, но только за счет энергии окисления нитрита. Ни ацетат, ни оксипутират, ни пируват не окислялись и, следовательно, не могли служить источниками энергии. Использование формиата, хотя и обеспечивает небольшую фиксацию углекислоты, но идет с очень низкой эффективностью. Таким образом, гетеротрофный обмен у *Nitrobacter* может иметь значение лишь при использовании внутриклеточных полимеров (van Gool. et al., 1971). Обмен *Nitrobacter* представлен на схеме 15.

К возбудителям второй фазы нитрификации, кроме *Nitrobacter*, относили также *Nitrocystis* (Н. Winogradsky, 1937), отличающийся образованием зооглей, однако, по нашему мнению, этот признак совершенно недостаточен, так как *Nitrobacter* в неблагоприятных условиях также образует зооглей.

Из морской воды были выделены два возбудителя второй фазы нитрификации, которые морфологически резко отличались от *Nitrobacter*, но были совершенно сходны с ним физиологически (Watson, Waterbury, 1971). Вместе с тем эти организмы очень напоминают те,

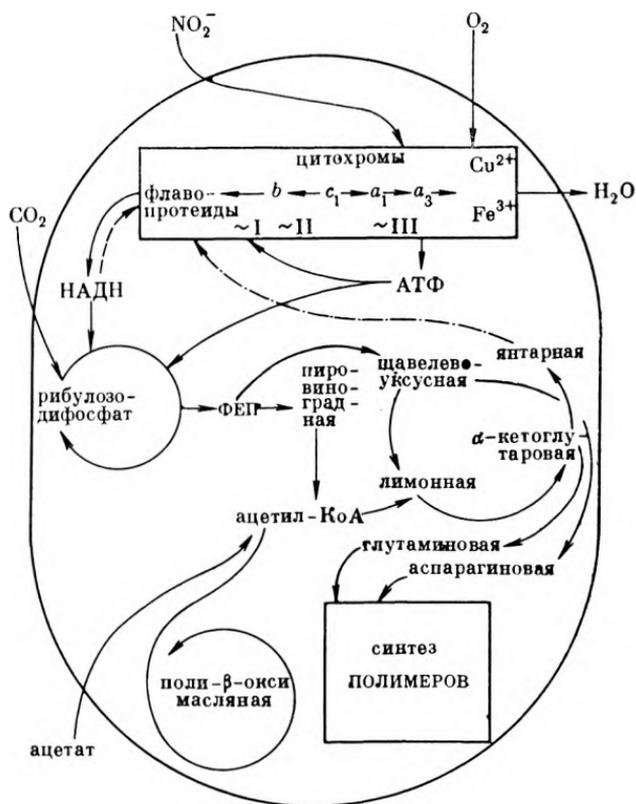


Схема 15. Обмен *Nitrobacter*

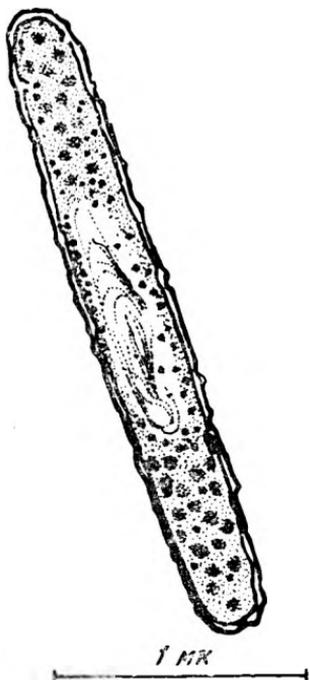


Рис. 43. Строение *Nitrospina gracilis*

Схематизировано по фотографии (Watson, 1971). Центральная часть занята ядерной областью, в цитоплазме расположены гранулы гликогена и рибосомы

вещества не использует. Грамотрицательный. Имеет один-два жгутика. ГЦ 61,2 мол%. Запасные вещества — гликоген и полиоксимасляная кислота (рис. 44).

которые встречаются в накопительных культурах метанооксиляющих бактерий. *Nitrobacter* — доминирующая форма в море, новые нитрификаторы были найдены лишь в 1% проб.

Nitrospina gracilis Watson et Waterbury, 1971 — прямая тонкая палочка 0,3—0,4 × 2,7—6,5 мк, иногда образует сферические формы. Грамотрицательная, неподвижная (рис. 43). Клетки имеют цитохром *c*. ГЦ 57,7 мол%. Облигатный хемоавтотроф, окисляющий нитрит в нитрат, органические вещества не требуются и, по-видимому, не усваиваются. Растет только в морской воде при pH 7,5—8,0. Время удвоения — около двух суток. В культуре обычно прикрепляется к стенкам. В отличие от других нитрификаторов нет развитой системы мембран.

Nitrococcus mobilis Watson et Waterbury, 1971. Клетки округлые 1,5 мк в диаметре, размножается делением. Богаты цитохромами *c* и *a*, так что суспензия красноватого цвета. Цитоплазматическая мембрана дает трубчатые выросты, случайно расположенные внутри клетки. Облигатный хемоавтотроф, окисляющий нитрит в нитрат. Фиксирует CO₂, органические

НИТРИФИКАЦИЯ В КРУГОВОРОТЕ АЗОТА

В конце прошлого века нитрификацию рассматривали как одно из условий плодородия почвы в связи с существовавшим тогда убеждением, что нитраты усваиваются лучше, чем аммонийный азот. Теперь взгляды изменились, и нитрификация рассматривается не столько как условие, сколько как показатель плодородия. В настоящее время общепризнано, что аммонийный азот усваивается растениями и микроорганизмами лучше, чем азот нитратов, и, следовательно, вопрос сводится к тому, какая форма минерального азота лучше сохраняется в почве. На этот вопрос нельзя дать абсолютного

Рис. 44. Строение *Nitrococcus mobilis*

Схематизировано по фотографии (Watson, 1971). В цитоплазме беспорядочно располагаются трубчатые выросты цитоплазматической мембраны, на обращенной к цитоплазме стороне которых имеются многочисленные мелкие частицы. Нити ДНК и цитоплазма с рибосомами располагаются между трубчатыми выростами. В цитоплазме крупные гранулы, часто гексагональной формы, обнаруженные у многих литотрофов



ответа: в зависимости от характеристик почвы в ней лучше сохраняется та или иная форма.

Нитраты в почве служат источником разных процессов, ведущих к потере азота. В анаэробных условиях в почве нитраты подвергаются денитрификации с образованием свободного азота и некоторых его окислов; аммиак, по имеющимся представлениям, в свободный азот не превращается. Нитраты могут подвергаться денитрификации и в аэробных условиях, особенно при пониженном давлении кислорода, которое всегда может создаваться локально в почве.

Сам процесс нитрификации связан с некоторыми потерями азота из почвы, порядка 10%. Эти данные находятся в противоречии с краткосрочными опытами с чистыми культурами, где баланс по азоту сходится с большой точностью. Однако в длительных опытах потери азота отмечаются. Они могут быть обусловлены потерями улетучивающегося азота аммиака или азота промежуточных продуктов нитрификации, накапливающихся при неблагоприятных условиях. Потери азота при нитрификации могут представлять значительную часть минерального азота.

Аммонийные соли также могут теряться почвой. В щелочных почвах и почвах, содержащих карбонаты, значительная часть аммиака может улетучиваться вследствие обменной реакции:



Разложение карбоната аммония или мочевины с образованием аммиака при условии достаточно высоких значений pH приводит к

улетучиванию аммиака. При пониженном рН, когда равновесие сдвинуто в сторону образования аммонийного иона, потери от улетучивания аммиака снижаются.

Таким образом, значение нитрификации в круговороте минерального азота представляется сейчас несколько иным, чем в начале века.

По современным представлениям нитрификаторы могут использовать только тот аммонийный азот, который не успевают потребить разнообразные почвенные организмы в ассимиляторных процессах. Скорость ассимиляторных процессов обуславливается прежде всего количеством доступного углерода. Поэтому возможность нитрификации определяется соотношением углерод/азот в поступающих в почву веществах. Избыток углерода определяет преимущественное развитие процессов ассимиляции, когда имеющийся азот используется для построения тела различными организмами. Нитрификаторы дожидаются своей очереди, когда разложению подвергнутся тела этих организмов с высоким содержанием азота.

Имеющиеся наблюдения над круговоротом азота в почве хорошо согласуются с особенностями физиологии нитрифицирующих бактерий: в щелочной среде аммиак угнетает развитие нитробактера и поэтому проходит только первая фаза нитрификации, в результате в очень щелочных почвах наблюдается накопление нитритов. Напротив, в кислых почвах недиссоциированная азотистая кислота оказывается токсичной для нитрификаторов и их развитие останавливается. Своеобразное отношение нитрификаторов к органическим веществам также можно расценивать как фактор, регулирующий их метабиотические отношения; нитрификация является процессом, конкурирующим за аммиак с ассимиляцией азотистых соединений. Пока в почве есть свободные органические соединения, ассимиляция азота возможна. Одновременно идет усиленное поглощение кислорода гетеротрофной микрофлорой. Нитрификаторы оказываются в невыгодном положении. После того как органические вещества использованы и деятельность гетеротрофной микрофлоры вышла на стационарный режим, начинается использование аммиака. Разложение органических азотистых соединений сопровождается обычно подщелачиванием среды, как например, при разложении мочевины. Свободный аммиак останавливает деятельность нитробактера, и только после того как избыток аммиака окислился и реакция среды снизилась, вступает в действие вторая фаза нитрификации. Этими обстоятельствами можно объяснить те сравнительно редкие случаи, когда процесс минерализации органического азота протекает несбалансированно.

Из изложенного очевидно, что нитрификация идет наиболее интенсивно, когда в почве имеется избыток азотистых соединений и может создаваться их запас, когда реакция среды близка к нейтральной, когда имеется достаточная аэрация. Эти же условия благоприятны для роста большинства растений и поэтому интенсивность нитрификации, вне зависимости от того, в какой форме

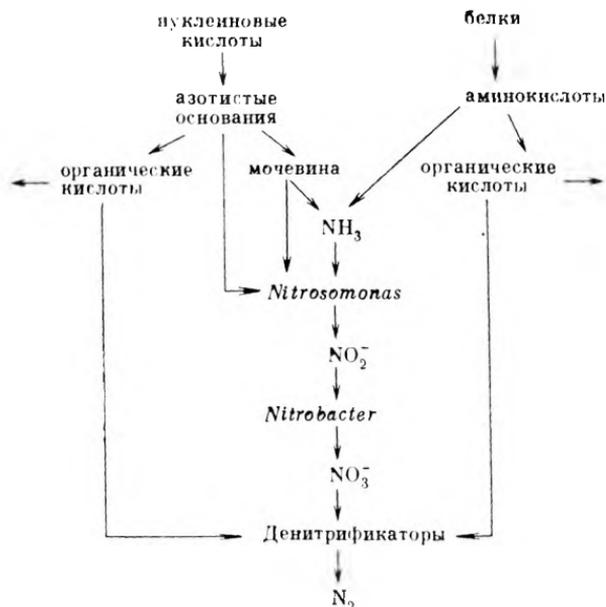


Схема 16. Участие нитрификаторов в обмене азота в почве

азот используется для ассимиляции, указывает на благоприятное состояние почвы. В некоторых условиях нитрификация оказывается нежелательной. Относительно агрохимических рекомендаций можно сослаться на детальный обзор Хармзена и Коленбрандера (Harmsen, Kolenbrander, 1965).

Круговорот азота в почве можно суммировать схемой 16, где более подробно указаны участки цикла, осуществляемые нитрификаторами.

ЛИТЕРАТУРА

- Виноградский С. Н. 1904. Нитрификация. — В кн.: Микробиология почвы. М., Изд-во АН СССР, 1952.
- Виноградский С. Н. 1952. Микробиология почвы. М., Изд-во АН СССР.
- Виноградский С. Н., Виноградская Е. Н. 1933. Новые исследования над микроорганизмами нитрификации. — В кн.: Микробиология почвы. М., Изд-во АН СССР, 1952.
- Гутина В. Н. 1963. Физиология нитрифицирующих бактерий. М., Изд-во АИ СССР.
- Ермаченко В. П. 1967. Рост и развитие *Nitrosomonas europaea*. М., Канд. дисс.
- Заварзин Г. А. 1957. Участие молибдена в окислении нитритов нитрифицирующими бактериями. — Докл. АН СССР, 113, 1361.
- Заварзин Г. А. 1958а. О возбудителе второй фазы нитрификации. I. Об участии в нитрификации дыхательных пигментов. — Микробиол., 27, 401.
- Заварзин Г. А. 1958б. О возбудителе второй фазы нитрификации. II. Влияние тяжелых металлов на нитрификацию. — Микробиол., 27, 542.

- Заварзин Г. А. 1958в. О возбудителе второй фазы нитрификации. III. Морфология возбудителя второй фазы нитрификации. — Микробиол., 27, 679.
- Имшенецкий А. А. 1946. К систематике нитрифицирующих бактерий. — Докл. АН СССР, 47, 233.
- Имшенецкий А. А. 1956. О практическом применении нитрифицирующих бактерий в XVII веке. — Микробиол., 25, 376.
- Имшенецкий А. А., Рубан Е. Л. 1952. Получение чистых культур *Nitrosomonas*. — Микробиол., 23, 376.
- Имшенецкий А. А., Рубан Е. Л. 1954а. О химизме нитрификации. — Докл. АН СССР, 95, 175.
- Имшенецкий А. А., Рубан Е. Л. 1954б. Бесклеточная нитрификация. I. Выращивание культур *Nitrosomonas* и получение автолизата клеток. — Микробиол., 23, 271.
- Имшенецкий А. А., Рубан Е. Л. 1954в. Бесклеточная нитрификация. II. Окисление аммиака автолизатами клеток *Nitrosomonas*. Микробиол., 23, 293.
- Имшенецкий А. А., Рубан Е. Л. 1956. Бесклеточная нитрификация. V. Окисление гидроксилamina в бесклеточных автолизатах. — Микробиол., 25, 272.
- Имшенецкий А. А., Рубан Е. Л., Бузина О. Д. 1955. Бесклеточная нитрификация. III. О динамике накопления нитритов. — Микробиол., 24, 539.
- Левчук Т. П., Ермаченко В. А., Лозинов А. Б. 1967. Выделение и свойства цитохрома с из *Nitrosomonas europaea*. — Микробиол., 26, 24.
- Лозинов А. Б., Ермаченко В. А. 1962. Физиологическая роль цитохрома у нитритных бактерий. — Микробиол., 31, 972.
- Рубан Е. Л. 1961. Физиология и биохимия нитрифицирующих микроорганизмов. М., Изд-во АН СССР.
- Ульянова О. М. 1955. К экологии *Nitrosomonas europaea*. М., Канд. дисс.
- Aleem M. I. H. 1965. Path of carbon and assimilatory power in chemosynthetic bacteria. I. *Nitrobacter agilis*. — Biochim. et biophys. acta, 107, 14.
- Aleem M. I. H. 1966. Energy-dependent reversal of electron transfer in *Nitrosomonas europaea*. — Bacteriol. Proc., 1.
- Aleem M. I. H. 1968. Mechanisms of oxidative phosphorylation in the chemoautotroph *Nitrobacter agilis*. — Biochim. et biophys. acta, 162, 338.
- Aleem M. I. H., Alexander M. 1958. Cell free nitrification by *Nitrobacter agilis*. — Bacteriol. Proc., 9.
- Aleem M. I. H., Alexander M. 1960. Nutrition and physiology of *Nitrobacter agilis*. — Appl. Microbiol., 8, 80.
- Aleem M. I. H., Lees H. 1963. Autotrophic enzyme system. I. Electron transport systems concerned with hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas*. — Canad. J. Biochem. Physiol., 41, 763.
- Aleem M. I. H., Lees H., Nicholas D. J. D. 1963. Adenosine triphosphate dependent reduction of nicotinamide adenine dinucleotide by ferrocyclochrom c in chemoautotrophic bacteria. — Nature, 200, 759.
- Aleem M. I. H., Nason A. 1960. Phosphorylation coupled to nitrite oxidation by particles from chemoautotroph *Nitrobacter agilis*. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 46, 763.
- Aleem M. I. H., Nason A. 1963. Metabolic pathways of bacterial nitrification. — In: Sympos. Marine Microbiol. C. Oppenheimer (Ed). Springfield, C. Thomas, p. 392.
- Alexander M. 1965. Nitrification. In: Soil Nitrogen. Bartholomew W. V., Clark F. E. (Eds). Madison Amer. Soc. Agron., p. 307—343
- Anderson J. H. 1964. The metabolism of hydroxylamine to nitrite by *Nitrosomonas*. — Biochem. J., 91, 8.
- Anderson J. H. 1965a. Estimation of the nitric oxide formed from hydroxylamine by *Nitrosomonas*. — Biochem., J., 94, 236.
- Anderson J. H. 1965b. Studies on the formation of nitrogenous gas from hydroxylamine by *Nitrosomonas*. — Biochim. et biophys. acta, 97, 337.

- Anderson J. H., Strumeyer D. H., Pramer D. 1968. Purification and properties of peroxidase from *Nitrosomonas europaea*. — J. Bacteriol., **96**, 93.
- Beijerinck M. W. 1914. Über das Nitratferment und über physiologische Artbildung. — Folia Microbiol., **3**.
- Bömecke H. 1939. Beiträge zur Physiologie nitrifizierende Bakterien. — Arch. Mikrobiol., **10**, 385.
- Bömecke H. 1949. Über die Ernährungs- und Wachstumsfaktoren der Nitrifikations-Bakterien. — Arch. Mikrobiol., **14**, 63.
- Bonazzi A. 1919. On nitrification. III. The isolation and description of the nitrite ferment. — Bot. Gaz., **68**, 194.
- Butt W. D. 1958. Cytochromes of *Nitrobacter*. — Nature, **182**, 732.
- Butt W. D., Lees H. 1958. Oxygen tension and the inhibition of nitrite oxidation by *Nitrobacter*. — Biochem. J., **69**, 3p.
- Butt W. D., Lees H. 1960a. Nitrite oxidation by *Nitrobacter* in the presence of certain nitrophenols. — Nature, **188**, 147.
- Butt W. D., Lees H. 1960b. The biochemistry of nitrifying organisms. 7. The phosphate compounds of *Nitrobacter* and the uptake of orthophosphate by the organism. — Canad. J. Biochem. Physiol., **38**, 1295.
- Butt W. D., Lees H. 1964. The biochemistry of nitrifying organisms 8. The effect of oxygen tension nitrite concentration and cyanate on nitrite oxidation by *Nitrobacter*. — Canad. J. Biochem. Physiol., **42**, 1217.
- Clark C., Schmidt E. L. 1966a. Utilization of pyruvate by *Nitrosomonas europaea*. — Bacteriol. Proc., **1**.
- Clark C., Schmidt E. L. 1966b. Effect of mixed culture on *Nitrosomonas europaea* stimulated by uptake and utilization of pyruvate. — J. Bacteriol., **91**, 367.
- Clark C., Schmidt E. L. 1967. Growth response of *Nitrosomonas europaea* to amino acids. — J. Bacteriol., **93**, 1309.
- Delwiche C. C., Finstein M. S. 1965. Carbone and energy sources for the nitrifying autotroph *Nitrobacter*. — J. Bacteriol., **90**, 102.
- Engel M. S., Alexander M. 1958. Growth and autotrophic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. — J. Bacteriol., **76**, 217.
- Engel M. S., Alexander M. 1960. Autotrophic oxidation of ammonium and hydroxylamine. — Soil. Sci. Soc. America Proc., **24**, 45.
- Falcone A. B., Shug A. L., Nicholas D. J. D. 1962. Oxidation of hydroxylamine by particles from *Nitrosomonas*. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., **9**, 126.
- Falcone A. B., Shug A. L., Nicholas D. J. D. 1963. Some properties of a hydroxylamine oxidase from *Nitrosomonas europaea*. — Biochim. et biophys. acta, **77**, 199.
- Finstein M. S., Delwiche C. C. 1965. Molybdenum as a micronutrient for *Nitrobacter*. — J. Bacteriol., **89**, 123.
- Frankland P., Frankland G. 1886. The nitrifying process and its specific ferments. — Philos. Trans. Roy. Soc. London B, **181**, 107.
- Grace J. 1951. Myxobacteria mistaken for nitrifying bacteria. — Nature, **168**, 117.
- Harmsen G. W., Kolenbrander G. F. 1965. Soil inorganic nitrogen. — In: Soil nitrogen. Bartholomew W. A., Clark F. C. (Eds).
- Hofman T., Lees H. 1953. The biochemistry of nitrifying organisms. IV. The respiration and intermediary metabolism of *Nitrosomonas*. — Biochem. J., **54**, 579.
- Hooper A. B. 1969. Biochemical basis of obligate autotrophy in *Nitrosomonas europaea*. — J. Bacteriol., **97**, 776.
- Hooper A. B., Hansen J., Bell R. 1967. Characterization of glutamate dehydrogenase from the ammonia oxidizing chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*. — J. Biol. Chem., **242**, 288.
- Hooper A. B., Nason A. 1965. Characterization of hydroxylamine cytochrome c reductase from the chemoautotroph *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosocystis oceanus*. — J. Biol. Chem., **240**, 4044.
- Ida S., Alexander M. 1965. Permeability of *Nitrobacter agilis* to organic compounds. — J. Bacteriol., **90**, 151.

- Kaufmann J., Boquel G. 1953. Action du phosphore sur l'activité des germes nitrificateurs et dénitrificateurs du sol. — Ann. Inst. Pasteur, **85**, 365.
- Kiesow L. 1964. On the assimilation of energy from inorganic sources in autotrophic forms of life. — Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **52**, 980.
- Kingma Boltjes T. Y. 1935. Untersuchungen über die nitrifizierenden Bakterien. — Arch. Mikrobiol., **6**, 79.
- Kluyver A. J., Donker H. I. L. 1926. Die Einheit in der Biochemie. — Chem. Zelle und Gewebe, **13**, 134.
- Laudelout H., van Ticheln L. 1960. Kinetics of the nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradskyi*. — J. Bacteriol., **79**, 39.
- Lees H. 1952. Hydroxylamine as an intermediate in nitrification. — Nature, **169**, 156.
- Lees H. 1954. The biochemistry of nitrifying bacteria. In: Autotrophic microorganisms. 4th Sympos. Soc. Gen. Microbiol. p. 84.
- Lees H., Aleem M., Lyria R., Weiss D. 1962. Nitrohydroxylamine: the unknown intermediate in nitrification. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., **7**, 126.
- Lees H., Simpson J. R. 1954. Formation of nitrite from oximes and hydroxylamine by microorganisms. — Nature, **20**, 358.
- Lees H., Simpson J. R. 1957. The biochemistry of the nitrifying organisms. V. Nitrate oxidation by *Nitrobacter*. — Biochem. J., **67**, 297.
- Malavolta E., Delwiche C. C., Burge W. D. 1960. Carbone dioxide fixation and phosphorylation by *Nitrobacter agilis*. — Biochem and Biophys. Res. Commun., **2**, 445.
- Malavolta E., Delwiche C. C., Burge W. D. 1962. Formate oxidation by cell free preparations from *Nitrobacter agilis*. — Biochim et biophys. acta, **57**, 347.
- Meiklejohn J. 1952. Minimum phosphate and magnesium requirements of nitrifying bacteria. — Nature, **170**, 1131.
- Meiklejohn J. 1953. The nitrifying bacteria. — J. Soil Sci., **4**, 59.
- Meyerhof O. 1916a. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. I. Atmung des Nitratbildners. — Pflügers Arch. ges. Physiol., **164**, 353.
- Meyerhof O. 1916b. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. II. Beeinflüssungen der Atmung des Nitritbildners durch chemische Substanzen. — Pflügers Arch. ges. Physiol., **165**, 229.
- Meyerhof O. 1917. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. III. Die Atmung des Nitratbildners und ihre Beeinflüssung durch chemische Substanzen. — Pflügers Arch. ges. Physiol., **166**, 240.
- Murray R. G. E., Watson S. W. 1965. The structure of *Nitrosocystis oceanus* and comparison with *Nitrisomonas* and *Nitrobacter*. — J. Bacteriol., **89**, 1594.
- Nelson D. 1931. Isolation and characterization of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **83**, 280.
- Nicholas D. J. D., Jones O. 1960. Oxidation of hydroxylamine in cell free extracts of *Nitrosomonas europaea*. — Nature, **185**, 512.
- Nicholas D. J. D., Wilson P. W., Heinen W., Palmer G., Beinert H. 1962. Use of electron paramagnetic resonance spectroscopy in investigations of functional metal components in microorganisms. — Nature, **196**, 433.
- Palleroni N. J. 1950. Sobre la presencia de *Nitrosospira* en tierras de la Antartida Argentina. — Rev. Fac. cienc. Agrar. Univ. Nac. Cuyo (Mendoza), **2**, 46.
- Pasteur L. 1880. Sur l'etiologie du charbon. — C. r. Acad. sci., **91**, 86.
- Pokallus R. S., Pramer D. 1964. Occurrence of cytochrome oxidase and peroxidase in *Nitrosomonas europaea*. — Arch. Biochem. and Biophys., **105**, 208.
- Pourbaix M., Zoubov N. de 1963. L'Azote. In: M. Pourbaix. Atlas d'équilibres électrochimiques à 25°C. Gauthier Villars. Paris.
- Quastel J., Scholfield P. 1951. Biochemistry of nitrification in soil. — Bacteriol. Revs., **15**, 1.

- Ramaiah A., Nicholas D. J. D. 1963. Phosphorylation coupled to the oxidation of hydroxylamine in particles from *Nitrosomonas europaea*. — *Biochem. J.*, **89**, 19.
- Ramaiah A., Nicholas D. J. D. 1964. The synthesis of ATP and the incorporation of P³² by cell free preparations of *Nitrosomonas europaea*. — *Biochim. et biophys. acta.*, **86**, 459.
- Rees M. K. 1968a. Studies on the hydroxylamine metabolism of *Nitrosomonas europaea*. I. Purification of hydroxylamine oxidase. — *Biochemistry*, **7**, 353.
- Rees M. K. 1968b. Studies on the hydroxylamine metabolism of *Nitrosomonas europaea*. II. Molecular properties of the electron transport particle, hydroxylamine oxidase. — *Biochemistry*, **7**, 366.
- Rees M. K., Nason A. 1966. Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. — *Biochim. et biophys. acta.*, **113**, 398.
- Remsen C. C., Valois F. W., Watson S. W. 1967. Fine structures of the cytomembranes of *Nitrosocystis oceanus*. — *J. Bacteriol.*, **94**, 422.
- Schloesing T., Müntz A. 1879. Recherches sur la nitrification. — *C. r. Acad. sci.*, **89**, 891.
- Silver W. S. 1960. Exogenous respiration in *Nitrobacter*. — *Nature*, **20**, 555.
- Skinner F. A., Walker N. 1961. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continous culture. — *Arch. Mikrobiol.*, **38**, 339.
- Smith A. J., Hoare D. S. 1968. Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation of its obligate autotrophy. — *J. Bacteriol.*, **95**, 844.
- Soriano S. 1963. Reisolation of the *Nitrosococcus winogradskii*. — *Ann. Inst. Pasteur*, **105**, 349.
- Struat P. A., Nason A. 1965. Characterization of nitrate reductase from chemotroph *Nitrobacter agilis*. — *J. Biol. Chem.*, **240**, 1413.
- Tsien H. C., Lambert R., Laudelout H. 1968. Fine structure and localization of the nitrite oxidizing systems in *Nitrobacter*. — *Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol.*, **34**, 483.
- Van Gool A. P., Lambert R., Laudelout H. 1969. The fine structure of frozen-etched *Nitrobacter* cells. — *Arch. Mikrobiol.*, **69**, 281.
- Van Gool A., Laudelout H. 1966a. The mechanism of nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradskii*. — *Biochim. et biophys. acta*, **113**, 41.
- Van Gool A., Laudelout H. 1966b. Formate utilization by *Nitrobacter winogradskii*. — *Biochim. et biophys. acta*, **127**, 295.
- Van Gool A. P., Laudelout H. 1967. Spectrophotometric and kinetic study of nitrite and formate oxidation in *Nitrobacter winogradskii*. — *J. Bacteriol.*, **93**, 215.
- Van Gool A. P., Tobback P. P., Fischer I. 1971. Autotrophic growth and synthesis of reserve polymers in *Nitrobacter winogradskii*. — *Arch. Mikrobiol.*, **76**, 252.
- Wallace W., Nicholas D. J. D. 1968. Properties of some reductase enzymes in the nitrifying bacteria and their relationship to the oxidase systems. — *Biochem. J.*, **109**, 763.
- Wallace W., Nicholas D. J. D. 1969. The biochemistry of nitrifying microorganisms. — *Biol. Rev.*, **44**, 359.
- Warrington R. 1879. On nitrification. — *J. Chem. Soc.*, **35**, 429.
- Warrington R. 1884a. On nitrification. — *J. Chem. Soc.*, **45**, 637.
- Warrington R. 1884b. Note on nitrification. — *Nature*, **30**, 644.
- Warrington R. 1890. Note on the isolation of nitrifying organism. — *Chem. News*, **61**, 135.
- Watson S. W. 1962. *Nitrosocystis oceanus* sp. nov. — *Abstr. 8th Internat. Congr. Microbiol. Montreal*.
- Watson S. W. 1963. Autotrophic nitrification in the ocean. — In: *Sympos. Marine Microbiol. C. Oppenheimer (Ed.)*. Springfield, C. Thomas, Ill., p. 73.
- Watson S. W. 1965. Characteristics of a marine nitrifying bacterium *Nitrosocystis oceanus* sp. n. — *Limnol. and Oceanogr.*, **10**, suppl. R274.
- Watson S. W. 1971. Reisolation of *Nitrosospira briensis* S. Winogradsky and H. Winogradsky 1933. — *Arch. Mikrobiol.*, **75**, 179.

- Watson S. W., Graham L. B., Remsen Ch. C., Valois F. W. 1971. A lobular, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosolobus multiformis*, nov. gen. nov. sp.—Arch. Mikrobiol., **76**, 183.
- Watson S. W., Mandel M. 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria.—J. Bacteriol., **107**, 563.
- Watson S. W., Waterbury J. B. 1971. Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrosospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp.—Arch. Mikrobiol., **77**, 203.
- Winogradsky H. 1937. Contribution à l'étude de la microflore nitrificatrice des boues activées de Paris.—Ann. Inst. Pasteur, **58**, 326.
- Yoshida T., Alexander M. 1970. Nitrous oxide formation by *Nitrosomonas europaea* and heterotrophic microorganisms.—Soil Sci. Soc. America Proc., **34**, 880.
- Zavarzin G. A., Legunkova R. 1959. The morphology of *Nitrobacter winogradskyi*.—J. Gen. Microbiol., **21**, 186.

ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИИ

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ
И ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Железобактериям посвящено большое количество обзоров, в том числе и опубликованных недавно. В нашей стране наиболее популярной остается книга Н. Г. Холодного (1922 г.), переизданная с дополнениями в 1953 г. Исследование железобактерий с самого начала и до последнего времени носило ботанический, описательный характер. Методы микробиологического исследования из-за отсутствия лабораторных культур не могли быть применены к этой группе, и вместе с другими водными организмами железобактерии занимают обособленное положение в системе микробиологических знаний.

В ранних микроскопических наблюдениях середины прошлого столетия было установлено, что ржавые осадки, встречающиеся в водоемах, большей частью содержат оформленные структуры, образованные микроорганизмами. На основании микроскопических наблюдений было описано несколько видов нитчатых железобактерий. После открытия хемосинтеза С. Н. Виноградским сложились две точки зрения на физиологию железобактерий. По концепции Виноградского (1888), к которой полностью присоединился Холодный (1953), железобактерии являются типичными аэрогидроксидазами, однако опыты Лиске (Lieske, 1911, 1919), подтверждавшие эту концепцию, оказались плохо воспроизводимыми. В противоположность Виноградскому Молиш (Molisch, 1910b), а позже Калининко (1939) полагали, что окисление железа и марганца есть побочная функция некоторых гетеротрофных организмов.

Биологическое значение окисления железа различно для разных организмов. У *Thiobacillus ferrooxidans* оно может служить единственным источником энергии для роста. У организмов, обладающих слизистой капсулой, отложение гидроксида железа может идти по реакции Гейла на кислые мукополисахариды. При этом образование железистых капсул защищает бактерии до некоторой степени от поедания их простейшими. Наконец, окисление железа и марганца может быть обусловлено побочными реакциями гидроксипероксидаз. Таким образом, железобактерии к литотрофным микроорганизмам можно отнести лишь условно в силу сложив-

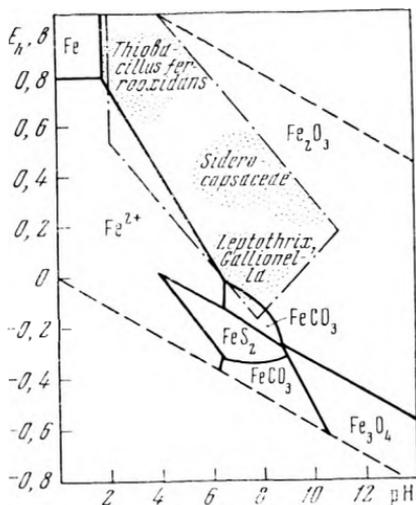


Рис. 45. Поля устойчивости соединений железа в координатах E_h -рН. Показаны области развития основных групп железобактерий. Пунктир — поле устойчивости воды

микроорганизмов. В нашей стране критика биогенной гипотезы Страховым (1947, 1962) сделала ее непопулярной среди геологов.

В своей геохимической деятельности микроорганизмы не противоречат термодинамическим закономерностям, они влияют главным образом на кинетику реакций. Состояние железа в водных растворах зависит прежде всего от концентрации водородных ионов и растворенного кислорода. Эта зависимость хорошо описывается диаграммами полей устойчивости в координатах E_h — рН. Такие диаграммы были рассчитаны для железа и марганца Краускопфом (Krauskopf, 1957) и широко используются в геохимии (рис. 45). Соответствие этим термодинамическим данным является необходимым условием любой гипотезы, относящейся к круговороту железа и марганца. Однако необходимо учитывать следующие обстоятельства. Окисление ионов железа в водном растворе, особенно при низких концентрациях железа и кислорода, протекает с измеримой скоростью, и положение равновесия, предсказанное расчетом, достигается не сразу.

Комплексные органические соединения железа, представленные в почве гуминовыми соединениями, подчиняются иным закономерностям, чем ионы железа. Эти соединения разрушаются микроорганизмами, что приводит к образованию железистых осадков. Химия гуминовых соединений железа и других металлов разработана весьма слабо, и на нынешнем этапе не может служить основой для микробиологической работы.

шейся традиции и значения в геохимическом круговороте железа.

Неудачи с культивированием железобактерий побудили обратить основное внимание на наблюдение над ними в природе в связи с их предполагаемой ролью в образовании железных осадочных руд. В период 1919—1939 гг. было описано большое число организмов, способных отлагать окислы железа (Холодный, 1953; Перфильев, Габе, 1961; Dorff, 1934), сведения о которых были суммированы в монографии Дорфа (Dorff, 1934) и затем в статье Бегера в 7-м издании определителя Берги (Bergey, 1957). Однако увлечение геологической ролью железобактерий также завершилось разочарованием: не удалось привести бесспорных доказательств образования железорудных месторождений при участии

В почве, по-видимому, могут происходить обменные процессы на твердых частицах с изменением валентности железа. В этом случае железо может играть роль переносчика, и вся система напоминает биологический топливный элемент, где почва выполняет роль катода. Эта возможность практически не исследована. Таковы по меньшей мере некоторые возможности, не обусловленные закономерностями, продиктованными полями устойчивости железа в водном растворе.

Железо поступает в биологический круговорот после его мобилизации из минералов. Крайний случай выщелачивания железа при сернокислотном выветривании обсуждался в главе 5. Образование сильных минеральных кислот нитрифицирующими и тионовыми бактериями разрушает почвенные минералы. Особое значение придают действию бактериальных слизей, которые образуют с железом комплексные соединения. В гумидной зоне миграция и аккумуляция железа связаны с гуминовыми веществами, вымывание которых из почвы ведет к подзолообразованию (Aristovskaja, Zavarzin, 1971).

Если почва находится в водонасыщенном состоянии, то в ней развиваются процессы восстановления железа, приводящие к оглеению. После затопления почвы происходит быстрое падение E_h , восстановление нитратов, накопление углекислоты. Затем начинается образование органических кислот, сероводорода, водорода и метана. Восстановление железа в значительной степени определяется органическим веществом, содержащимся в затопленной почве. Восстановление железа могут вызывать микроорганизмы, образующие при брожении восстановленные продукты, которые реагируют с окисным железом. К таким организмам относятся факультативные анаэробы, в особенности энтеробактерии и бациллы. Прямыми экспериментами удалось установить, что в составе смешанной микрофлоры, восстанавливающей железо, имеются ведущие формы, которые способны вести процесс и в чистой культуре, проявляя замечательную специфичность по отношению к окисным соединениям железа или марганца (Луда, Калакуцкий, 1961; Трошанов, 1964; Калакуцкий, 1959; Bromfield, 1956). В противоположность представлениям, что железо восстанавливается неспецифически, выдвинуто предположение, что этот процесс аналогичен денитрификации (Ottow, 1969) и имеет энергетическое значение для бактерий.

Диаграмма полей устойчивости позволяет разделить микроорганизмы, окисляющие железо, на три большие группы.

В среде, насыщенной атмосферным кислородом, при E_h , равном примерно $+0,5$ в, ион двухвалентного железа устойчив лишь в кислой среде при рН 4,5 и меньше. Микроорганизмы, окисляющие железо в кислой среде, были открыты сравнительно недавно и представлены хорошо изученным биохимически *Thiobacillus ferrooxidans* (см. главу 5).

При реакции среды, приближающейся к нейтральной, железо устойчиво лишь при пониженном потенциале. Такие неравновесные условия могут возникать лишь в проточной среде, и область их распространения определяется кинетикой поступления кислорода в раствор и скоростью протока. Обладая мощным ферментативным аппаратом, микроорганизмы могут конкурировать с процессом химического окисления. Эти условия возникают при выходе подземных или почвенных вод на дневную поверхность. Группу организмов, развивающуюся в таких условиях, удобнее всего обозначить как образователи охры. Сюда относятся наиболее известные железобактерии с нитчатым строением и прикрепленным образом жизни, что соответствует условиям протока.

Комплексные органические соединения железа не подчиняются приведенным на диаграмме закономерностям. Разнообразные микроорганизмы, которые способны разлагать эти соединения, составляют самостоятельную группу. В нее входят организмы сем. *Siderocapsaceae*, некоторые нитчатые и почкующиеся формы. Окисление железа для них определено не имеет энергетического значения, хотя количество накапливаемых осадков может быть довольно велико.

Самостоятельно следует рассмотреть окисление марганца микроорганизмами и отделение его от железа в геохимических процессах.

ОБРАЗУЮЩИЕ ОХРУ БАКТЕРИИ

Осадки лимонита, иногда очень мощные (3—4 м на Камбальном вулкане, Камчатка), образуются, когда купоросные воды, сформированные *Thiobacillus ferrooxidans*, смешиваются с пресными (Заварзин, 1966). Осаждение гидроксида железа на границе кислых и нейтральных вод происходит вне зависимости от того, успели бактерии окислить железо или же оно окисляется кислородом воздуха. По традиции и из таксономических соображений *T. ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*) относят к тионовым бактериям, и он подробно описан в главе 5. *T. ferrooxidans* обладает типичным литоавтотрофным обменом, окисляя двухвалентное железо в трехвалентное через цитохром *c* и цитохромоксидазу. Образующаяся при этом АТФ служит для автотрофной фиксации углекислоты. *T. ferrooxidans* окисляет пирит в трехвалентное железо и серную кислоту, которая выщелачивает окружающие породы. Развиваясь в кислой среде, где в растворе устойчив не только ион Fe^{2+} , но и Fe^{3+} , организм не образует оформленных отложений железа. Более того, образование осадка окислов железа является паразитной реакцией в выщелачивании и угнетает *T. ferrooxidans*, так как затрудняет диффузию кислорода.

К собственно железобактериям относят организмы, образующие оформленные осадки железа.

Старый немецкий термин *Okkerbildendenbakterien* (образующие охру бактерии) хорошо описывает эту группу организмов, которые образуют обильные охристые осадки, содержащие в себе состоящие оформленные элементы бактериального происхождения. Диагенез этих осадков приводит к образованию лимонита, который может служить породообразующим минералом болотных, озерных и некоторых других осадочных железных руд.

Можно различить следующие основные типы условий, в которых происходит развитие железобактерий, образующих охру.

Развитие при выходе подземных и почвенных вод на дневную поверхность. Основным анионом этих нейтральных или слабощелочных вод является бикарбонат-ион, и поэтому окисление железа бактериями этой группы рассматривается обычно как окисление бикарбоната железа. Выходя на дневную поверхность, подземные воды теряют углекислоту и насыщаются кислородом, при этом может происходить чисто химическое окисление железа, но в большинстве случаев в таких осадках обнаруживаются оформленные элементы железобактерий, что указывает на большую скорость биогенного процесса по сравнению с абиогенным. При питании системы водоснабжения глубинными водами, содержащими железо, развитие бактерий происходит в трубах, что вызывает серьезные затруднения и необходимость устраивать отстойники, в которых вода аэрируется и освобождается от железа до поступления в систему (Beger, 1966). Осаждение усиливается за счет железа, выделяющегося при коррозии самих труб. Типичная картина процесса, происходящего при выходе железистых вод на дневную поверхность, представлена на рис. 46 (Charlet, Schwartz, 1954). Результаты показывают, что область развития железобактерий, в данном случае *Leptothrix ochracea*, ограничена узкой зоной, где высоко содержание углекислоты и Fe^{2+} , а концентрация кислорода меньше 1 мг/л. Авторы смогли установить, что живые клетки *L. ochracea* встречаются лишь на этом участке, хотя пустые чехлы попадают на всем течении ручья. Такие условия можно было бы обозначить «сидерета» — аналогично сульфурете.

Другим характерным случаем развития образующих охру бактерий является их рост на поверхности заболоченной почвы за счет вертикальной миграции железа. Он носит часто характер вспышки и наблюдается в средней полосе России часто сразу после таяния снегов. Иногда весенняя вспышка железобактерий начинается еще под снегом, который пропитывается ржавыми осадками. К этому же случаю можно отнести и развитие железобактерий в дренажной системе. Здесь бактерии также растут в узкой зоне контакта восстановленной и окисленной зон. В пропитанной водой заболоченной почве железо восстанавливается, и на поверхности контакта с воздухом развивается пленка железобактерий, отсекающая нижний глеевый горизонт. Даже слабый ток воды значительно усиливает развитие железобактерий. Картина

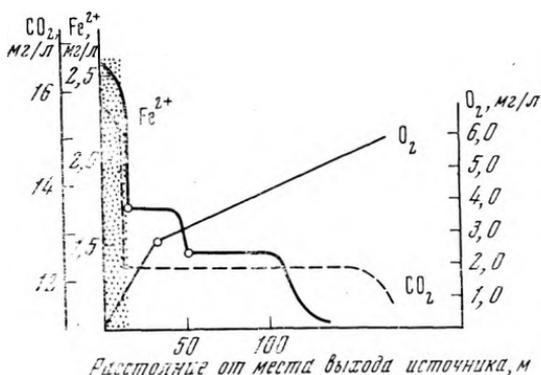


Рис. 46. Изменение гидрохимических показателей в железистом источнике (Charlet, Schwartz, 1954)
Показана область развития *Lertothrix ochracea*

такого рода может иногда наблюдаться на больших площадях. По наблюдениям Аристовской (1965), в некоторых случаях можно установить, что горизонт развития железобактерий опускается с поверхности в глубь почвы.

Наконец, развитие железобактерий в илах подробно исследовано Перфильевым и его сотрудниками (рис. 47). На границе между донными отложениями и водной массой располагается скачок окислительно-восстановительного потенциала между окисленной и восстановленной зонами, в которых устойчивы соответственно Fe^{3+} и Fe^{2+} . Обычно эта граница, как и граница проникновения кислорода, располагается в десятках миллиметров от поверхности ила (Перфильев, Габе, 1964). В иле происходит микроразвитие очень своеобразных организмов, многие из которых относятся к *Metallogeniaceae*. Окисление железа здесь обуславливает преимущественно *Siderococcus*. Развитие образующих охру организмов происходит в условиях резкого градиента окислительно-восстановительного потенциала, ограниченного доступа кислорода и, большей частью, низких концентраций Fe^{2+} .

Образующие охру бактерии развиваются, как правило, поблизости от донных отложений в болотах, источниках, ручьях, дренажных трубах. В планктоне они встречаются скорее как исклю-

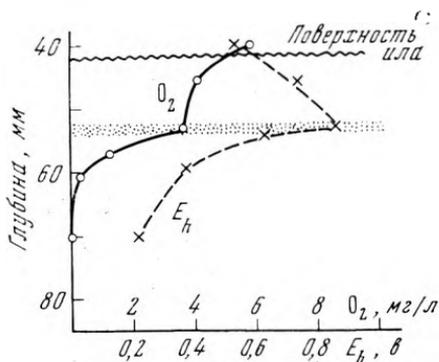


Рис. 47. Развитие железобактерий в иловом профиле (Перфильев, Габе, 1964)
Показана область развития *Metallogenium*

чение. Примером может служить развитие *Gallionella* в меромиктическом озере Оха-Лампи (Дубинина, Дерюгина, 1969) на границе проникновения кислорода (0,2—0,03 мг/л) при рН 6,4 к донным водам, обогащенным железом (до 100 мг/л закисного железа у дна). *Gallionella* составляла 50—70% от общего числа бактерий, и в зоне ее развития железо было окислено. Оседающие на дно нити *Gallionella* разрушались, и железо восстанавливалось.

Массовое развитие железобактерий при благоприятных условиях захоронения осадков может приводить к образованию болотных руд.

К образующим охру железобактериям можно отнести *Gallionella*, *Leptothrix*, *Toxothrix*, *Siderococcus*. Все эти организмы мало исследованы физиологически, чистые культуры их, по-видимому, не были получены в лаборатории. До сих пор нельзя сказать, какое значение имеет для этих организмов окисление железа: служит ли этот процесс источником энергии или же связан с другой функцией в деятельности организма.

Впервые *Gallionella* была обнаружена Эренбергом в 1836 г. Под микроскопом организм выглядит как скрученная лента или два переплетенных волокна. Ширина нити и шаг винтообразной закрученности очень различаются на одном и том же препарате. Иногда нити ветвятся, причем чаще это правильное дихотомическое ветвление. Поверхность нитей либо гладкая, либо усыпана бугорками. У одной формы *Gallionella*, так называемой *G. minor*, закрученность даже плохо прослеживается из-за обилия бугорков. Нити *Gallionella* либо окрашены в желтоватый цвет гидратом окиси железа, либо бесцветны, но и в этом случае они дают реакцию берлинской лазури на окисное железо.

В течение долгого времени — вплоть до 1922 г. — нити считали единственным живым элементом *Gallionella*, и по их морфологии различали две основные формы: плоские ленты — *Spirophyllum* и переплетенные нити — *Gallionella* (Ellis, 1919). Предполагали, что размножение организма происходит мельчайшими конидиями, образующимися на поверхности нитей (Ellis, 1907), или обрывками нитей (Lieske, 1911). Подробно библиография, посвященная истории изучения *Gallionella*, приведена Бегером и Брингманом (Beuger, Brिंगmann, 1953).

В 1922 г. Холодный обнаружил на концах нитей *Gallionella* бобовидные клетки и создал стройную картину развития организма. Для микроскопического изучения Холодный брал препараты стекол обрастания, помещенных в аквариумы с железистой водой, из источника, где обычно развивалась *Gallionella*. Гипотеза Холодного построена на двух основных фактах. 1) На концах перевитых нитей часто обнаруживаются вибрионные клетки; если их нет, можно думать, что они оторвались при изготовлении препарата. 2) Нить *Gallionella* в разбавленной соляной кислоте растворяется без остатка. Это послужило основанием утверждать, что

она состоит только из осадка гидрата окиси железа. По мнению Холодного, единственным живым элементом *Gallionella* являются бобовидные клетки, которые непрерывно выделяют своей вогнутой стороной ленту «оформленного экскрета» — гидрата окиси железа. Клетки вращаются вокруг своей оси и таким образом закручивают нить. Своим оппонентам, которые утверждали, что на нитях, кроме концевых, имеются и боковые клетки (Перфильев, 1926), — а также клетки видны и на опубликованных микрофотографиях Холодного, — Холодный возразил, что это случайно прилипшие клетки. При отсутствии чистых культур и недостаточной разрешающей способности светового микроскопа это утверждение, конечно, недоказуемо.

Следующая серия исследований была проведена с помощью электронного микроскопа. Бегер и Брингманн (Beger, Bringmann, 1953) наблюдали строение «стебелька» *Gallionella*, который на их фотографиях выглядит как сплошная лента.

Фаттер и Вольф (Vatter, Wolfe, 1956) нашли, что лента *Gallionella* является не сплошной, а состоит из отдельных тяжей числом до 80. Систематическое электронномикроскопическое исследование *Gallionella* было проведено ван Итерсон (van Iterson, 1958) на накопительной лабораторной культуре, и она обнаружила такие странные формы роста этого организма, которые совершенно не укладывались в схему Холодного. Результаты исследований ван Итерсон не были завершены стройной схемой развития организма, а полученные картины настолько противоречили общепринятым взглядам, что ее работа не нашла признания (Wolfe, 1964; Starr, Skeriman, 1965; Poindexter, Lewis, 1966). Однако в нашей лаборатории были получены результаты, подтверждающие наиболее оспариваемые положения ван Итерсон (Заварзин, 1965; Балашова, 1967, 1969).

На концах извитых нитей действительно имеются вибрионидные клетки, с вогнутой стороны которых отходят волокна, образующие стебелек *Gallionella*. Эти клетки могут плавать свободно благодаря одному терминальному жгутику (рис. 48, а), но в какой-то момент они начинают выделять с вогнутой стороны клетки, где у *Gallionella* имеется придаток наподобие соска, волокнистый материал (рис. 48, б). На фотографиях отчетливо видно, что этот материал вначале полупрозрачен для электронов и, следовательно, не содержит железа, а затем увеличивается в объеме и покрывается непрозрачными для электронов отложениями железа (рис. 48, в). Клетки становятся полупрозрачными и, наконец, на их месте остаются расположенные в контуре клетки плотные гранулы.

Строение нитей разнообразно у разных видов *Gallionella*. Исследованный ван Итерсон вид *G. ferruginea* имел сетчатое строение нитей, сложенных тонкими волокнами. Такое строение (рис. 49) нитей наблюдается у большинства штаммов (Заварзин, 1965), но культура, полученная Балашовой и названная ею *G. filamenta*,

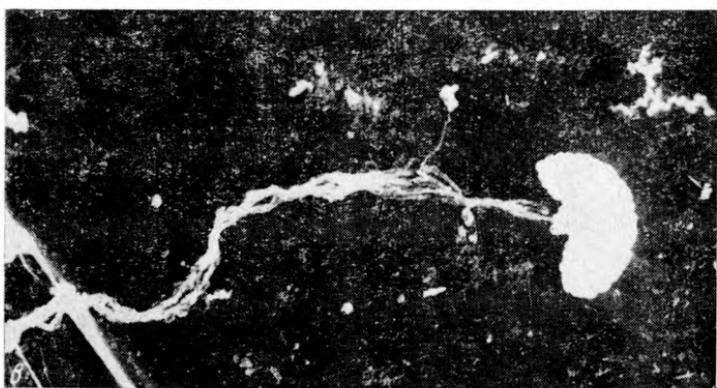
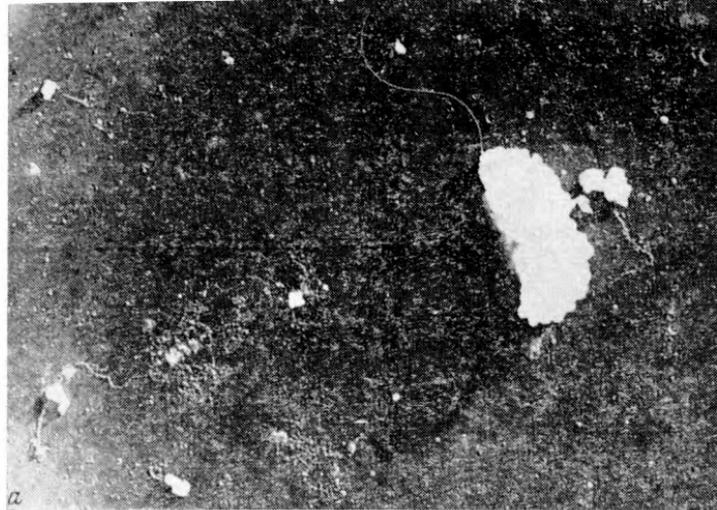


Рис. 48. Последовательные стадии развития *Gallionella* из концевой клетки (Заварзин, 1965)

а — свободноплавающая клетка со жгутиком; **б** — выделение нитевидного материала в вогнутой стороне клетки; **в** — сформировавшийся стебелек

Состояла из двух перекрученных друг вокруг друга нитей, сложенных в свою очередь из волокон, общее число которых было меньше десяти (рис. 50). Таким образом, по строению нити действительно имеются формы, соответствующие *Spirophyllum* (*G. ferruginea*) и собственно *Gallionella* (*G. filamenta*) (Балашова, 1967). Удаленные от концов части нити бывают так покрыты окислами железа, что структуру их в электронном микроскопе не удастся различить. Попытка удалить окислы обычно приводит к разрушению нити, но осторожная обработка позволяет заметить органическую основу.

В накопительной культуре принадлежащими *Gallionella* можно считать лишь те структуры, которые бесспорно связаны с нитями. Из этих структур в первую очередь следует отметить боковые клетки, которые несомненно связаны с нитями так, что нити проходят под их оболочку (рис. 50, в). Можно видеть, что боковые клетки имеются на тех же нитях, на которых находятся и концевые клетки. Кроме этих палочковидных клеток, которые хорошо видны на фотографиях ван Итерсон и в наших препаратах, на нитях *Gallionella* были обнаружены гигантские мембранные мешки (рис. 50, б), которые ван Итерсон назвала спорангиями, так как ей удалось рассмотреть внутри мелкие округлые тельца. На наших препаратах в мембранных мешках не удавалось различить никакого со-

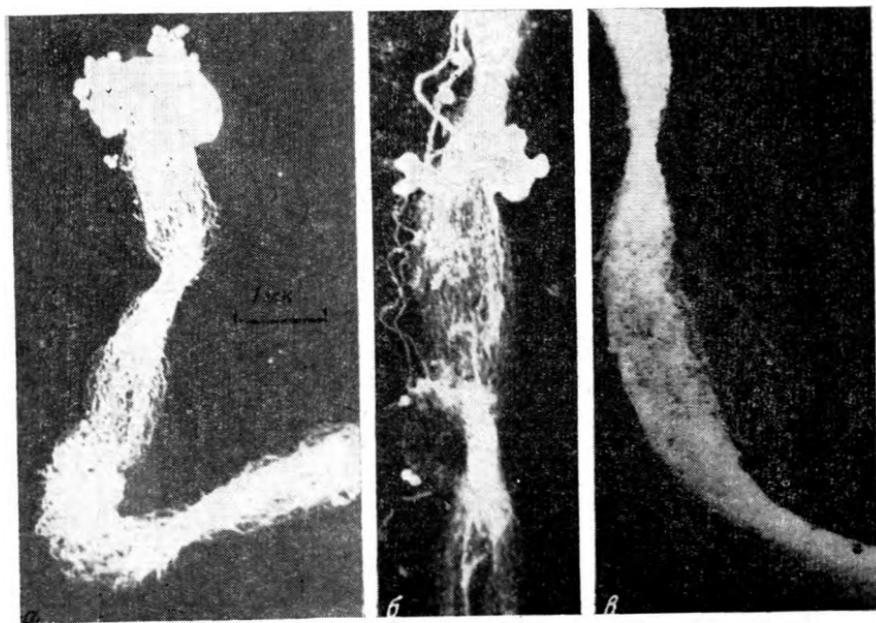


Рис. 49. Стебельки *Gallionella ferruginea*

а — лентовидный стебелек с концевой клеткой; б — перевитой стебелек из тонких нитей; в — стебелек в виде сплошной ленты

держимого: мешки были непрозрачными. Наконец, на поверхности нитей иногда удается видеть много округлых мелких телец, которые можно трактовать как почки. Ханерт (Hanert, 1968), который сообщил о выделении чистой культуры *Gallionella*, вообще не обнаружил концевых клеток в культуре, но нашел их в препаратах из естественных мест обитания (Hanert, 1970). По наблюдениям Балашовой, такие клетки появляются лишь на определенных стадиях развития культуры. Ван Итерсон при помощи химических реакций, Ханерт — путем микроспектрофотометрии, Балашова — обработкой ферментами пришли к заключению, что в нитях *Gallionella* содержится белок.

На ультратонких срезах волокон *G. filamenta* (Балашова, Черни, 1970) видно, что электронноплотные отложения железа покрывают менее электронноплотный слой, а в середине проходит севая нить — арайя. По своим размерам нить *Gallionella* заведомо лишена оболочки, свойственной бактериальным клеткам (рис. 51). На срезах бактериальных клеток обнаруживались кольцевидные срезы волокон *Gallionella*, располагающиеся в цитоплазме и на поверхности клеток в капсуле (рис. 52).

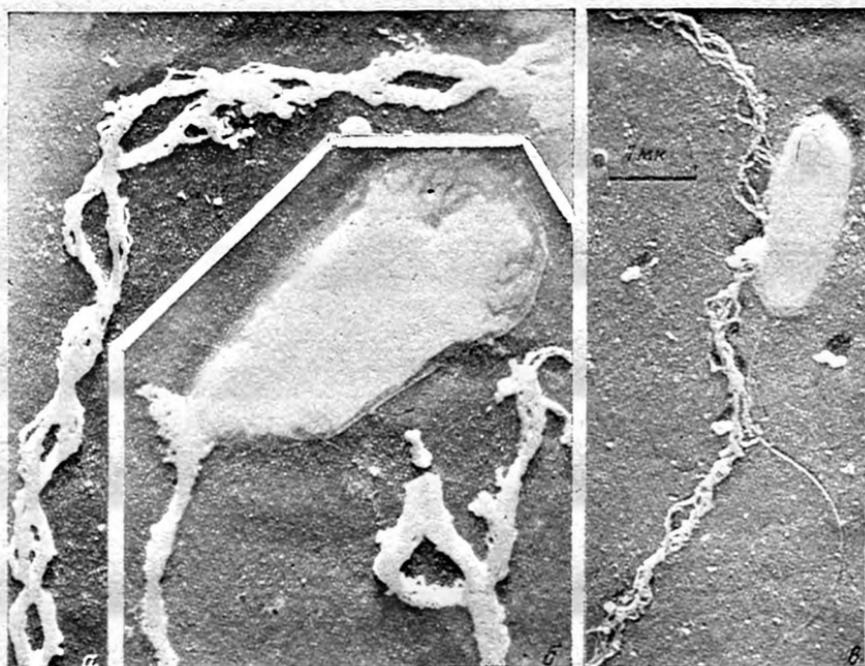


Рис. 50. *Gallionella filamenta*

а — стебелек из крупных нитей; б — мембранный мешок на стебельке; в — боковая клетка со жгутиком

Железо в волокнах *Gallionella* находится в аморфном состоянии, что можно заключить по отсутствию характерной для гидроокиси дифракции при рентгеноструктурном анализе. На основании анализа спектров гамма-резонанса было сделано заключение, что железо связано в какой-то органический комплекс.

Таким образом, детальное изучение тонкого строения *Gallionella* привело к картине значительно более сложной, чем представления Холодного об этом организме. В силе остаются два предположения. Первое, — что *Gallionella* выделяет из клеток на определенном этапе развития органическое вещество в форме нити наподобие тех слизистых шнуров, которые выделяют миксобактерии. Нити затем покрываются окислами железа, которое вступает с ними в химическое взаимодействие. Это предположение, наиболее близкое к представлениям Холодного, не объясняет ряда наблюдений, таких как боковые клетки, почки, мембранные мешки и т. д. Второе предположение основано на гипотезе (Балашова, 1969), что *Gallionella* на самом деле представляет форму, близкую к микоплазмам, которые не имеют клеточной стенки. Цикл развития микоплазм сложен и может включать те формы, которые наблюдаются в культурах *Gallionella*. Из культур *Gallionella* Балашовой удалось выделить микоплазмы. В пользу этого предположения говорит также факт сходства *Gallionella* с *Metallogenium*, марганецоксилирующим симбиотическим микроорганизмом, который также оказался близок к микоплазмам (Дубинина, 1969).

Из-за отсутствия чистых культур физиология *Gallionella* изучена крайне слабо. Скорее всего можно говорить об условиях развития этого организма. *Gallionella* растет в чисто минеральной среде при pH 5—7. Окислительно-восстановительный потенциал может широко варьировать, но развитие организма связано с определенными концентрациями железа и кислорода и происходит поэтому в узкой зоне, особенно характерной для роста *Gallionella* в лабораторной культуре. Развитие сопровождается отложением окисного железа, которое составляет более 90% от сухого веса организма. Развитие *Gallionella* в минеральной среде с двухвалентным железом как единственным окисляемым соединением согласуется с предположением, что *Gallionella* — хемосинтезирующий микроорганизм. Действительно, *Gallionella* по нашим определениям и по определениям Ханерта в накопительной культуре энергично фиксирует $C^{14}O_2$, хотя количественные данные о том, какую часть углерода организм получает из углекислоты, пока отсутствуют.

Лабораторное культивирование накопительной культуры *Gallionella* не представляет сейчас значительных трудностей. Наиболее надежным методом является культивирование на среде с сульфидом железа, предложенное ван Нилем, которое применяется в соответствии с прописью Кучера и Вольфа (Kucera, Wolfe, 1957). Существенным моментом в культивировании служит продувание

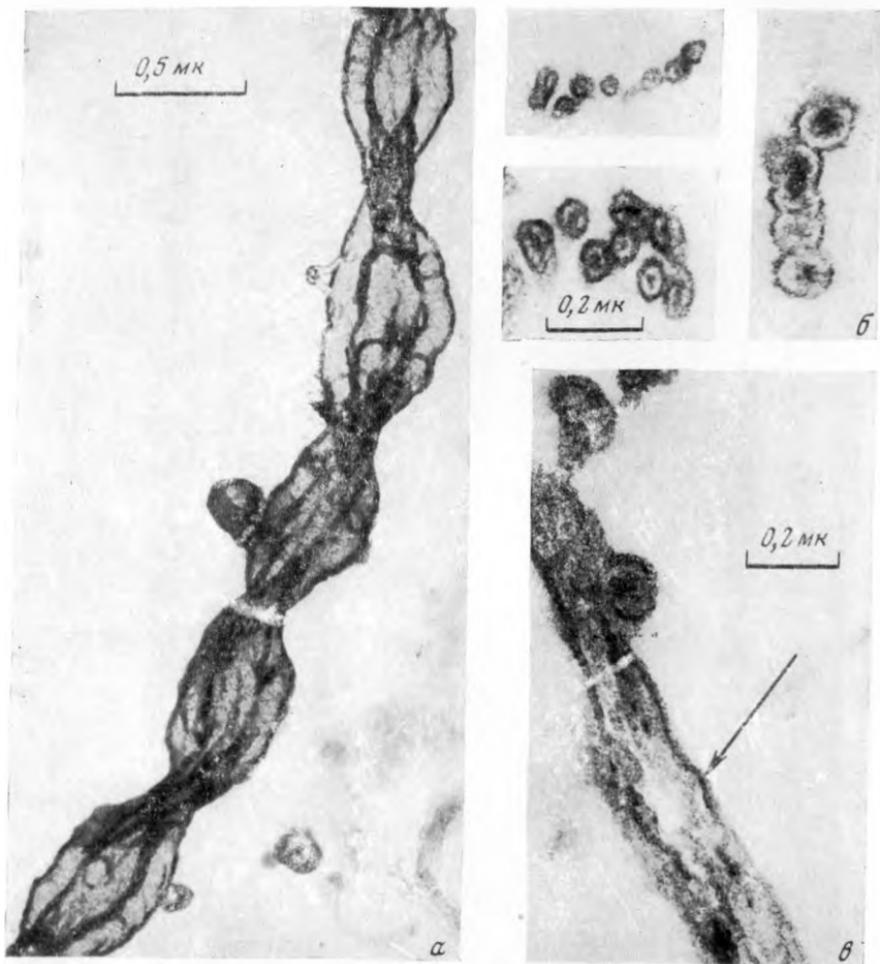


Рис. 51. Строение стебельков *Gallionella filamenta* (Балашова, Черни, 1969)
 а — общий вид стебелька после удаления железа; б — поперечные срезы волокон стебелька. Видны темные отложения железа на поверхности и центральная нить; в — продольный срез стебелька. Стрелкой указан плотный участок, ограничивающий поверхностный слой

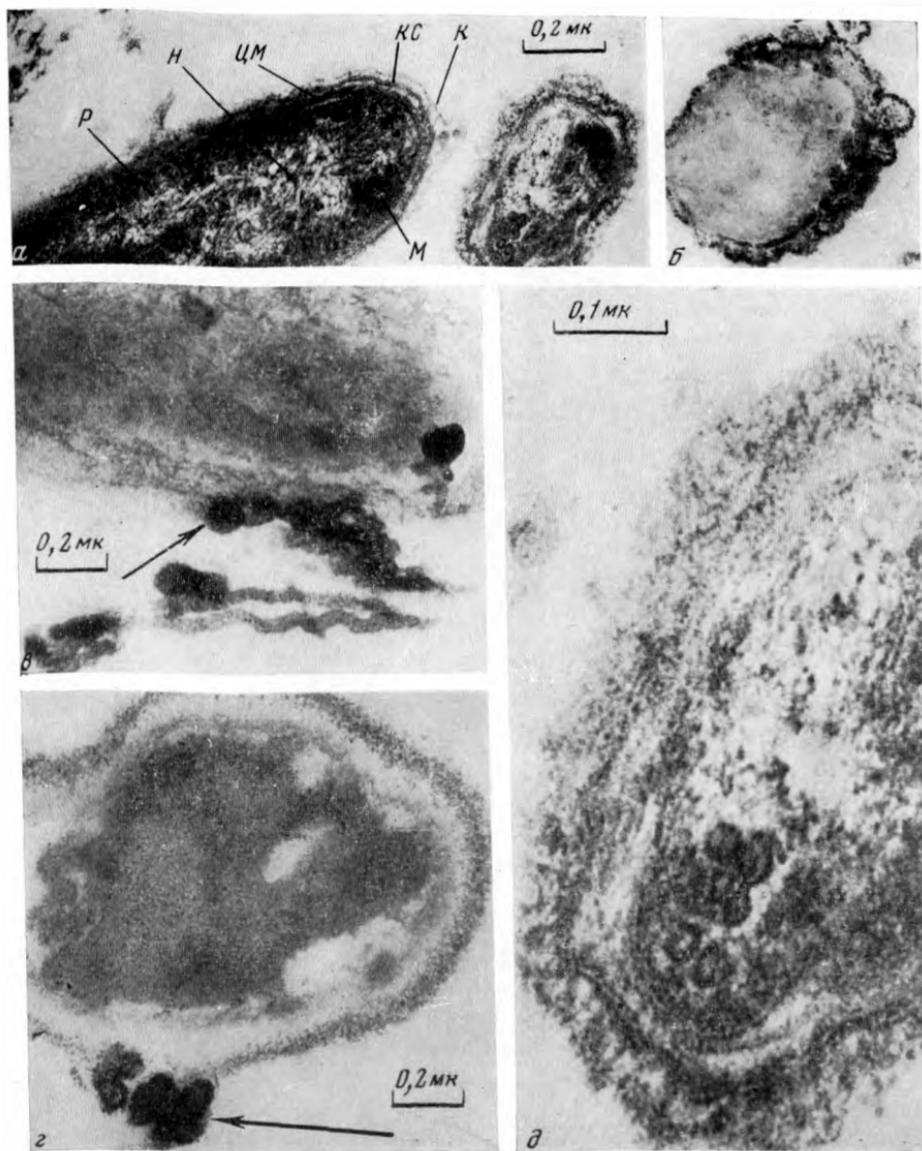


Рис. 52. Строение бактериальных клеток из культуры *Gallionella filamenta* (Балашова, Черни, 1969)

а — бактериальная клетка, где К — капсула, КС — клеточная стенка, ЦМ — цитоплазматическая мембрана, Н — нуклеоид, Р — рибосомы, М — мезосомы. Внутри клетки видны округлые образования, соответствующие поперечному срезу волокон стебельки; б, в, г — стебельки *Gallionella*, расположенные в капсуле бактериальных клеток (показаны стрелками); д — то же, что а, но при большем увеличении. Видны округлые образования

среды углекислотой, которое приводит к частичному разложению сульфида и снижению концентрации кислорода. Тех же результатов можно добиться, применяя вместо сульфида металлическое железо. *Gallionella* развивается в таких условиях в виде бесцветной узкой зоны в верхней трети пробирки, которая постепенно ярусами спускается вниз. Аналогичные картины наблюдали в природе в пелоскопах Перфильев и Габе (1961). Для культивирования *Gallionella* могут быть применены различные проточные методы, наиболее простым из них является конвекционная установка Перфильева. О получении чистой культуры *Gallionella* сообщали разные авторы (Lieske, 1911; Hanert, 1968), однако во всех случаях предложенные методы оказывались плохо воспроизводимыми.

Gallionella напоминает *Siderococcus*, отношение которого к группе образующих охру бактерий не является вполне очевидным. Это чрезвычайно мелкий организм, который едва отличим от частиц железистого осадка, был впервые описан Дорфом (Dorff, 1934). В лаборатории Перфильева (Перфильев, Габе, 1964) нашли, что *Siderococcus* играет существенную роль в образовании железистых отложений в карельских озерах, и охарактеризовали условия его развития. Наблюдая за образованием вторичного диагенетического профиля в изолированных пробах воды и ила, удалось установить, что на границе окисленной и восстановленной зон под микрзоной марганецоксилирующих микроорганизмов образуется зона отложения оксидов железа, причем действующим агентом является *Siderococcus*, окисляющий только железо, но не марганец. Нам удалось наблюдать развитие этого организма в небольшом водоеме над оглененным горизонтом и впоследствии получить его развитие в аквариуме над слоем глины. Электронномикроскопические снимки показывают, что мелкие клетки *Siderococcus* обладают нитевидным придатком, напоминающим отдельное волокно из «стебелька» *Gallionella*. Клетки *Siderococcus* объединяются по 8—10 в подвижную колонну, которая активно плавает над поверхностью дна, хотя жгутиков не было найдено. В зоне развития клеток встречается обычно большое количество осадков железа, но сами клетки остаются свободными (рис. 53). *Siderococcus* — очень мелкий организм, не обладающий характерной морфологией в световом микроскопе. Кроме того, он всегда скрывается в массе минеральных частиц. Вероятно, поэтому на него до сих пор не обратили должного внимания.

Leptothrix ochracea — наиболее широко распространенная железобактерия, которая образует обильные скопления ржавых оксидов в медленно текущих ручьях, на болотах, на выходе железистых источников. Несмотря на ее широкое распространение, несмотря на признанное участие в образовании болотных железных руд, *L. ochracea* представляет едва ли не более загадочный организм, чем *Gallionella*. О последней известно хотя бы то, что она существует; относительно *L. ochracea* до сих пор нет твердой уверенности

в том, что это самостоятельный организм, а не форма роста другой бактерии, например *Sphaerotilus*.

Было сделано немало попыток культивировать этот организм в лабораторных условиях, и эти попытки имели кажущийся успех (Molisch, 1910b; Lieske, 1919; Cataldi, 1939; Pringsheim, 1949b; Калининко, 1939; Präve, 1957; Mulder, van Veen, 1963; Разумов, 1961a, б, в; Stokes, 1954). Во всех случаях оставалось сомнение, действительно ли исследователи имели дело с *L. ochracea* или каким-нибудь иным организмом. Можно считать твердо установленным, что некоторые штаммы *Sphaerotilus* дают влагалища, не отличимые от тех, которые приписывают *L. ochracea*. Мульдер и ван Вее, однако, приводят в пользу существования *L. ochracea* тот факт, что в искусственном железистом источнике, где рост *L. ochracea* был вполне типичным, ни один из выделенных ими 30 штаммов *Leptothrix* не давал такого роста.

Таким образом, сейчас для микробиолога *L. ochracea* — это определенная форма, морфологический вид, о физиологии которого можно сделать лишь догадки на основании наблюдений в естественных условиях. Вместе с тем это едва ли не важнейший вид железобактерий по той роли, которую он играет в природе.



Рис. 53. *Siderococcus limonilicus* (Заварзин, 1965)

Leptothrix ochracea образует тонкие железистые трубки строго одинакового диаметра, в которых почти никогда не наблюдаются живые клетки. Охристые осадки, содержащие эти трубки, особенно часто встречаются на болотах и в ручьях с медленным течением, где они образуют на дне пушистые округлые колонии от бледно-желтого до оранжевого цвета. Такие колонии постепенно растут и переполняют русло потока, превращая его в ступенчатую ржавую массу. Стоит, однако, взболтать такой осадок, чтобы убедиться, что твердые элементы занимают лишь ничтожную часть объема.

Железистая трубка представляет собой влагалище *L. ochracea*, которое бывает всегда гладким, неветвящимся, иногда слегка волнистым, и на всем своем протяжении сохраняет строго одинаковый диаметр (рис. 54). Внутренняя и внешняя поверхность влагалища резко очерчены и не имеют никаких неровностей. Внутренний диаметр ~ 1 мк, внешний $\sim 2-3$ мк. Поверхность влагалища имеет тонкую сетчатую структуру из косо расположенных нитей, которую иногда удается наблюдать и при помощи светового микроскопа.

Влагалище *L. ochracea*, подобно бактериям группы *Sphaerotilus*, образуется цепочкой цилиндрических клеток, которые обладают склонностью выскальзывать из влагалища, и, таким образом, только на одном конце трубки можно найти живой организм, вся остальная часть представляет покинутое влагалище. Клетки *L. ochracea* напоминают клетки *Sphaerotilus*, в них также наблюдаются капли липидных включений, освободившиеся клетки подвижны благодаря наличию жгутиков. Все эти признаки свойственны и другим бактериям группы *Leptothrix-Sphaerotilus*. Отличительным признаком *L. ochracea* служат его железистые влагалища, которые обладают редким постоянством формы. Это заставляет думать, что *L. ochracea* — один из самостоятельных видов мало изученной группы нитчатых бактерий. Развитие *L. ochracea* происходит, как правило, в слабо минерализованной воде болот и железистых источников и не сочетается с возможностью развития сульфатредуцирующих бактерий: осадки *L. ochracea* на глубине десятков сантиметров остаются не окрашенными в черные тона сульфидом железа. Организм способен развиваться при ничтожной концентрации железа в среде: пышное развитие *L. ochracea* возможно в воде болотистых ручьев, где концентрация железа не превышает величины порядка $0,1$ мг/мл и имеется полное насыщение среды кислородом воздуха. Развитие *L. ochracea* происходит при pH 6—7. Эта характеристика дает лишь общую картину развития организма, но на самом деле в колонии *Leptothrix*, где перемешивание ограничено, создаются более дифференцированные окислительно-восстановительные условия. Если фиксировать колонию *L. ochracea*, развивающуюся в мелкой воде, например, залив ее горячим агаром, то видно, что на самом дне нити параллельны его поверхности, а чем выше от дна, тем в большем беспорядке они располагаются, захватывая максимум пространства при

минимуме составляющего вещества. Нити *L. ochracea* никогда не бывают прикрепленными. Иногда на поверхности колоний можно заметить серый налет из еще недостаточно покрытых железом нитей.

Условия развития *L. ochracea* в природе полно описаны в работах Холодного (1953), Преображенской (1937, а, б) и Шарле и Шварца (Charlet, Schwartz, 1954), однако физиологических исследований с этим организмом, строго доказывающих его тип питания, еще не проведено. Поэтому все утверждения относительно того, что *L. ochracea* является автотрофом, можно считать голословными. Преве (Präve, 1957) считал *L. ochracea* литогетеротрофом, так как для развития культуры требовались одновременно



Рис. 54. Нити *Leptothrix ochracea* при развитии в накопительной культуре

закиссе железо и глюкоза в низкой концентрации. *Toxothrix trichogenes* впервые был описан Холодным (1953) под названием *Leptothrix trichogenes* и независимо от него Моллишем (Molisch, 1926) под названием *Toxothrix ferruginea*. *Toxothrix* встречается сравнительно редко в холодных железистых источниках, где рост организма бывает обильным и доминирующим. Холодный считал, что отдельные железистые нити образуются из соскальзывающего и скручивающегося влагалища в виде трубки, экскретиремого длинными нитевидными клетками (трихомами?), обладающими скользящим движением. Допускают (Krul et al., 1970), что ожелезнению подвергается выделяемая при движении слизь. Электрономикроскопические препараты показывают, что «влагалище» *T. trichogenes* состоит из пучка нитей, весьма напоминающих нити *Gallionella filamenta*, но расположенных параллельно, а не сплетенных между собой. Таким образом, железистые нити, образуемые *T. trichogenes*, не имеют ничего общего с истинными влагалищами нитчатых бактерий. Культивировать *T. trichogenes* пока не удалось (Pringsheim, 1949b).

ОКИСЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ЖЕЛЕЗА

Возможность образования отложений железа за счет разрушения органических комплексов, в виде которых железо мигрирует в почве, давно обсуждается в литературе. К сожалению, химия этих соединений так плохо разработана, что едва ли может служить основой для бактериологической работы. В случае, если разрушению подвергается органическая часть молекулы, микроорганизмы не должны накапливать избирательно какой-либо металл: железо, марганец или алюминий. Далее должно быть безразличным, в закисной или окисной форме находится металл. Миграция органических соединений может происходить и в щелочной среде, где ион железа образует нерастворимые гидроксиды. Специфика поведения таких веществ определяется органической частью молекулы. С целью изучить этот процесс было применено два приема. В одних экспериментах вместо природных соединений использовали химически определенные вещества, например, соли лимонной или щавелевой кислоты. Спыты этого типа дали возможность установить, что ряд организмов, образующих железистые отложения в природе, образует их и на этих солях, сохраняя типичную морфологию. В качестве примера можно назвать рост *Naumannella neustonica* на лимоннокислом аммиачном железе или рост *Vibrio extroquens*, имитирующий *Ferribacterium*, на закисном щавелевокислом железе, который мы наблюдали в нашей лаборатории. Второй прием заключается в экстрагировании из почвы гуминовых соединений железа, некоторой очистке их и выделении организмов, способных разлагать эти соединения с образованием отложений железа. Этот прием был с успехом применен Аристовской (1965) при изучении

подзольсообразовательного процесса. Естественно, что организмы, выделенные на таких средах, могут оказаться идентичными уже известным организмам, представляя лишь формы роста этих видов в условиях повышенного содержания железа. Это заставляет с большой осторожностью относиться к образованию новых родов только на основании способности отлагать железо. К бактериям, разлагающим органические соединения железа или марганца, прежде всего относятся *Siderocapsa* и *Naumannella* — микроорганизмы, отличающиеся формой отложений окислов в капсуле.

У *Siderocapsa* рыхлые отложения гидрата окиси железа или марганца покрывают слизистую капсулу, внутри которой может располагаться несколько клеток. Клетки *Naumannella* окружены тонкой плотной капсулой и располагаются поодиночке. Оба организма способны накапливать как отложения железа, так и марганца. В большинстве случаев они встречаются в водоемах, но с усовершенствованием методики микроскопирования препаратов в почве Аристовская (1965) и Тен Хак Мун (1968) показали связь этих организмов с отложением гидроокисей металлов в почвах. Несмотря на их характерную морфологию, особенно отложений ими железа, остается в силе предположение, что это функция неспецифических организмов в специфических условиях. До выделения в культуру и проведения сравнительных исследований приходится иметь в виду, что организмы этой группы следует рассматривать скорее как индикаторные формы, чем как самостоятельные таксономические единицы. Тем не менее геохимическая роль железобактерий, разлагающих органические комплексы, достаточно значительна, чтобы продолжить сбор материала и систематизацию, хотя бы под условными названиями.

Детальное экологическое исследование рода *Siderocapsa* было проведено Дрейком (Drake, 1965).

Siderocapsa Molisch, 1910

Род *Siderocapsa* имеет противоречивую историю. Организм был впервые описан Молишем (Molisch, 1910a), обнаружившим его на поверхности растений, растущих в воде со значительным количеством железа. Маленькие круглые или овальные пространства в этом материале представляли капсулы кокковидных бактерий (рис. 55). Свободные пространства составляли 1,8—3,6 мк, а клетки 0,4—0,6 мк. Молиш назвал организм *Siderocapsa treubii* и приписал ему значение при осаждении окислов железа на поверхности растений. Значительную дискуссию вызывал потом вопрос о трудности окраски организма. Бактерии встречались одиночно или небольшими группами, но не более восьми в капсуле. В растворе, содержащем марганец, отлагались его окислы. Во второй публикации 1910 г. Молиш (Molisch, 1910b) описал другой вид из поверхностной пленки воды: *S. major*, который находился в капсуле в числе

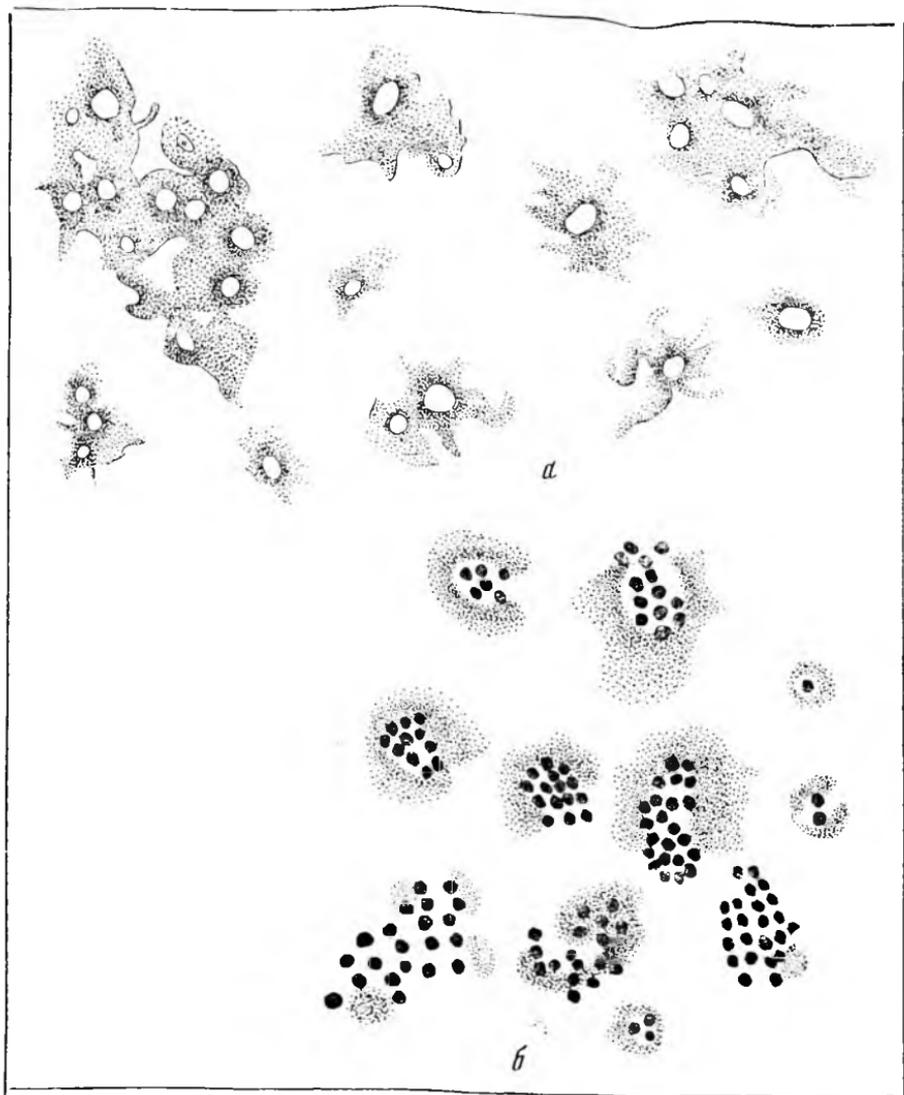


Рис. 55. *Siderocapsa treubii* (а) и *S. major* (б)

до 100 клеток размерами 0,7—1,8 мк. Работа Молиша была раскрытирована Холодным, но критика эта основывалась на мнении Холодного, что к железобактериям следует отнести только организмы с явно автотрофным обменом. Этому требованию не удовлетворяет и род *Sideromonas*, описанный самим Холодным. Дорф (Dorff, 1934) показал, что затруднения с окраской *Siderocapsa*

обусловлены медленным проникновением красящего вещества через капсулу. Редингер (Redinger, 1931) описал развитие *S. coronata* во время таяния снега. Этот организм был окружен бесцветной капсулой, в свою очередь покрытой отложениями гидроокиси железа. Клетки были кокковидными 3,5—9 мк диаметром, а вся колония достигала диаметра 24 мк, как максимум 400 мк. В материнале был обнаружен также марганец. Рутнер (Ruttner, 1938) нашел *S. coronata* в водоемах при пониженном содержании кислорода. В США Хардман и Хенричи (Hardmann, Henrici, 1939) описали *Siderocapsa* в озерах Висконсина и Миннесоты. Они обнаружили такое разнообразие форм, что выделение морфологических видов было поставлено ими под сомнение. Скуйя описал *S. eusphaera* с крупными клетками (Skuja, 1948) и *S. heminata* (Skuja, 1956) в планктоне. Таким образом, род *Siderocapsa* был принят большинством исследователей и хорошо иллюстрирован фотографиями и рисунками. Все соглашались, что кокки или короткие палочки были погружены в различном числе в капсулу, в свою очередь окруженную желтыми или коричневыми отложениями, содержащими железо или марганец. Прингсхейм в 1949 г. (Pringsheim, 1949b) усомнился в существовании этого рода и счел *Siderocapsa* прикрепительным диском *Sphaerotilus*. Дело в том, что *Siderocapsa* удается наблюдать преимущественно методом стекол обрастания.

Дрейк (Drake, 1965) исследовал стекла обрастания, причем срок экспозиции при 20° был сутки, при 6—8° около недели и при 0° — две недели. Размеры исследованных организмов и данные, взятые из литературы, были нанесены на график и не обнаружили бимодального распределения, которое могло бы указывать на существование нескольких видов. Аналогичные результаты были получены для капсул: данные перекрывались. Клетки могли сравнительно легко покинуть капсулу. Развитие колонии начиналось с того, что одна или две клетки отлагали овальный или круглый обруч гидроокиси железа, сначала очень тонкий, но который потом быстро утолщался. Затем возможны несколько альтернатив: часть клеток может покинуть капсулу; клетки могут увеличиваться в числе, разрывая капсулу и придавая ей вид подковы, продолжающийся рост приводит к образованию восьмерок; отложение железа может продолжаться до тех пор, пока внутренняя капсула не станет покрытой окислами и невидимой, и тогда трудно обнаружить происхождение этих комков железа.

Начиная с работ Молиша и Хардмана и Хенричи предполагается, что организм использует гуматы железа, окисляя органический радикал и отлагая остающееся железо. Тогда в водах с высоким содержанием железа должно происходить быстрое накопление гидроокиси, а в водах с низким содержанием железа такой же рост должен сопровождаться меньшим отложением гидроокиси.

S. treubii Дрейку удавалось обнаружить в альфа- и бетамезосапробных водоемах, она отсутствовала в полисапробных и

в олиготрофных и дистрофных водоемах. Организм обнаруживали при рН 7, один случай — при рН 6,75. Прямой корреляции с содержанием железа, если оно присутствует, не было обнаружено. Экологические наблюдения говорят, что это, по-видимому, эвригермный организм, развивающийся при 4—16°.

В планктоне озер часто встречаются также *Planktomyces (Blastocaulis)*, *Ochrobium*, *Spirothrix (Leptothrix) pseudovacuiolata*, *Pasteuria (Blastobacter)*. Детальные исследования Дубининой круговорота железа в озерах, сопоставившие гидрохимические данные с количественным учетом видового состава бактерий (Соколова, 1959; Соколова-Дубинина, Дерюгина, 1967, 1968), привели к заключению, что в мезотрофных озерах минерализация и осаждение железа обуславливаются деятельностью перечисленных микроорганизмов.

В подзолистых почвах Аристовская (1965) обратила внимание на образующую розетки *Seliberia stellata*, которая обычно бывает покрыта оксидами железа, и *Pedomicrobium*, позднее описанный в трубопроводах как причина их зарастания под названием *Hypomicrobium* (Tyler, Marshall, 1967). *Pedomicrobium* очень широко распространен в почвах и является причиной образования орштейнов в подзолах (Aristovskaja, Zavarzin, 1970).

ОКИСЛЕНИЕ МАРГАНЦА МИКРООРГАНИЗМАМИ

Способность микроорганизмов концентрировать окисные соединения марганца известна давно и привлекалась геохимиками для объяснения круговорота этого элемента. Гипотеза биогенного происхождения отложения окисных соединений марганца принадлежит Вернадскому (1936). Однако в последнее время большинство геологов и геохимиков придает микроорганизмам лишь второстепенное значение в концентрировании марганца, считая, что для объяснения основных закономерностей процесса достаточно физико-химических механизмов (Krauskopf, 1957; Arrhenius, 1963; Страхов, 1947, 1962). Отрицая участие микроорганизмов, эти авторы подчеркивали, что биогенная гипотеза основана лишь на беглых полевых наблюдениях. Сейчас сведения об окислении марганца микроорганизмами значительно расширились.

Соединения марганца в природных условиях содержат элемент в двух- и четырехвалентной форме. Устойчивость этих соединений зависит от физико-химических условий. Термодинамические расчеты позволяют количественно установить соотношение между соединениями марганца (Krauskopf, 1957; Листова, 1961). Из диаграммы полей устойчивости (рис. 56) видно, что ион Mn^{2+} в той концентрации, в которой он встречается в природе, устойчив почти во всех природных средах, кроме морской воды, когда идет фотосинтез. Точно так же термодинамически устойчивы углекислый

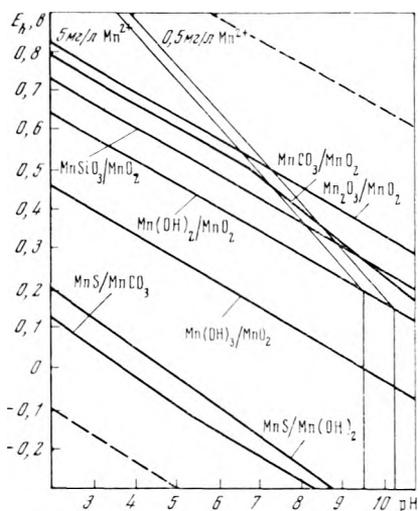


Рис. 56. Поля устойчивости соединений марганца, находящихся в равновесии с двуокисью марганца, в координатах $E_h - pH$ (Krauskopf, 1957)

Пунктир — поле устойчивости воды

коллоидных растворов или взвесей. Они склонны к концентрированию в виде пленок, конкреций, ортштейнов.

Соединения двух- и четырехвалентного марганца связаны между собой реакцией



При pH 8, концентрации Mn^{2+} 10^{-9} М, давлении O_2 0,25 атм свободная энергия реакции составляет -9 ккал. Она слишком мала, чтобы обеспечить возможность автотрофного существования микроорганизмов.

Биологическая природа окисления марганца в почве была установлена с помощью перколяторов (Mann, Quastel, 1946). После установления равновесия марганец быстро исчезал из раствора, накапливаясь в почве в виде окислов. Добавление антисептиков подавляло процесс, и это указывает на его биологическую природу. Если новый перколятор, заполненный стеклянной ватой, засеять раствором из действующего перколятора, то ход процесса повторяется (Заварзин, 1962). Окисление марганца в перколяторе происходит экспоненциально. Отсюда можно заключить, что окисление марганца вызывается размножающейся культурой микроорганизмов. Биологическая природа превращения соединений мар-

ганец (родохрозит) и силикат марганца родонит (орлец). В присутствии окислов марганца устойчивы только соединения окисного железа, и при любых значениях E_h есть область, охватывающая по меньшей мере три единицы pH , в которой термодинамически оправданная концентрация Fe^{2+} в растворе ниже $0,01$ мг/л, а Mn^{2+} — выше 1 мг/л. Это значит, что ион марганца может мигрировать при реакции среды ниже pH 8, когда железо может мигрировать лишь в виде взвеси или комплексов. В зоне окисления наиболее устойчивый минерал двуокись марганца MnO_2 (широлюзит). В нее превращается аморфный гидрат двуокиси марганца (вернадит), Mn_2O_3 (браунит), Mn_3O_4 (гаусманит). Окислы марганца практически нерастворимы и могут мигрировать лишь в виде

ганца в иловом профиле была доказана сопоставлением морфологической картины образования вторичного илового профиля в изолированных пробах, оставленных без обработки с простерилизованными пробами (Перфильев, Габе, 1964).

Восстановление окислов марганца осуществляется факультативно анаэробными микроорганизмами, которые понижают окислительно-восстановительный потенциал среды. Среди них особенно активны энтеробактерии и бациллы. Восстановление марганца может идти и в аэробных условиях (Söhngen, 1914; Branter, 1970). Особый интерес представляет восстановление двуокиси марганца окисляющим серу *Thiobacillus thiooxidans*, которое могло происходить, по утверждению авторов, через коллоидную мембрану (Vavra, Frederick, 1952).

Помимо восстановления продуктами обмена, двуокись марганца восстанавливается суспензиями бактерий в присутствии следов переносчика, такого как пиоцианин или метиленовая синь. В ферментных препаратах восстановленные НАДН и ФАДН окислялись двуокисью марганца в присутствии цитохрома с как переносчика (Hochster, Quastel, 1952). Сейчас, однако, нет оснований думать, что существуют специализированные формы микроорганизмов, подобные денитрификаторам, для которых двуокись марганца служит акцептором электрона.

Ферментативный механизм окисления марганца в двуокись требует окислителя с очень высоким потенциалом. Из биологических окислителей, — если исключить систему выделения кислорода зелеными растениями, в которой марганец играет существенную роль, — окислять марганец могут перекиси. Кентен и Манн (Kenten, Mann, 1949, 1950) показали, что в присутствии пероксидазы перекись водорода окисляет марганец. Это единственный вероятный биохимический механизм для процесса биологического образования окислов марганца.

Существование питчатых бактерий, накапливающих окислы марганца во влажных местах, было установлено гидробиологами в конце прошлого века. Работы Молиша (Molisch, 1910b) и Лиске (Lieske, 1919) привели к заключению, что эти организмы осаждают и железо и марганец. Наиболее изученным представителем их является *Leptothrix (Sphaerotilus) discophora* (Mulder, van Veen, 1963; Stokes, 1966), но окисление марганца осуществляют также *L. echinata*, *L. lopholea*, *L. pseudochracea*, *L. cholodnii*, *L. sideropus*, *Crenothrix manganifera*, *Siderocapsa*, *Naumanniella*.

В почве окисление марганца вызывают другие организмы. К ним относятся различные почвенные грибы (Beijerinck, 1913; Мирчиник и др., 1970) и бактерии. Марганецокисляющие микроорганизмы можно обнаружить на почвенном агаре, к которому добавляют агаризованный раствор серноокислого марганца, заливая его в выемку (Gerretsen, 1937). Такими методами удалось показать, что марганец окисляется очень большим числом микроорганизмов, чуть

ли не 70% почвенной микрофлоры (Timonin, 1950). Коллекционные культуры *Bacillus subtilis*, *B. pumilis*, *B. circulans*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, *Pseudomonas convexa*, *Achromobacter sp. sp.*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Esherichia* (Bauernfeind, Poschenrieder, 1960, Гродзинская, 1962) на среде с пептоном также осаждают марганец, но этот метод малоприменим, так как в присутствии пептона марганец может окисляться химически при аммонификации (Branter, 1970).

Культура специфического марганецоксиляющего организма *Bacillus manganicus* была выделена Бейеринком (Beijerinck, 1913).

Выделение марганецоксиляющих организмов обычно осуществляется на среде, бедной органическими веществами, к которой добавляется углекислый марганец или низкие концентрации растворимых соединений, таких как уксуснокислый или сернокислый марганец. Колонии марганецоксиляющих организмов появляются в виде коричневых пятен и из них легко выделить бактериальные культуры. Применение такого метода показало, что окисление марганца способны вызывать разнообразные микроорганизмы и что для многих из них образование отложений марганца является скорее реакцией на специфические внешние условия, чем специфической физиологической функцией. Своеобразной чертой окисления марганца этими малоспециализированными микроорганизмами является симбиотическое осуществление процесса: выделенные в чистую культуру организмы, принадлежащие в одном случае к родам *Corynebacterium* и *Flavobacterium* (Bromfield, Skermap, 1950; Bromfield, 1956), в другом — к роду *Pseudomonas* (Заварзин, 1962), неспособны производить окисление. Смесь обоих организмов начинает окисление марганца.

Все упомянутые организмы являются типичными гетеротрофами, и это означает, что окисление марганца есть побочная функция каких-то широко распространенных биохимических систем.

Поскольку окислы марганца в высокой степени нерастворимы, то они отлагаются непосредственно около клетки, причем форма этих отложений может быть характерна для определенных видов микроорганизмов. Темная окраска окислов марганца бросается в глаза при микроскопическом просмотре, и поэтому применение прямых методов позволило получить значительную информацию о накоплении окислов марганца микроорганизмами в почвах. Характерная форма отложений окислов железа и марганца дала возможность построить систему «морфологических видов», которые являются индикаторными. Систематические исследования в подзолистых почвах, проведенные Аристовской (1965), показали, что агентами, ответственными за образование ортштейнов и отложений железа и марганца в этих почвах, являются микроорганизмы: марганцевые и железные конкреции, по сути дела, представляют собой разросшиеся и покрытые вторичными отложениями колонии *Pedomicrobium* и других микроорганизмов. К аналогичному

выводу на основании исследований донных отложений водоемов прицели Буткевич (1928), Калининко (1946), Перфильев (1926).

Перфильев (Перфильев, Габе, 1961), наблюдая за процессами, происходящими в изолированных пробах донных отложений рудоносных озер Карелии, смог установить ряд закономерностей и открыть новые организмы. В изолированных пробах ила происходит образование вторичного диагенетического профиля: в глубине ила идут восстановительные процессы, железо и марганец переходят в растворимое состояние. На поверхности идет окислительный процесс. В нестерильных образцах микроорганизмы, окисляющие железо и марганец, начинают образовывать уровни развития, которые приводят к появлению микрозон отложений окислов металлов; ближе к поверхности отлагается коричневая полоска окислов марганца, а под нею располагается зона окислов железа. В стерильном контроле микрозоны не образуются. Каждая из микрозон имеет наиболее характерных представителей, причем благодаря применению капилляров, которые позволяют извлекать образцы для просмотра в ненарушенном состоянии, удалось установить тонкую структуру микрозон и убедиться, что марганецокисляющие микроорганизмы опускаются ярусами сверху вниз, навстречу восстановленным веществам. Наиболее типичные для этих микрозон организмы обладали своеобразной морфологией и были объединены Перфильевым в сем. *Metallogeniaceae*, представителями которого являются *Metallogenium*, *Caulococcus*, *Kusnezovia*. Все они имеют весьма мелкие клетки и характерной формы микроколони, покрытые окислами марганца.

Выделение одного из них — *M. symbioticum* в лабораторную культуру (Заварзин, 1961б) позволило установить его основные характеристики. В присутствии марганца *Metallogenium* выглядит как «паучок», образованный нитями, покрытыми окислами марганца и расходящимися из одного центра. В культуре организм развивался только в присутствии гриба, причем освободить гриб от *Metallogenium* не удавалось ни серией пересевов на органических средах, ни микроманипуляцией с отделением свободных концевых клеток мицелия гриба. Это заставило прийти к заключению, что на какой-то стадии развития *Metallogenium* является паразитом гриба, скорее всего внутриклеточным. Обильное развитие *Metallogenium* сопровождалось подавлением роста гриба и, наоборот, пышный рост гриба приводил к подавлению *Metallogenium* и, следовательно, окисления марганца. Окисление марганца протекало как строго аэробный процесс и начиналось с появления мелких округлых клеток *Metallogenium*, которые быстро, в течение нескольких часов, прорастали тонкими нитями. Нити покрывались окислами марганца, и белая или бесцветная среда становилась все более и более интенсивно коричневой. С течением времени характерные «паучки» *Metallogenium* начинали покрываться все более плотными окислами марганца и теряли форму. Интенсивность окис-

ления марганца много выше, чем у *L. discophora*. Процесс шел при рН 6,2, когда химическое окисление марганца кислородом воздуха не происходит, и приводил к резкому повышению окислительно-восстановительного потенциала среды, достигавшего +0,7 в. При таком потенциале возможен целый ряд вторичных чисто химических процессов, и поэтому окисление марганца микроорганизмами может явиться причиной создания характерной геохимической обстановки. В окислении марганца можно различить два этапа: биологическое окисление, которое вызывается *Metallogenium*, и термостабильный химический процесс, который давно известен для окислов марганца. Продуктами окисления является смесь окислов марганца, имеющая тенденцию перейти в конечном итоге в двуокись марганца (Косая, 1967). Поскольку *Metallogenium* развивается только в присутствии гриба, а этот последний растет за счет органических веществ, таких как крахмал, *Metallogenium* ником образом нельзя рассматривать как автотрофный организм. Отложенные окислы марганца может играть для него структурную роль. Морфология *Metallogenium* также оказалась исключительной: основным элементом были необычайно тонкие нити — аралии, вокруг которых отлагались окислы марганца (рис. 57) (Заварзин, 1963). Такие размеры исключают наличие клеточной структуры.

В тех случаях, когда окисление марганца не происходит, колонии *Metallogenium* выглядят как пучки полупрозрачных для электронов нитей (рис. 57, а). Изучение *Metallogenium* было продолжено Дубининой (Dubinina, 1970). На средах без марганца, но ее электрономикроскопическим наблюдениям, *Metallogenium* сохраняет характерную морфологию в виде «паучков». Посев фильтрата смешанной культуры гриба и *Metallogenium* на среду для микоплазм дал рост, характерный для микоплазм. То что микоплазмы не были случайным загрязнением культуры гриба, было доказано их обратным посевом в среду с марганцем, к которой добавляли 0,01—0,1% лошадиной сыворотки и 0,001% ДНК. В этих условиях чистая культура микоплазмы окисляла марганец с образованием характерных колоний *Metallogenium*. Посев на среду для микоплазм вновь дал типичные микоплазменные колонии. Дубинина заключила, что *Metallogenium* является микоплазма-подобным организмом и может развиваться, только паразитируя на других организмах. В подтверждение этого предположения она заражала коллекционные культуры грибов фильтратом *Metallogenium*, и после этого они приобретали способность окислять марганец.

У *Metallogenium* и, по-видимому, других организмов сем. Metallogeniaceae отсутствие ригидной оболочки компенсируется чехлом окислов марганца, и они получают возможность существовать в различных почвах и водоемах. Окисление марганца является для этих организмов, конечно, специфической функцией, но, вероятно, не энергетической.

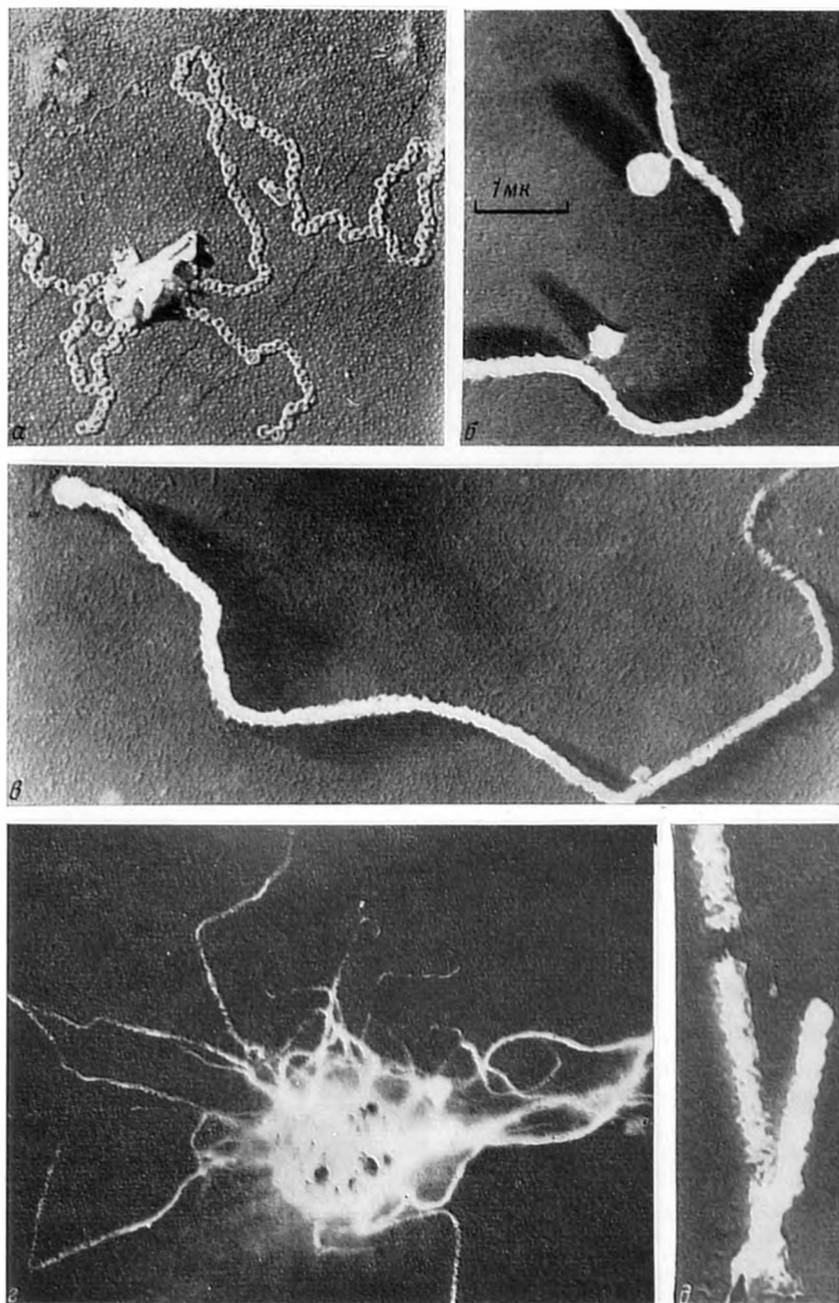


Рис. 57. *Metallogenium symbioticum* (Заварзин, 1965)

а — мутант *Metallogenium*, не окисляющий марганца; б — образование почек из нитях;
 в — концевая нить, выходящая из округлого тела, покрытая оксидами марганца
 г — общий вид колонии при малом увеличении; д — нить с разрывами, в которых видна
 осевая нить — арабий

Аналогичную до известной степени роль играет марганец и у нитчатых бактерий, где отложение оксидов марганца в слизистом чехле предохраняет организм от поедания хищниками. Окисление марганца нитчатыми бактериями и отложение его оксидов в слизистом чехле широко наблюдается в природе. В лаборатории накопить эти организмы проще всего, поместив в широкий цилиндр охристую массу железобактерий. Через некоторое время на стенках сосуда можно заметить маленькие коричневые кустики *Leptothrix*, осаждающих марганец. Культуры видов, близких к *Leptothrix discophora*, легко выделяются на среде с небольшим количеством органического вещества, например сennого отвара, следами марганца и витамином В₁₂ (Савельева, 1965).

Окисление марганца в чистых культурах *Leptothrix* (*Sphaerotilus*) *discophora* много ниже, чем у *Metallogenium* (рис. 58).

Очевидно, что отложение марганца происходит в таких условиях, когда не идет химическое окисление и ион марганца доступен для микроорганизмов, а, с другой стороны, образовавшиеся оксиды вполне устойчивы и не подвергаются спонтанному восстановлению. Это определяет область развития марганецотлагающих микроорганизмов примерно в пределах рН от 6 до 8. В этой области железо неустойчиво в растворе и не мигрирует. Отсюда возникает возможность разделения железа и марганца в биогеохимических процессах, концентрации марганца в виде биогенных оксидов и образования осадочных марганцевых руд без примеси железа, существование которых с чисто физико-химической точки зрения не поддается легкому объяснению.

Наиболее подробно изучено образование железомарганцевых конкреций в железорудных озерах Карелии. Образующиеся там конкреции сохраняют радиально концентрическую форму колоний микроорганизмов, на которых они образовались. Этими организмами считают либо синезеленые водоросли (Штернберг и др., 1968), либо *Leptothrix* (Калининко, 1946), либо организмы группы *Metallogenium* (Перфильев, Габе, 1961, 1964). Дубинина (Соколова-Дубинина, Дерюгина, 1967) дала общую схему биогенного круговорота марганца в таких озерах. Марганец поступает в озеро

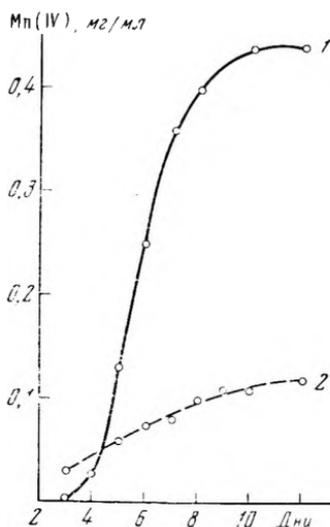


Рис. 58. Окисление марганца культурами *Metallogenium* (1) и *Leptothrix discophora* (2)

с окружающих болот в виде взвеси *Metallogenium* и коллоидных растворов. В придонных слоях происходит восстановление марганца бактериями. При выносе обогащенных марганцем глубинных вод на хорошо аэрируемое мелководье происходит стабилизация окисленного марганца в окислительной зоне в виде конкреций, образованных *Metallogenium*.

Железо-марганцевые конкреции глубоководных частей океана образуются на топографических высотах дна, сложенных окисленными породами. Они покрывают около 10% дна Тихого океана, составляя до 10 кг/м². Скорость прироста составляет для них 1 мк/год, и окисление происходит непосредственно на поверхности осадка. Механизм осаждения не выяснен, допускаются адсорбция, неорганическое окисление, электрофоретический перенос, бактериальное окисление. Извлеченные со дна конкреции подвергаются быстрым бактериальным превращениям, но совершенно неясно, можно ли экстраполировать эти данные на условия глубин океана.

Концентрация марганца на раковинах моллюсков в море происходит со скоростью 20—40 мк/год (Allen, 1960) и его удалось воспроизвести в лаборатории (Заварзин, 1964) на раковинах *Macoma baltica*. Процесс заключался в обменной реакции растворенного иона марганца с карбонатом кальция и в последующем бактериальном окислении марганца при участии *Mycoplana*.

Данные по биологии микроорганизмов, осаждающих марганец, позволяют составить предполагаемую схему их участия в образовании марганцевых месторождений (Заварзин, 1965). Наибольшее промышленное значение имеют осадочные месторождения, генетически связанные с мелководными химическими осадками (Бетехтин, 1946). Массового отложения окислов железа в момент отложения марганца не происходило. Вблизи береговой линии откладывались первичные окисные руды, на удалении — карбонатные, образование которых шло при обилии органического материала и недостатке кислорода. При выходе карбонатных руд на поверхность на них образуются так называемые марганцевые шляпы окисных руд. Источником марганца был, по-видимому, вынос реками концентрированных растворов или взвесей, которые окислялись и осаждались при повышении рН морской воды. Этот процесс мог идти химически, но основная трудность, с которой встречается теория хемогенного образования окислов марганца, заключается в том, что растеор должен быть очень концентрированным, чтобы осаждение происходило локально. Вторая трудность состоит в механизме образования взвесей окислов марганца, практически не содержащих железа.

Как следует из описания окисляющих марганец микроорганизмов, они развиваются в условиях полностью подавленной миграции железа. Образование взвесей марганецокисляющих бактерий в планктоне озер и водохранилищ многократно описано (Францев, 1959;

Panknin, 1941; Rechačkova, 1963). Источником марганца служит поступление его из окружающих болот и выщелачивание из почвы при затоплении, вызываемое деятельностью факультативно анаэробных бактерий. Взвеси переносятся течением. Сохранение образовавшихся окисных соединений марганца возможно при отложении их в условиях резко окислительной обстановки, например, в зоне интенсивного фотосинтеза на мелководье. Погребенный в отложениях марганец может восстанавливаться в карбонат при разложении органического вещества, но ион марганца не будет мигрировать, так как при выходе его в окисную зону он будет окислен бактериями. Этот процесс может привести к дополнительной концентрации марганца. Восстановленные формы марганца сохраняются, когда миграция оказывается ограниченной отложением перекрывающих осадков.

ОТЛОЖЕНИЕ ЖЕЛЕЗА

Открытие железобактерий и установленное вскоре широкое распространение их в современных железистых осадках привело к убеждению, что эти организмы играют существенную, едва ли не определяющую роль в формировании осадочных руд железа (Baier, 1937). Сторонником гипотезы биогенного происхождения осадочных руд железа и марганца был Вернадский (1936), с общетеоретическими взглядами которого биогенная теория хорошо согласовалась. Анализ геологических и физико-химических условий образования руд железа, марганца и алюминия привел Страхова к убеждению, что биогенная теория происхождения железных и марганцевых руд малообоснована фактическим материалом и противоречит ему. Биогенная теория была подвергнута Страховым уничтожающей критике (Страхов, 1947), и впоследствии он подтвердил свою точку зрения (Страхов, 1962).

Аргументация Страхова сводится к следующему.

1. В железных рудах отсутствуют, за редчайшим исключением, даже полудостоверные следы бактериальных структур, хотя ископаемые остатки железобактерий известны для соответствующих горизонтов.

2. Подавляющая часть руд по своему минералогическому составу исключает участие железобактерий, так как в этих рудах железо находится в восстановленном состоянии.

3. В общих закономерностях гипергенного железорудного процесса не только не обнаруживается влияние биологического фактора, но встречаются соотношения, противоречащие предвидениям любой биогенной концепции. Пространственное размещение железных руд обусловлено тем, что они могут возникнуть отнюдь не везде, а лишь там, где это «позволено» геоморфологическими, литологическими и тектоническими условиями.

4. В противоположность биологическим, химические закономерности отчетливо прослеживаются в распределении осадочных руд железа.

Страхов приходит к следующему выводу: «В общем круговороте железа в зоне гипергенеза роль железобактерий, если основываться на всех современных данных по их биологии и распространению в природе, должна быть признана несомненно очень большой, и, по аналогии с этим, формирование железных руд следовало бы, казалось, рассматривать как в основном биогенный процесс. Независимый же фактический анализ этой проблемы приводит к прямо противоположным результатам: участие железобактерий было случайным, ничтожным и не имело сколько-нибудь заметного значения.

Возникновение и исчезновение железорудных эпох, пространственная локализация руд в течение отдельных эпох от начала до конца регулировались чисто геологическими факторами: движениями земной коры, размещением климатических зон, геоморфологическими, литологическими и тектоническими особенностями субстрата на разных участках литосферы. Самое же выпадение железа из растворов представляло в решающей основной массе чисто химический окислительный и коллоидно-химический процесс» (Страхов, 1947, стр. 249). В 1962 г. Страхов подтверждает этот вывод, считая осадочные железные руды «типично хемогенным образованием». Чтобы выйти из создавшегося противоречия, Страхов предположил, что образование руд железа представляет специфический случай в общем круговороте железа. Во-первых, рудные концентрации возникали в условиях восстановительной среды, во-вторых, в аэрируемой среде условия были неблагоприятными для железобактерий.

Противоречие между несомненно большим значением микроорганизмов в современном круговороте железа и отрицанием их сколько-нибудь значительной роли в образовании рудных отложений заставляет искать возможности разрешения этого противоречия.

Отсутствие бактериальных структур в осадочных железных рудах нельзя рассматривать как серьезный аргумент: при накоплении железистых осадков структуры железобактерий разрушаются в течение нескольких недель. Особенно быстро исчезают остатки *Gallionella* и *Toxothrix*; *Leptothrix* несколько более устойчив. За этим процессом легко наблюдать, собрав в пробирку железистый осадок; особенно быстро разрушение идет в восстановительной обстановке. В природных условиях также легко наблюдать этот процесс. Влагагища *Leptothrix*, попадая в ручей с быстрым течением, перетираются и измельчаются в порошок, через десяток метров от места развития уже не удастся различить их структур. Накопление большой массы осадков приводит к их спрессовыванию, и на глубине 10—20 см плотный осадок железа уже не содержит оформленных структур. Погребение осадков железобактерий приводит к такому же результату, что было очень наглядно

видно на примере ископаемого болота в кальдере вулкана Головкина (Заварзин, 1966). Итак, накопление массы железобактерий есть условие, препятствующее сохранению их оформленных структур.

Восстановленное состояние железа в большинстве осадочных руд хорошо объясняется фактом, на котором основывается сам Страхов: присутствие в осадках 0,3% органического углерода приводит к восстановлению железа. Сами железобактерии при хемоавтотрофном образе жизни образовывали бы примерно 0,2% органического углерода. Таким образом, наличие восстановленных форм согласуется именно с биогенной теорией.

Утверждение Страхова, что формирование руд контролируется геологическими, а не биологическими факторами, несомненно, должно быть принято. Микроорганизмы, конечно, могут принимать участие не в формировании железных руд, а железистых осадков, из которых формируются руды. Первичное образование гидроокиси железа и последующее создание отложений железа могут быть разделены в пространстве и времени. То, что в распределении железных руд не обнаруживается действие биологических закономерностей, вполне объясняется тем, что сохранение железистых осадков в виде руд обуславливается совпадением специфических геологических условий. Ископаемые железистые осадки могут быть обнаружены там, где они сохраняются, а не там, где они возникают. То, что положения биогенной гипотезы не могут быть использованы в качестве понсковых критериев, отнюдь не означает, что они несправедливы.

Итак, возражения Страхова против биогенной гипотезы нельзя рассматривать как опровергающие ее. Теперь следует выяснить, насколько положения биогенной гипотезы противоречат общим закономерностям образования железистых отложений, установленным Страховым (1962).

По его мнению, формирование осадочных железных руд связано с дренажем высокожелезистых вод, возникавшим в областях более или менее значительного заболачивания. Железо, мобилизованное в болотах, выносится из них в виде бикарбоната. При попадании вод в реку углекислота улетучивается, а кислород окисляет железо бикарбоната в гидроокись. Растворы железа и марганца сопровождалась растворами малых элементов, и при коагуляции главного компонента — гидроокиси железа — гель его захватывал остальные элементы, так что одновременно происходила их садка. Судьба окислов железа зависела от размеров водотока. В крупных реках осадок железа оседал вдоль магистрального водотока, частично размазываясь в его аллювии, частью концентрируясь в отдельных местах и образуя руды. Мелкие реки сносили осадок в конечный водоем. Осадок, впервые сконцентрированный в западнее речного русла, никогда не превращался в стабильное рудное тело и сохранялся лишь в течение ограниченного промежутка времени. За этот период он успевал минералогически и структурно переработаться

и превратиться в руду. Затем линза вскрывалась потоком, железистый материал взмучивался и переносился до нового места накопления. Окончательной ловушкой для железистых осадков становилась прибрежная часть моря.

Из этого описания видно, что в осадочных железистых рудах вряд ли можно наблюдать какие-либо морфологические следы их первоначального происхождения. Следовательно, вся аргументация против биогенной теории, основанная на составе железных руд, оказывается несогласованной с общими закономерностями образования железистых отложений. Таким образом, биогенная гипотеза призвана объяснить происхождение только первичных железистых осадков. Именно в этом пункте хемогенная гипотеза оказывается мало аргументированной: Страхов не приводит доказательств, что первичные осадки железа образуются чисто химическим путем. В то же время микробиологи, которые много исследовали эти первичные осадки, приходят к выводу, что в большинстве случаев они содержат железобактерии. Исключения, когда первичный осадок гидроокиси железа не имеет явных признаков бактериальной деятельности, сравнительно редки и относятся к условиям резкого изменения физико-химических показателей, как например, быстрая дегазация железистых вод при выходе на дневную поверхность или смешение кислых железистых вод с пресными (Заварзин, 1966). В пользу хемогенной гипотезы остается лишь тот аргумент, что и без бактерий происходило бы окисление железа, быть может, лишь более медленное. В пользу этого взгляда приводят существование джеспиллитовых осадочных руд железа, которые образовались до появления достоверных признаков жизни на земле. Эти руды, однако, окисные (Варенцов, Формозова, 1962) могли образоваться в присутствии свободного кислорода, который, по общепринятому мнению, появился лишь с развитием фотосинтеза, следовательно, и железобактерии могли существовать в это время.

Таким образом, трудно представить себе лучшую геохимическую основу, чем круговорот железа, как его рисует Страхов, для построения такой гипотезы происхождения железистых осадков, в которой железобактерии играли бы роль первичного осадителя и концентрата железа.

СИСТЕМАТИКА ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ

Железобактерии нельзя рассматривать как таксономическую единицу, в которой организмы объединены общностью происхождения. Железобактерии — это физиологическое и экологическое понятие, удобное с практической точки зрения. Именно практические соображения заставляют сохранять этот термин и рассматривать среди железобактерий организмы, не только различающиеся морфологически, но и разнообразные по своей физиологии.

Большинство этих организмов описано на основании наблюдения препаратов из природного материала. Если подсушенный препарат железобактерий заключить в иммерсионное масло, то вследствие сходства показателей преломления бактериальные клетки не видны и получается чистый препарат железистых отложений. Если же предполагают рассматривать и клетки, то обычно прибегают к окраске железа желтой кровяной солью в I н. HCl по реакции берлинской лазури с докраской бактерий, например, эритрозином, что позволяет наблюдать материал на мембранных фильтрах (Соколова, 1961). Влажные препараты удобно окрашивать раствором люголя (Холодный, 1953) или слабым раствором метиленовой синей. Все сведения относительно железобактерий получены с помощью таких методов. Благодаря высокой чувствительности реакции берлинской лазури на окисное железо в число железобактерий попали организмы, отлагающие даже следы железа. Поскольку на препаратах такого рода трудно бывает отличить клетки, составляющие трихом синезеленой водоросли, цепочку клеток истинной нитчатой бактерии типа *Sphaerotilus* и даже мицелий грибов, то не удивительно, что число описанных форм железобактерий очень велико. Сводка их названий дана Прингсхеймом (Pringsheim, 1949a).

Существенным является вопрос, специфично ли отложение железа для определенного вида или же оно представляет реакцию разнообразных организмов на сходные условия. Так, исследователи, изучавшие группу нитчатых бактерий, единодушно приходят к выводу, что влагалница этих гетеротрофных организмов в присутствии солей железа пропитывается окислами железа. Известно, что отложение окислов железа — это автокаталитический процесс, поэтому, раз начавшись, отложение железа продолжается, и влагалница превращаются в толстые ломкие трубки. Поверхность таких влагалниц обычно бугорчатая (Cataldi, 1939; Каляшенко, 1939; Pringsheim, 1949b; Разумов, 1961б).

Таким образом, несомненно, что из большого числа описанных форм «нитчатых железобактерий» некоторые на самом деле являются обычными бактериями или синезелеными водорослями, на чехле или в слизи которых концентрируется железо. Таксономическая ценность таких наблюдений очень ограничена. Физиологическое значение отложения железа в большинстве случаев представляет, по-видимому, совершенно побочную функцию.

Морфологически железобактерии могут быть отнесены: к истинным бактериям (Eubacteria), нитчатым бактериям (Trichobacteria), почкующимся бактериям (Blastobacteria) и, по-видимому, к микоплазмам (Mollicutes).

Большинство истинных бактерий объединено в сем. Siderocarpaceae Prigra, 1929, которое, безусловно не представляет однородной группы. Физиология их, за исключением *Thiobacillus ferrooxidans*, не изучена в лабораторных культурах. Многие описания

сделаны на основании беглых наблюдений в природе над стеклами обрастания, и совершенно неясно, не скрывается ли под названием железобактерии обычный микроорганизм, который в специфических условиях оказывается покрытым окислами металлов. Так, сомнительную ценность имеют роды *Siderosphaera*, *Sideronema*, *Ferribacterium*, *Sideromonas*, *Siderobacter*. Организмы, принадлежащие к родам *Siderocapsa*, *Ochrobium*, *Naumanniella*, *Siderococcus*, напротив, встречаются иногда в значительных количествах в природе и принимают заметное участие в круговороте железа, хотя многие из них не связаны между собой генетически. *Seliberia stellata*, которой Аристовская (1965) придает большое значение в образовании железистых отложений в подзолистых почвах, несомненно, один из свободноживущих видов организмов, близких к *Agrobacterium*. Она окисляет различные органические вещества и, в частности, разлагает органо-минеральные комплексы металлов. *Naumanniella* развивается на лимоннокислом железе, осаждавая гидрат окиси железа в виде рыхлого осадка и в виде элегантной капсулы вокруг клетки. *Vibrio extroquens* при окислении щавелевокислого железа имитирует рост *Ferribacterium*.

Разложение органических соединений железа осуществляют и почкующиеся бактерии. Эти организмы характеризуются размножением почкованием (Заварзин, 1961б), при котором происходит не деление клетки на две равноценные сестринские, а от материнской клетки отделяется дочерняя, отличающаяся от нее размерами, формой, подвижностью. Почкующиеся организмы легко распознать по нитевидным выростам — простекам — диаметром около 0,2 мк. В выростах есть оболочка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма и на конце их образуется дочерняя клетка — почка. Типичным представителем почкующихся бактерий является *Hyphomicrobium*. К железобактериям относятся почкующиеся *Pedomicrobium*, *Blastocaulis* (= *Planktomyces*), *Pasteuria* (= *Blastobacter*-, *Methylosynus*).

Нитчатые бактерии — бесцветные организмы, состоящие из цепочек клеток или из трихом, широко распространены в водоемах. Некоторые из них обладают выраженным влагаллием, которое иногда покрывается окислами железа и (или) марганца. Эти организмы называют нитчатыми бактериями. Они отчетливо разделяются на две группы.

Первая группа объединяет организмы, которые образуют цепочки клеток бациллярной формы, соединенные иногда плазмодесмами. Они способны образовывать подвижные стадии, которые обладают полярными жгутиками. Эти организмы близки к истинным бактериям, и наиболее типичными представителями их являются роды *Sphaerotilus* и *Leptothrix*.

Ко второй группе относятся неподвижные или обладающие скользким движением организмы, близкие синезеленым водорослям. Нить клеток в этом случае состоит из трихома, где цилиндри-

ческие клетки соединены плоской поверхностью, а боковая сторона остается свободной. Размножение происходит гормогониями. Организмы этой группы объединяют в сем. Srenotrichaceae, и их можно рассматривать как бесцветные синезеленые водоросли (Pringsheim, 1963). Они ближе к питчатым бактериям порядков Beggiatales и Flexibacteriales, чем к бактериям первой группы.

Способность отлагать значительные количества окислов железа или марганца во влагалищах свойственна представителям обеих групп. Влагалище представляет здесь морфологический термин, описывающий различные образования: неслизистые влагалища *Sphaerotilus* и питчатую окислами слизь, выделяемую другими организмами. Строго говоря, в последнем случае нет истинного влагалища, но микроскопические различия не всегда отчетливы, и под названием *Leptothrix* было описано много организмов, которые, вероятно, являются синезелеными водорослями или бесцветными скользкими бактериями. В качестве примера можно привести *Herpetosiphon sp.*, у которого удалось проследить процесс образования железистого чехла. К двух-трехсуточной культуре *Herpetosiphon* на синтетической среде Левина в пробирках вносили железную проволоку, как рекомендовал Разумов (1961б). Трихомы *Herpetosiphon* сползались на проволоку, и на следующие сутки обнаруживались железистые чехлы. Отложение железа начиналось в виде точки в месте стыка двух клеток трихома и затем распространялось по всей поверхности. Организм выделяет тонкий слизистый чехол, который и служит местом отложения окислов железа. Подвижные трихомы *Herpetosiphon* обычно выскальзывают из уже железненных участков, оставляя за собой слизистую трубку, которая пропитывается железом. Наблюдаемые картины были довольно разнообразны и зависели от состояния культуры, но очень близко напоминали те, которые приписываются *Leptothrix*.

Систематика питчатых бактерий чрезвычайно неопределенна, как и у многих других водных микроорганизмов. В чистой культуре были получены и детально исследованы штаммы, тяготеющие к двум основным формам — *Sphaerotilus natans* и *Leptothrix discophora*. По одной крайней точке зрения, высказанной Прингсхеймом (Pringsheim, 1949 a, b), которую поддерживает Стокс (Stokes, 1966), все питчатые бактерии первой группы представляют морфологические варианты этих двух видов. Другую крайнюю точку зрения занимают гидробиологи, приписывающие каждой морфологической форме специальное видовое название. Истина заключается в том, что без исследований в чистой культуре большого числа штаммов построить приемлемую систематику этой группы не удастся.

Типовым видом этой группы является *Sphaerotilus natans*, подробно изученный в последние годы (Dondero, 1961). Клетки крупные, более $4,6 \times 1,06$ мк, варьируют по размерам даже в составе одной цепочки. Грамотрицательный. Влагалище гладкое. Типичные формы не ветвятся и растут в сильно загрязненных водах.

Ветвящиеся формы описывали под названием *Cladothrix dichotoma*. Есть подвижная стадия — одиночные клетки или короткие цепочки клеток с полярными жгутиками выскальзывают из влагалища и, прикрепляясь к субстрату, дают начало новой нити. Прикрепление к старой нити приводит к образованию ложного ветвления. Хотя частота ветвления и используется как показатель сапробности среды, этот признак нельзя расценивать как родовой. Разумов (1961а, б, в) предложил использовать название *Sphaerotilus* для обозначения аукогетеротрофных организмов, называя аукоавтотрофные — *Cladothrix*. Это предложение неприемлемо, так как большинство нитчатых бактерий нуждается в витамине В₁₂ для роста. *Sphaerotilus* способен использовать разнообразные органические вещества для роста. Обрастания этого организма имеют серьезное экономическое значение в водоснабжении, на бумажных и сахарных заводах. Многие авторы исследовали отношение *Sphaerotilus* к железу и нашли, что этот организм способен отлагать окислы железа, но не марганца во влагалище. В зависимости от условий культивирования отложения железа выглядят по-разному; в хорошо аэрируемых условиях отложения неровные бугристые. В опытах Разумова (1961б) в жидкую культуру опускали стальную проволоку, в этом случае пустые влагалища аукоавтотрофных микроорганизмов были в сущности неотличимы от влагалищ *Lepidothrix ochracea*. Мульдер и Ван Вее (Mulder, van Veen, 1963), которые выращивали *Sphaerotilus* в искусственном железистом источнике, где *L. ochracea* сохранял типичную морфологию, нашли, что ожелезнение у *Sphaerotilus* отличается от *L. ochracea*. Таким образом, эти организмы представляют два близких, но не идентичных вида.

Микроорганизмы, принимающие наиболее интенсивное участие в образовании отложений железа и марганца, объединены в сем. Metallogeniaceae. Обладая весьма своеобразным строением, отличающим их от других бактерий, эти организмы имеют много общего между собой. Тело организмов представлено весьма тонкими нитями (арайями), покрытыми отложениями железа или марганца. Нити образуют правильные структуры, и колонии представителей этой группы имеют характерную форму, позволяющую легко диагностировать виды на микроскопических препаратах. В цикл развития организмов входит образование мелких телец. Большинство металлогенных было описано на основании изучения микроскопических препаратов, таких, как стекла обрастания, которые не позволяли детально изучить морфологию организма. Поэтому первооткрыватели (Перфильев, Габе, 1961, 1964) считали, что организмы этой группы близки к гифомикробам. Однако изучение культур *Metallogenium* и *Gallionella* (Заварзин, 1961, 1965; Балашова, 1969; Дубинина, 1969) заставило изменить мнение и рассматривать их как организмы, родственные микоплазмам. Сейчас в эту группу включены *Gallionella*, *Metallogenium*, *Kusnezovia*, *Caulococcus*, *Thio-*

dendron (?), *Siderococcus*, *Kakabeckia* (ископаемая), но возможно дальнейшее изучение приведет некоторых из них на уровень видов.

Микоплазмы, хорошо известные медицинским микробиологам с 1898 г., до последнего времени не попадали в круг внимания общей микробиологии. У них нет клеточной стенки, и вследствие действия внешних физических сил микоплазмы весьма полиморфны. Они состоят из минимальных репродуктивных телец, не менее 130 нм диаметром, которые увеличиваются в сферические или ветвящиеся формы до 500 нм. Несмотря на сходство, они отличаются от L-форм бактерий тем, что не происходят от бактериального родителя (Haufflick, 1969). Микоплазмы являются паразитами животных и высших растений. К свободноживущим относят *Mycoplasma laidlawii* и недавно открытую термофильную микоплазму, которая развивалась при pH 2—3 и температуре 55° (Darland et al., 1970) в термальных источниках и отбросах угля, где, как правило, бывает и *Thiobacillus ferrooxidans*. Микоплазмы относятся к мельчайшим свободноживущим организмам, вычисленные размеры которых не могут быть меньше 10 нм. Физиологически это гетеротрофы, разлагающие сахара по гликолитическому и гексозомонофосфатному пути и обладающие циклом трикарбоновых кислот. Перенос электрона обычно приводит к образованию перекисей. Идентификация микоплазм обычными методами невозможна, потому что они слишком вариабельны морфологически и слишком сходны физиологически. Их определяют серологически. Иногда микоплазмы путают с миксовирусами. Литература по морфологии микоплазм полна противоречий, одни считают их нитевидными, другие сферическими и амебондными. Биологические материалы часто содержат элементы, сходные с микоплазмами, но отличающиеся от них отсутствием внешней мембраны и дифференцированного содержимого. Псевдоэлементы образуются при добавлении ДНК к жидкостям, содержащим белок. С другой стороны, следует помнить, что микоплазмы образуют структуры, которые многие склонны отбрасывать как артефакт.

Оформленные микроколонии, покрытые окислами железа и марганца, развитие которых в водоемах и почве наблюдали Перфильев и другие исследователи, могут быть либо неорганическими образованиями, либо микоплазмами. Предположение Перфильева об их сходстве с *Nurhomicrobiales* нужно совершенно оставить на основании электронномикроскопических исследований: бактериальных тел с клеточной стенкой в них нет. Биологическая природа образования характерных микроколоний установлена с очевидностью путем сравнения стерильной и засеянной проб. Остается допустить, что микроколонии образуются в результате побочного действия каких-то других организмов, например, грибов. Интерпретировать с этой точки зрения наблюдающиеся в природе и лабораторных культурах явления, по меньшей мере, затруднительно. Поэтому

наиболее вероятной остается гипотеза микоплазменного происхождения этих организмов. Если она окажется справедливой, то это означает открытие большой новой группы живых существ, населяющих нашу планету с докембрийских времен.

Опыты по выделению микоплазм из культур *Gallionella* (Балашова, 1969) и *Metallogenium* (Дубинина, 1969) были изложены выше. Предполагается, что симбионтом микоплазмы могут быть различные прокариотные и эукариотные организмы. Окисление железа коллекционной культурой *Mycoplasma laidlawii* было установлено Балашовой в нашей лаборатории. Поскольку известно, что микоплазмы выделяют перекись водорода, то можно допустить перекисный механизм окисления. Симбиотическое окисление марганца микроорганизмами с участием перекисей известно уже давно. Предположение, что многие железобактерии на самом деле включают микоплазмы в дополнение к бактериям, получило некоторое экспериментальное основание в наблюдениях Балашовой.

Искусственный ключ к определению родов организмов, отлагающих железо и марганец

I. Окислы металлов образуются в виде бесформенных отложений.

A. Окислы металлов на поверхности клетки в природной обстановке не отлагаются, отложения окислов вне связи с клеткой аморфные.

1. Развиваются в кислой среде, рН меньше 5 вплоть до рН 1.

Thiobacillus ferrooxidans (см. тионовые бактерии, стр. 204)

2. Развиваются в нейтральной среде в микроаэрофильных условиях, клетки весьма мелкие, плохо различимые. *Siderococcus*

B. Окислы железа или марганца бесформенные, покрывают колонии клеток, соединенных нитями.

1. Овальные клетки соединены нитями, имеющими клеточное строение диаметром 0,1—0,2 мк. *Pedomicrobium*, *Hypomicrobium*

2. Окислы всегда марганца покрывают мелкие клетки, соединенные нитями, как правило, находящимися за пределами видимости светового микроскопа. *Caulococcus*

II. Окислы железа, но не марганца, отлагаются в виде морфологически оформленных структур.

A. Железо отлагается в виде тонких нитей или лент.

1. Ленты и нити винтообразно закручены, дихотомически ветвятся. *Gallionella*

2. Нити рыхло сложены наподобие мотка ниток, не ветвятся, на изгибах образуют характерные фигуры как лук. *Toxothrix*

B. Окислы железа или марганца отлагаются в виде трубчатого влагалища вокруг цепочки клеток или трихома нитчатых бактерий.

1. Клетки всегда располагаются в один ряд. *Leptothrix*

2. У свободного конца нити клетки располагаются в несколько рядов.
Crenothrix

В. Окислы железа или марганца отлагаются в рыхлой слизистой капсуле.
1. Клетки кокковидные, собраны в середине капсулы. *Siderocapsa*

2. Клетки палочковидные.

Sideromonas, Sideronema, Ferribacterium

Г. Окислы железа или марганца отлагаются в виде тонко очерченного панциря — турса.

1. Туре замкнутый, клетки неподвижны. *Naumannella*

2. Туре открыт с одного конца, клетки подвижны. *Ochrobium*

Д. Окислы железа или марганца отлагаются вокруг радиальных нитей розетковидной колонии.

1. Клетки, заканчивающие радиусы, размножаются почкованием, окислы отлагаются вокруг нитевидных придатков. *Blastocaulis (Planctomyces)*

2. Радиусы микроколони образованы удлиненными клетками со спиральной структурой поверхности. *Seliberia*

Е. Окислы всегда марганца образуют оформленные фигуры, покрывающие микроколони организмов.

1. Микроколони в виде «паучка», образованного расходящимися, радиальными извитыми коническими нитями. *Metallogenium*

2. Микроколони в виде «ландышевого листа». *Kusnezovia*

***Siderocapsa* Molisch, 1910**

Сферические или эллипсоидные клетки, погруженные в общую капсулу, пронитанную окислами железа или марганца. Клетки часто блестящие и плохо окрашивающиеся, в парах, тетрадах и напоминающими ежевичку комками; окружены свободным от окислов пространством, а затем размытой капсулой, окрашенной в желтый цвет окислами железа или в коричневый окислами марганца. По-видимому, гетеротрофные организмы, использующие сложные гуминовые соединения железа и марганца и отлагающие окислы в капсуле. Не изучены в чистых лабораторных культурах. Широко распространены в пресных водах, в планктоне и эпифитно. Обнаружены в подзолистых почвах. Встречаются иногда значительными массами. Развиваются, как правило, в нейтральных или слабо щелочных условиях при пониженном давлении кислорода. Размножение делением пополам, затем образуется плоская тетрада, но дальше деление нерегулярное. В слизистой капсуле иногда обнаруживаются пузырьки газа, удерживающие колонию на плаву.

Описан ряд морфологических форм, принадлежащих к этому роду, но пределы морфологической изменчивости неизвестны, и по-

этому видовые обозначения могут рассматриваться лишь как предварительные. К роду *Siderocapsa* следует, по-видимому, отнести и организм, описанный под названием *Siderosphaera conglomerata*, который образует напоминающие *Gloeocapsa* колонии. Палочковидные формы со слизистой капсулой, пропитанной окислами железа, объединяют в род *Sideromonas*. Они образуют пропитанные железом или марганцем слизистые зооглеи на погруженных объектах. Сомнительно, чтобы эта последняя группа организмов, составленная родами *Sideromonas* Cholodny, 1922; *Siderotheca* Naumann, 1922; *Siderocystis* Naumann, 1922, имела какую-либо таксономическую ценность, заслуживающую большей характеристики, чем «пропитанные окислами зооглеи». Перифитные организмы находятся в условиях лучшего перемешивания среды вокруг себя, чем планктонные, которые переносятся внутри одной и той же водной массы. Поэтому перифитные *Siderocapsa* крупнее планктонных. Поскольку один и тот же организм может давать разные формы роста в зависимости от положения, Дрейк (Drake, 1965) сомневается, что существуют такие виды, как *S. monoeca*, *S. major*, *S. botryoides*. Таксономическое значение, по его мнению, могут иметь *S. treubii*, *S. coronata*, *S. esusphaera*.

Виды *Siderocapsa*

S. treubii Molisch, 1910. Прикрепленные формы с кокковидными клетками диаметром 0,6 мк до 8 клеток в общей капсуле. Развивается эпифитно на высших растениях, обволакивая их слизистой массой гидратов окислов железа и марганца.

S. major Molisch, 1916. Прикрепленные формы с бесцветными короткими палочковидными клетками 0,7—1,8 мк. Число клеток в капсуле варьирует от 2 до 100.

S. coronata Redinger, 1931. Планктонная форма с кокковидными клетками диаметром 1 мк, по 2—8 в первичной капсуле. Вторичная капсула объединяет их в группы.

S. esusphaera Skuja, 1948. Планктонная форма с кокковидными клетками 1—2 мк, объединенными по 2—60 в первичную капсулу. Вторичная капсула пропитана окислами железа и марганца.

S. monoeca Naumann, 1922. Одиночные клетки диаметром 0,5—0,7 мк, располагающиеся внутри дворика из окислов железа или марганца.

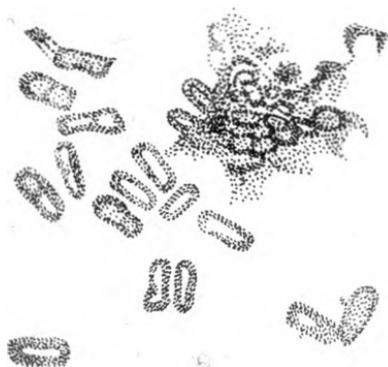
S. botryoides Beger, 1949. Кокковидные клетки 0,6—0,8 мк, каждая клетка окружена капсулой. Могут образовывать слитные скопления.

S. conglomerata (*Siderosphaera conglomerata*) Beger, 1944. Кокки 1,0—1,2 мк, окруженные капсулой 2 мк. При делении образуют напоминающие *Gloeocapsa* колонии правильно округлых очертаний.

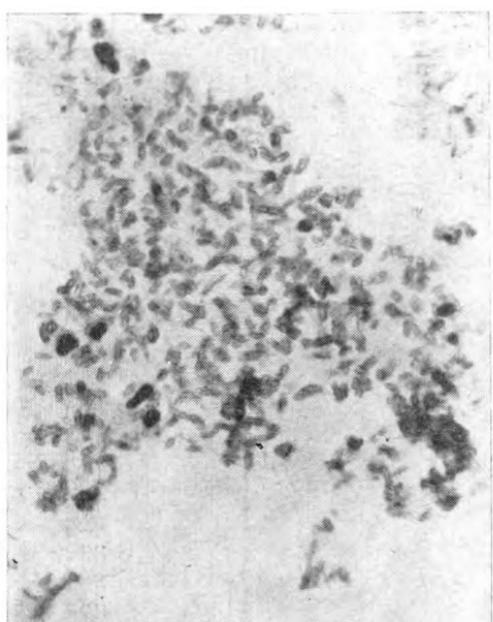
Naumanniella Dorff, 1934

Палочковидные клетки, окруженные тонкой капсулой очень правильных очертаний — торусом (рис. 59, а). Железо окрашивает капсулы в золотисто-желтый цвет, и тогда виден только край торуса, напоминая диатомовую водоросль. Марганец делает капсулу темной и непрозрачной. Внутри капсулы находится только одна клетка. Гетеротрофный организм, разлагающий комплексные органические соединения железа или марганца. Типовой вид *N. planctonica* с прямыми клетками и очень правильным торусом. Размножение делением. В чистой лабораторной культуре не изучен, хотя его удавалось культивировать на аммиачном лимоннокислом железе (рис. 59, б). Кроме этого вида, описан еще ряд форм, различающихся главным образом размерами:

Виды <i>Naumanniella</i>	Размер клетки с торусом, мк
<i>N. planctonica</i> Dorff, 1934	1,8—3,3×4,9—10
<i>N. minor</i> Dorff, 1934	1,2—1,5×3,1—3,6
<i>N. pygmaea</i> Beger, 1949	1×2
<i>N. catenata</i> Beger, 1941	1,0—1,2×4,9—5,5
<i>N. elliptica</i> Beger, 1949	2,0—2,5×3



а



б

Рис. 59 *Naumanniella neustonica*
 а — торусы б — культура среда аммиачным лимоннокислым железом

Ochrobium Perfiliev, 1921

Клетки эллипсоидальные $1,5-3 \times 5$ мк, окружены тонким железнстым панцирем, открытым с одного конца, из которого выступают два жгутика неравной длины (рис. 60). Возможно, что в действительности это не бактерия, а жгутиконосец. Встречается в пресных водоемах, где иногда окрашивает придонные слои воды в желтый цвет. Единственный вид *Ochrobium tectum*.

Siderococcus Dorff, 1934

Кокки $0,2-0,5$ мк диаметром. Подвижны, но тип жгутикования неизвестен. Одиночные или в небольших подвижных колониях от 6 до 15 клеток, напоминающих початок кукурузы. Клетки несут нитчатые придатки (см. рис. 53). Размножение, по-видимому, почкованием, и тогда клетки грушевидные. Клетки и придатки покрыты окислами железа, но под световым микроскопом это не удается рассмотреть. Окислы железа лежат вокруг клеток и при взятии образца клетки обычно свободные, внутри колоний рассмотреть положение клеток часто не удается. Оранжевые или желтые микрзоны *Siderococcus* располагаются под микрзонами марганец-окисляющих микробов в области пониженного содержания кислорода и при нейтральной реакции среды. Организм широко распространен в пресных водоемах, в которых он является одним из важных агентов, вызывающих отложение железа, и в почвах над оглененным горизонтом. Вследствие мелких размеров обычно этот организм не замечают. Единственный вид *S. limonicus* Dorff, 1934.

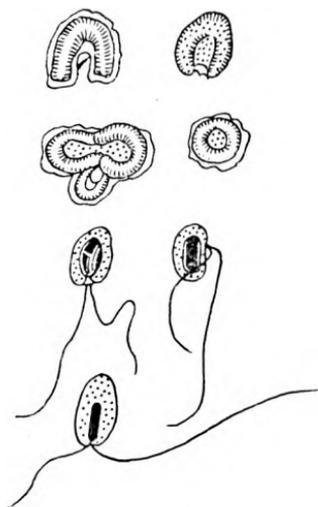


Рис. 60. *Ochrobium tectum*

Leptothrix Kützing, 1843

Клетки палочковидные, собраны в цепочки, окруженные трубчатым влагалищем. Клетки могут выскальзывать из влагалища и тогда подвижны благодаря наличию полярных жгутиков. Влагалище, как правило, неветвящееся и пропитано окислами железа и (или) марганца. Пресноводные микроорганизмы не обнаружены пока ни в море, ни в почве. Систематика микроорганизмов рода *Leptothrix* очень спорна. В роде *Leptothrix* можно различить три основные группы микроорганизмов:

1. Влагалище цилиндрическое с резкими контурами наружной и внутренней стенок строго одного диаметра на всем протяжении. Пропитано окислами железа, но не марганца. Не прикрепленное.

L. ochracea

2. Влагалище коническое, или хотя бы суженное на конце, рыхлое или тонкозернистое. Контуров нерезкие. У основания имеется прикрепительный диск. Может содержать окислы железа и (или) марганца.

L. discophora

3. Влагалище тонкое бесцветное. Окислы металлов отлагаются у основания в виде тонкой пленки.

L. sideropus

Leptothrix ochracea Kützing, 1843 — нитчатый микроорганизм, имеющий цепочки клеток шириной до 1 мк, иногда образующий нитевидные клетки. Характерной особенностью является склонность клеток выскальзывать из влагалища, поэтому в большинстве случаев находят пустые влагалища (см. рис. 54). Наиболее массовая форма железобактерий, принимающая основное участие в образовании так называемых болотных руд. Подробнее см. охру образующие бактерии (стр. 275).

Leptothrix discophora Dorff, 1934 — полиморфный нитчатый микроорганизм, характеризующийся тем, что цепочки крупных клеток погружены в толстое мелко гранулированное влагалище с нерезким наружным и внутренним краем, в котором могут накапливаться окислы железа и марганца (рис. 61). Размножается подвижными благодаря полярным жгутикам клетками, которые после периода подвижности прикрепляются к субстрату, иногда к нитям *L. discophora*, образуя ложное ветвление. Остановившиеся клетки начинают покрываться окислами с базального конца, приобретая характерную клиновидную форму. У основания обычно образуется прикрепительный диск. Коническая форма влагалища сохраняется и у зрелых нитей, в которых начинается выскальзывание клеток и образование подвижной стадии. Характер отложения железа или марганца зависит не только от условий культивирования, но и является типичным для организма, что позволило выделить ряд форм в самостоятельные виды.

В природных условиях и в аквариумах образует на подводных предметах и стенках сосуда маленькие очень хрупкие почти черные деревца, отдельные нити которых различимы простым глазом. На агаризованной среде с марганцем образует черные колонии с волокнистым краем. Обычно встречается вместе с *L. ochracea* в большом количестве, чаще несколько ниже по течению.

Культуры *L. discophora* легко выделяются на среде, содержащей сенной отвар, 20 мг/л углекислого марганца и 5 мкг/л витамина В₁₂. Выделение проводят в двухслойном агаре, нижний слой 0,8% агара, верхний — с глубинными колониями *Leptothrix* — 0,6% (Савельева, 1965). Колонии появляются на 5 сутки.

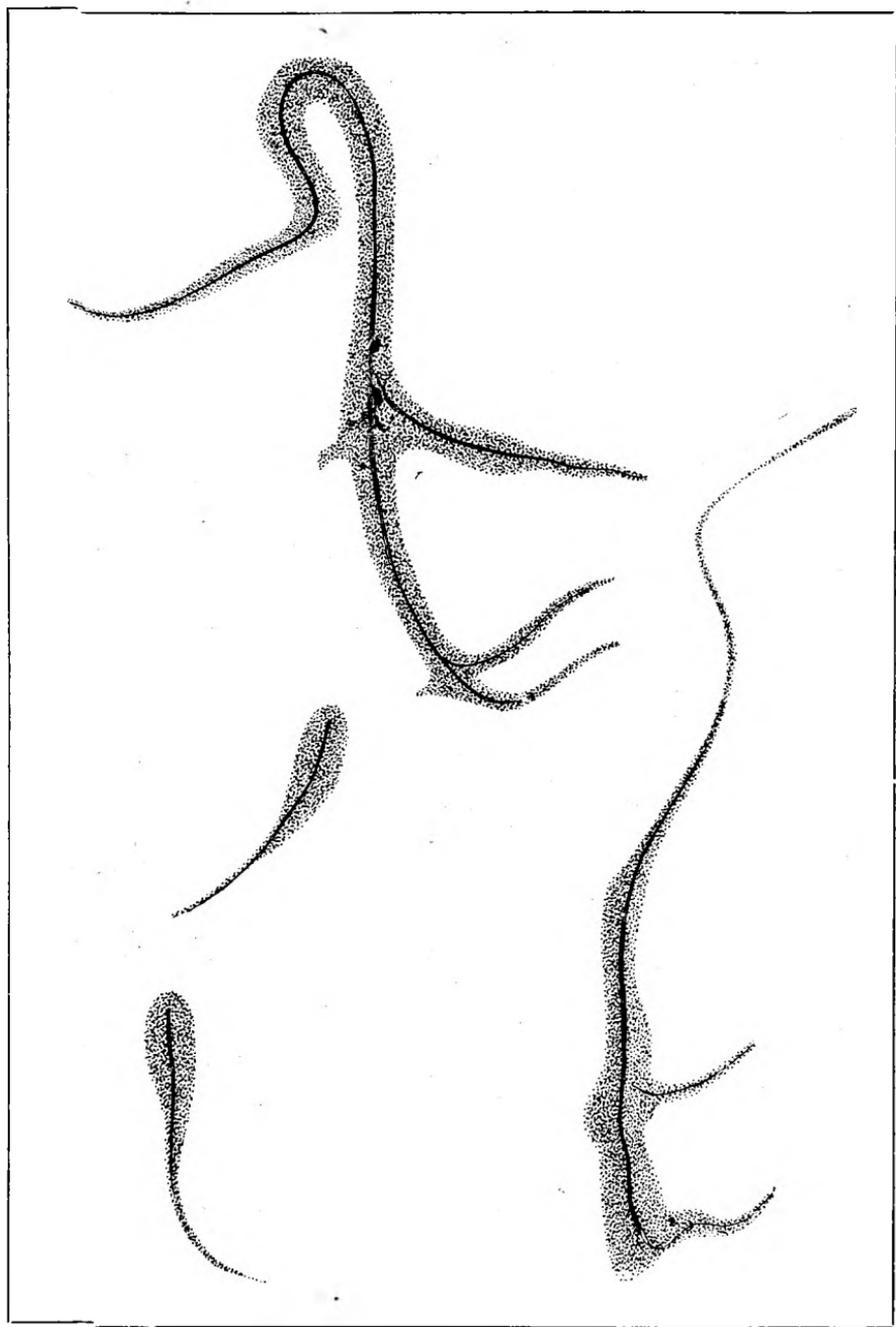


Рис. 61. *Leptothrix discophora* (= *L. crassa*)

Гетеротрофный организм, использующий пептон, казаминовые кислоты, дрожжевой экстракт. Рост идет на средах с глутаминовой и аспарагиновой кислотами, глюкозой, фруктозой, сахарозой, галактозой, мальтозой, раффинозой, маннитом, сорбитом, глицерином, дульцитом, этанолом, причем разные штаммы отличаются друг от друга по набору используемых веществ. Органические кислоты используются плохо, крахмал, декстрин, целлюлоза не используются совсем. Все организмы этой группы обнаруживают потребность в витамине В₁₂ (Mulder, 1964a, b; Dondero, 1961; Rouf, Stokes, 1964).

К основному виду *L. discophora* примыкает ряд видов со сходной структурой влагалища, но отличающихся морфологически. Возможно, эти организмы следует рассматривать сейчас как подвиды.

L. lopholea Dorff, 1934 хорошо характеризуется видовым названием — «кустистый» (греч.). Имеет сравнительно короткие нити длиной до 30 мк, шириной до 1,5 мк, неветвящиеся с прикрепительным диском у основания. Клетки 0,5×1,3 мк (Dorff, 1934), 0,8—1,7×3—7 мк (Mulder, van Veen, 1963). Внутри влагалищ канал не просматривается, а оставленные клетками нити подвергаются оруденению в такой степени, что их первоначальная форма распознается с трудом.

L. major Dorff, 1934 отличается гигантскими размерами, более прочным влагалищем, которое имеет цилиндрическую форму на всем протяжении за исключением конца, где оно имеет форму усеченного конуса. Длина нити может достигать 10 мм.

L. pseudochracea Mulder et van Veen, 1963. Клетки 0,8—1,3×5—12 мк, очень подвижны. Окислы отлагаются на чехле в виде гранул. Близко напоминает *L. ochracea*, отличаясь от него способностью окислять марганец.

L. cholodnii Mulder et van Veen, 1963. По мнению Мульдера и ван Веена, промежуточная форма между *Sphaerotilus natans* и *L. discophora*. Клетки 1,0×4,6 мк, влагалища гладкие или с гранулами. На среде, богатой органическими веществами, имитирует рост *S. natans*, на среде с марганцем — *L. discophora*.

L. echinata Beger, 1935 — планктонная форма, образующая звездчатые колонии, где из общего центра выходят конические нити, покрытые окислами марганца. Микроколонии имеют размеры 18—20 мк и обычно состоят из 20—50 отдельных нитей. Часто отдельные колонии соединяются концами. Внутри нитей удается рассмотреть мелкие клетки (Kalbe, 1966). Организм встречается в планктоне пресных озер (Skuja, 1956; Panknin, 1941; Rechačkova, 1963; Гусева, 1956). На основании описания и приведенных фотографий микроорганизм не отличается от трихосферической стадии *Metallogenium personatum* Перфильева. Многие из перечисленных выше авторов под названием *L. echinata*, несомненно, описывали *Metallogenium*. В том что организм, описанный Перфильевым, не принадлежит к роду *Leptothrix*, нет сомнений.

L. winogradskii Cataldi, 1940. Клетки 0,9 мк диаметром, подвижен. Влагалище 1,5 мк; трихомы очень длинные, никогда не прикрепленные.

L. tenuissima (*L. skuja*, Beger, 1953) Skuja, 1963. Неприкрепленные трихомы, спирально сплетенные друг с другом, 0,3—0,4 мк диаметром. Заостренное к концу влагалище до 18 мк.

L. pseudovacuolata (*Spirothrix pseudovacuolata* Periliev, 1925; Dorff, 1934). Клетки с закругленными концами 1,7—2,8×3,5—30 мк. Трихомы неветвящиеся, спирально извитые. Напоминают синтезеленую водоросль *Spirulina*, покрытую окислами железа.

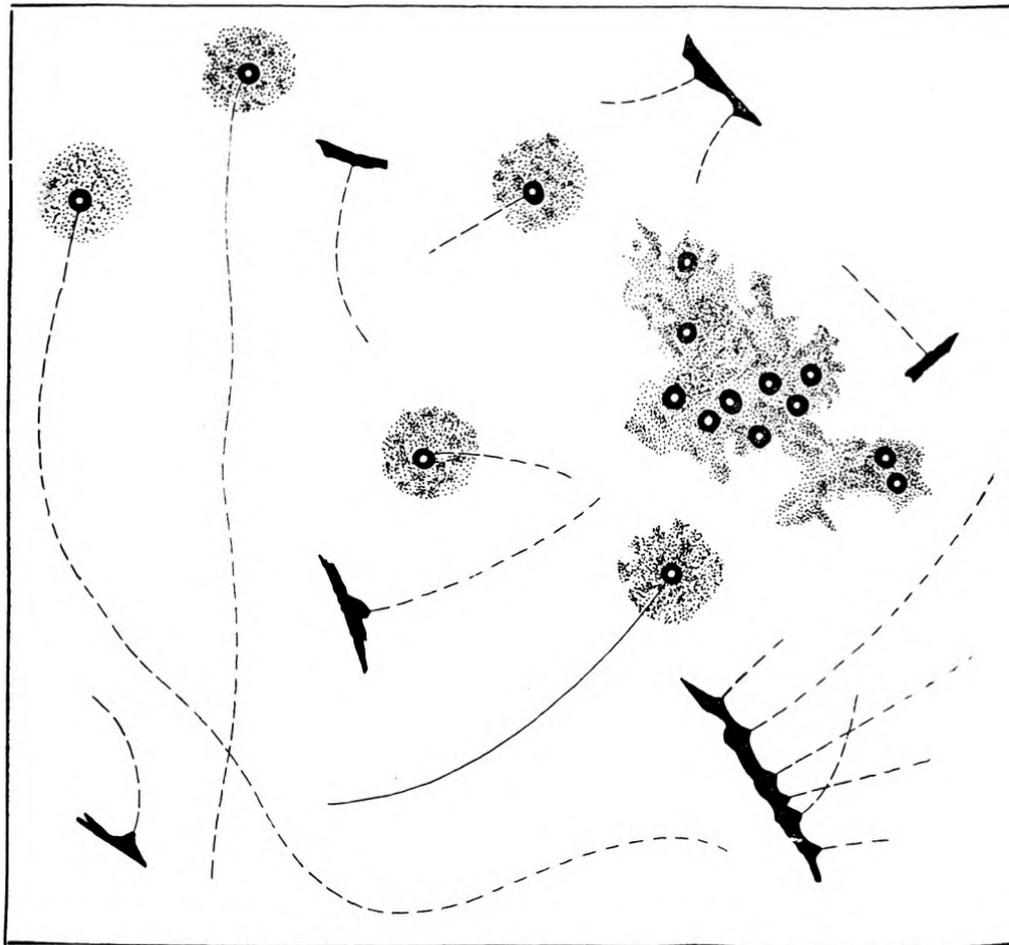


Рис. 62. *Leptothrix sideropus*

Leptothrix sideropus (Molisch, 1925) Cholodny, 1926. Образует на поверхности воды сухую пленку окислов марганца или железа. К этой пленке прикрепляется свисающая вниз в толщу воды нить, одетая в тонкое бесцветное влагалище. Нить состоит из отдельных цилиндрических клеток примерно одинаковой длины и под микроскопом кажется пунктиром (рис. 62). Образование типичной нити *L. sideropus* начинается с того, что палочковидная подвижная клетка останавливается у поверхности воды и образует у своего основания бляшку окислов марганца. Клетка начинает делиться, образуя прямую цепочку клеток, а бляшка превращается в пленку неправильных очертаний, так что с ростом нити площадь «парашюта», удерживающего организм в нейстоне, увеличивается. Отличие базальной клетки от остальных представляет один из простейших примеров дифференциации клеток в колониях бактерий.

На агаризованной среде Савельевой (1965) для *L. discophora* в отличие от этого организма *L. sideropus* образует коричневые пленки неправильных очертаний. В жидкой среде образует пленку на поверхности, в то время как тяжелые колонии *L. discophora* тонут.

L. sideropus сохраняет свою типичную морфологию в природе, где встречается в нейстонных пленках. Количество его достигает 10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл, но роль в отложении окислов металлов ничтожна.

***Crenothrix* Cohn, 1870**

К сем. *Crenothrichaceae* относят нитчатые прикрепленные формы, обладающие выраженным влагалищем. Клетки дисковидные или цилиндрической формы. Размножение происходит неподвижными гонидиями. Организмы этой группы, по мнению Прингсхейма (Pringsheim, 1963), представляют собой бесцветные синезеленые водоросли. Способностью отлагать окислы железа и марганца обладает один вид *C. polyspora*, описанный Коном в 1870 г. Характерным признаком организма служит коническая форма влагалища, прикрепленного к субстрату узким концом. Ширина влагалища варьирует, составляя у основания 1,5—5,0 мк и у верхнего конца 6,0—9,0 мк. Клетки *Crenothrix* размножаются не только поперечным, но и продольным делением, образуя у открытого конца несколько параллельных рядов. Эти клетки обладают меньшими размерами — 1—2 мк, они выскальзывают из влагалища и дают начало новым нитям. Способности к самостоятельному движению у них не обнаружено. Кроме этих клеток размножение происходит короткими отрезками трихома.

В конце прошлого века *Crenothrix* уделяли большое внимание в виду той угрозы, которую он представлял для водоснабжения. Амстердам, Берлин, Дрезден находятся в списке городов, пострадавших от вспышек его развития. В последние годы сообщений о массовом росте *Crenothrix* не появлялось.

Crenothrix является обитателем прохладных колодцев и скважин, встречается он не часто, но развитие его носит характер массового.

***Blastocaulis* Henrici et Johnson, 1939**

Организмы этой группы были несколько раз повторно описаны авторами, дававшими им разные названия: *Planktomyces bekefii*, *Blastocaulis*, *Gallionella planctonica*, *Siderophacus* (?), но ни разу не были получены в чистой культуре.

Тело организма состоит из круглой или конической клетки, сидящей на прямом неразветвленном стебельке. Размножение осуществляется почкованием, причем почка образуется на противоположном стебельку полюсе клетки. Иногда образуется короткая цепочка клеток. Отделившиеся клетки соскальзывают к основанию стебелька, прикрепляются здесь и дают новую нить. Так возникает розетка из нитей, на концах которых сидят клетки (Гусева, 1956). Кальбе (Kalbe, 1966), наблюдавший стебелек под электронным микроскопом, нашел, что они состоят из волокнистого материала.

От *Blastocaulis*, по-видимому, мало отличается *Siderophacus*, который имеет изогнутые конические стебельки, тоже собранные в розетку, но размножающиеся делением.

Организмы этого рода широко распространены в планктоне и благодаря способности отлагать окислы железа и марганца на стебельках могут иметь значение в круговороте этих элементов.

***Seliberia* Aristovskaja et Parinkina, 1939**

Организм образует характерные розетки из длинных палочковидных клеток, обладающих спиральной скульптурой поверхности. Размножение происходит делением пополам, причем дочерняя клетка подвижна. Жгутики располагаются латерально. При образовании розеток, как показали наблюдения в микрокультуре, у основания палочковидной клетки появляется почка, вырастающая в нормальную клетку, не отделяющуюся от материнской. Повторение процесса приводит к формированию розетки. На концах свободных клеток иногда образуются крупные округлые клетки, которые в дальнейшем могут прорасти несколькими палочковидными клетками.

При росте на богатых органическими веществами средах клетки распадаются на фрагменты и мельчайшие зерна, иногда образуют шаровидные и вздутые клетки, что, впрочем, происходит не всегда, и при росте на картофельном агаре клетки напоминают *Agrobacterium* (Громов, 1964). На средах с гумусовыми веществами организм сохраняет нормальную морфологию.

В подзолистых почвах микроорганизм бывает обычно покрыт отложениями гидрата окиси железа. Отложение начинается в цент-

ре, и первыми покрываются наиболее старые клетки. Значительное развитие этих организмов в подзолистых почвах заставило приписать им достаточно заметную роль в биологическом накоплении железа.

В систематическом отношении *Seliberia* вряд ли принадлежит к почкующимся бактериям, хотя рост некоторых из них она может имитировать. Скорее всего это организм, родственник *Agrobacterium*, у которых также обнаружена склонность образовывать розетки.

Pedomicrobium Aristovskaja, 1961

Организмы, принадлежащие к этому роду, во всех существенных чертах напоминают хорошо изученный род *Hyphomicrobium* (Заварзин, 1961б; Хирш, 1968). Эллипсоидные клетки соединяются между собой ветвящимися гифами, представляющими собой трубкообразное продолжение клеточной оболочки. Внутри гифы находятся протоплазменный тяж и ядерные элементы, которые дают начало дочерней клетке, образующей почкованием на конце гифы. Почка может отделяться, но может прорасти новой гифой и не отделяясь от материнской клетки. В отличие от *Hyphomicrobium*, от одной клетки может отходить не две, а несколько гиф, и микроколония организма представляет собою ветвящееся деревце.

На агаризованной среде с фульватами *Pedomicrobium* образует мелкие до 0,5 мм диаметром колонии, окрашенные в темный цвет оксидами. В почве *Pedomicrobium* бывает очень обильно в горизонтах, где происходит аккумуляция железа и марганца. Колонии *Pedomicrobium* в этом случае покрыты оксидами и представляют собой микроконкреции (Аристовская, 1965).

Вместе с тем показано (Хирш, 1968), что и обычные штаммы *Hyphomicrobium* в присутствии железа покрываются оксидами. К *Hyphomicrobium* отнесены организмы, составляющие марганцевые обрастания в водопроводах (Tyler, Marshall, 1967). *H. neptunium* Gilard et Watson, 1962 выделен из марганцевых корок на дне океана.

Аристовская (1961) различает три вида *Pedomicrobium*.

P. ferrugineum Aristovskaja, 1961. Клетки круглые или овальные 0,6×2 мк, на среде с фульвокислотами образует ожелезненные колонии. Накапливает окислы железа. Распространен в подзолистых почвах.

P. manganicum Aristovskaja, 1961. Клетки круглые или овальные 0,4 мк диаметром. Накапливает окислы марганца. На фульватном агаре образует мелкие черные колонии с изрезанными краями. Распространен в подзолистых почвах Ленинградской области.

P. podzolicum Aristovskaja, 1963. Клетки округлые 0,5×1,5 мк, соединены короткими слабо ветвящимися или не ветвящимися

нитями. Иногда нити редуцированы, и тогда образуются грозди кокков разного размера. На средах с органо-минеральными комплексами образует мелкие глубинные колонии, покрытые отложениями железа и марганца. Распространен в подзолистых почвах.

Gallionella Ehrenberg, 1838

Микроорганизмы, характеризующиеся образованием скрученных ветвящихся нитей, покрытых гидроокисью железа. В отличие от группы *Metallogenium*, никогда не отлагают соединения марганца.

Gallionella образует нитевидные структуры («стебельки»), обычно покрытые окислами железа. Нитевидные структуры состоят из пучков очень тонких волокон, имея вид ленты, скрученной в вит или двух нитей, перевитых одна вокруг другой. Нити ветвятся. На концах нитей иногда обнаруживаются вибрионидные клетки, нить при этом прикреплена к середине вогнутой части клетки. В соответствии с описанием Холодного (1953), эти клетки являются единственной живой структурой организма, а нити — неорганическим экскретированным материалом. Кроме концевых клеток наблюдались боковые клетки и мембранные мешки размерами порядка 5 мк с мелкими тельцами внутри (van Iterson, 1958; Заварзин, 1965). В противоположность Холодному некоторые современные исследователи (van Iterson, 1958; Hanert, 1968; Балашова, 1968) считают, что нити являются живыми и содержат биополимеры. Эти авторы предполагают у *Gallionella* сложный жизненный цикл, в котором участвуют фильтрующиеся формы (van Iterson, 1958; Балашова, 1969).

Gallionella — осаждающий железо микроорганизм, причем окислы железа составляют более 90% сухого веса. Способность к окислению Fe^{2+} в Fe^{3+} и ассимиляции существенных количеств $C^{14}O_2$ указывает на вероятность хемолитоавтотрофного типа питания, но строгие доказательства пока отсутствуют. *Gallionella* культивируют по Кучера и Вольфа (Kucera, Wolfe, 1957).

Gallionella развивается в железистых водах при рН, близком к нейтральному, и обычно при пониженном давлении кислорода, представляя типично градиентный организм. Имеется тенденция к развитию в холодной воде, иногда под снегом. Очень широко распространен, часто развивается в массовых количествах. Вместе с *Leptothrix ochracea* обуславливает отложение оксидов железа в гумидной зоне. Массовое развитие *Gallionella* в системе водоснабжения вызывает серьезные затруднения.

Таксономическое положение *Gallionella* неопределенно, наиболее близкий организм — *Metallogenium*, который, в свою очередь, рассматривается сейчас как относящийся к микоплазмам.

Форма и расположение покрытых железом нитей варьирует в разных условиях, и этот признак, в соответствии с которым были описаны виды *G. major* Cholodny, 1927; *G. minor* Cholodny,

1924; *G. umbellata*, Beger, 1949; *G. infurcata* Beger, 1937; *Perseus marinus* Butkevitch, не может быть принят без исследований в культуре. Два типа строения стебелька сохраняются при культивировании в сравнимых условиях: 1) в виде плоской скрученной ленты, 2) в виде перекрученных нитей.

G. ferruginea была первоначально описана как имеющая стебелек в виде «перевитой шпильки». Холодный никогда не наблюдал такой формы и перенес это название на описанную Эллисом (Ellis, 1919) под названием *Spirophyllum* форму со стебельком в виде плоской ленты, ликвидировав род *Spirophyllum*. Это описание вошло во всеобщее употребление в бактериологической литературе. Выделение в культуру формы с круглыми нитями, относящейся к роду *Gallionella*, потребовало бы: а) дать ей название *G. ferruginea* и признать типовым видом; б) назвать *G. ferruginea* Холодного — «*G. spirophyllum*». Балашова предложила использовать новый видовой эпитет для формы с переплетенными нитями — *G. filamenta*.

Gallionella ferruginea Ehrenberg, 1836 (Syn: *Spirophyllum ferrugineum* Ellis, 1909). Стебелек представляет скрученную ленту, образованную многими, более чем 90, волокнами. Лента ветвится дихотомически. В неоптимальных условиях винтовая скрученность ленты слабо выражена, но ветвление частое и поверхность покрыта бугорками; такая форма роста названа *G. minor*. У *G. ferruginea* описаны концевые клетки, боковые клетки, мембранные мешки (van Iterson, 1958). Организм развивается в железистых водах при pH 5—7 в широких пределах температуры, но обычно в холодной воде. Очень широко распространенный вид.

Gallionella filamenta Balashova, 1968 [Syn: *Didymohelix ferrugineum* Griffith, 1853; *Gallionella ferruginea* (Migula) Ellis, 1909]. Организм, обладающий цилиндрическими нитями, спирально закрученными одна вокруг другой. Стебелек образован менее чем 12 отдельными нитями. Были обнаружены вибриондные концевые клетки с полярным жгутиком, боковые клетки и мембранные мешки, показано существование фильтрующихся стадий развития, которые развиваются на среде для микоплазм (Балашова, 1969). Развивается в железосодержащих водах. Довольно редкая форма. Выделена из дренажа болотистой почвы, Яхрома, Московская область.

***Metallogenium* Perfiliev, 1961**

Metallogenium symbioticum Zavarzin, 1961. Окисляющий марганец микроорганизм, который развивается в искусственных культурах только в присутствии гриба. Зараженные *M. symbioticum* грибы, как правило, не образуют спороношений и могут относиться к различным родам. Колонии *M. symbioticum* выглядят как очень мелкие «паучки» из неправильно извитых нитей, окрашенных в темный цвет окислами марганца. В отличие от *M. personatum*, внутри нитей

не обнаруживаются клетки. Кокковидные клетки 0,5 мк образуются на нитях путем почкования, всегда одиночно. После отделения от нити они прорастают тонкой нитью, которая затем покрывается оксидами марганца. Окисление марганца, начатое микроорганизмом, может продолжаться автокаталитически. Указаний на автотрофный обмен организма не имеется. Предполагается внутриклеточный паразитизм на определенных стадиях развития в мицелии гриба. Аэроб. Область рН 6—8. *Metallogenium* культивируют на плотной среде с 0,01% уксуснокислого марганца и 2% агара без добавления связанного азота или фосфора. Развитие смешанных колоний с грибом происходит в форме больших коричневых концентрических колец, образованных микроколониями *M. symbioticum*, расположенными между гифами гриба. В качестве жидкой среды применяют 2%-ный крахмал или гуммиарабик с карбонатом марганца рН 6,2. Симбиотическая культура начинает развитие с появления мицелия гриба, затем среда внезапно мутнеет от кокковидных клеток *M. symbioticum*, которые быстро прорастают коричневыми нитями и через несколько часов оседают на дно, образуя коричневый осадок. Через несколько дней характерная форма колоний маскируется оксидами марганца.

M. symbioticum широко распространен в почвах. В воде он обычно обнаруживается в ассоциации с *Leptothrix ochracea*. Типовая культура выделена из такой ассоциации в болотистой местности под Москвой.

***Kusnezovia* Perfiliev et Gabe, 1961, 1964**

Окисляющий железо и марганец микроорганизм. Образует сложные прикрепленные микроколонии, имеющие вид обращенных книзу ландышевых листьев или бокальчиков с зубчатым краем. В колониях после удаления оксидов обнаруживаются мелкие почкующиеся клетки, соединенные в редкую цепочку тончайшими нитями. Организм очень редкий и обнаружен только в оз. Укшезеро. Один вид *Kusnezovia polymorpha*.

***Caulococcus* Perfiliev et Gabe, 1961, 1964**

Полиморфный иловый организм, отлагающий оксиды марганца. Микроколонии, плохо прикрепленные к субстрату, состоят из мелких 0,5 мк кокковидных клеток, соединенных нитями, иногда в зооглеях. Клетки размножаются почкованием. Распространяется одиночными подвижными клетками. Колонии обычно неправильно округлой формы с ребристо сетчатой структурой отложений. Организм накапливает почти исключительно оксиды трехвалентного марганца. Развивается преимущественно в верхнем слое пла или в придонной воде. Обнаружен в группе рудных полей оз. Хено-Ярви, Карелия. Единственный вид *Caulococcus manganiifer*.

- Аристовская Т. В. 1961. О разложении фульвокислот микроорганизмами. — Почвоведение, 11, 40.
- Аристовская Т. В. 1965. Микробиология подзолистых почв. М., «Наука».
- Балашова В. В. 1967. Накопительная культура *Gallionella filamenta*. — Микробиол., 36, 646.
- Балашова В. В. 1969. Об отношении *Gallionella* к микоплазмам. — Докл. АН СССР, 184, 1429.
- Балашова В. В., Дубинина Г. А. 1968. О связи микроорганизмов группы *Metallogenium* с микоплазмами. — Симпозиум «Супрамолекулярная организация вирусов, бактерий и простейших». АМН СССР, стр. 121.
- Балашова В. В., Черни Н. Е. 1970. Ультраструктура *Gallionella filamenta*. — Микробиол., 39, 348.
- Бетехтин А. Г. 1946. Промышленные марганцевые руды СССР. М., Изд-во АН СССР.
- Буткевич В. С. 1928. Образование железо-марганцевых отложений и участвующие в нем микроорганизмы. — Труды морского научного ин-та, 3.
- Варенцов И. М., Формозова Л. П. 1962. Осадочные руды железа и марганца. — Труды геол. ин-та, вып. 70.
- Вернадский В. И. 1936. Очерки геохимии. М.—Л., ОНТИ.
- Виноградский С. Н. 1888. О железобактериях. — В кн.: Микробиология почвы, 1952, стр. 56. М., Изд-во АН СССР.
- Власюк П. А. 1962. Марганцовые живления и удобрения рослины (укр.). Київ, УАСГН.
- Громов Б. В. 1964. Жгутикование *Seliberia stellata*. — Вестник ЛГУ, № 21, 148.
- Гродзинская К. П. 1962. О превращении марганца в почвах Украины под влиянием бактерий. — В сб.: «Применение микроэлементов, полимеров и радиоактивных изотопов в сельском хозяйстве». Киев. Изд. Укр. Акад. сель.-хоз. наук, стр. 145.
- Гусева К. А. 1956. О двух планктонных микроорганизмах, принимающих участие в круговороте железа. — Труды биол. станции Борок, 2, 24.
- Дубинина Г. А. 1969. О принадлежности *Metallogenium* к порядку Mycoplastales. — Докл. АН СССР, 184, 1433.
- Дубинина Г. А., Дерюгина З. П. 1969. Микробиологические процессы превращения форм железа в меромиктическом озере. — Журнал общей биол., 30, 602.
- Дуда В. И., Калакуцкий Л. В. 1961. О роли микроорганизмов в восстановительных процессах в почве. II. Восстановление железа чистой культурой. — Научн. докт. Высшей школы, сер. биол., № 2, 198.
- Заварзин Г. А. 1961а. Симбиотическая культура нового окисляющего марганец микроорганизма. — Микробиол., 30, 393.
- Заварзин Г. А. 1961б. Почкующиеся бактерии. — Микробиол., 30, 952.
- Заварзин Г. А. 1962. Симбиотическое окисление марганца двумя видами *Pseudomonas*. — Микробиол., 31, 586.
- Заварзин Г. А. 1963. Строение *Metallogenium*. — Микробиол., 32, 1020.
- Заварзин Г. А. 1964. К механизму осаждения марганца на раковинах моллюсков. — Докл. АН СССР, 154, 944.
- Заварзин Г. А. 1965. Хемоавтотрофные микроорганизмы. М., Докт. дисс.
- Заварзин Г. А. 1966. Железобактерии на вулканах острова Кунашир. — Труды МОИП, 24, 217.
- Заварзин Г. А., Епихина В. В. 1963. Симбиотический рост *Metallogenium*. — Докл. АН СССР, 148, 9333.
- Калакуцкий Л. В. 1959. О роли микроорганизма в процессах восстановления железа в почвах. — Научные докл. Высшей школы, 1, 225.
- Калиненко В. О. 1939. Развитие железобактерий на коллоидном окисном железе. — Микробиол., 8.

- Калиненко В. О. 1945. Новая железобактерия реки Енисей. — Микробиол., 14, 292.
- Калиненко В. О. 1946. Роль бактерий в формировании железо-марганцевых конкреций. — Микробиол., 15, 364.
- Косая Т. А. 1967. О составе окислов марганца в культурах *Metallogenium* и *Leptothrix*. — Микробиол., 36, 1024.
- Листова Л. П. 1961. Физико-химические исследования условий образования окисных и карбонатных руд марганца. М., Изд-во АН СССР.
- Мирчинк Т. Г., Запрометова К. М., Звягинцев Д. Г. 1970. Грибы — спутники бактерий, окисляющих марганец. — Микробиол., 39, 379.
- Перфильев Б. В. 1926. Новые данные о роли микробов в рудообразовании. — Изв. Геол. Комитета, 45, 795.
- Перфильев Б. В., Габеев Д. Р. 1961. Капиллярные методы изучения микроорганизмов. М.—Л., Изд-во АН СССР.
- Перфильев Б. В., Габеев Д. Р. 1964. Роль микроорганизмов в образовании железо-марганцевых руд. М.—Л., «Наука».
- Преображенская М. Р. 1937а. Железобактерии Полуостровского ключа и некоторых других железистых водоемов. — Архив биол. наук, 30, 309.
- Преображенская М. Р. 1937б. Железобактерии источников Липецкого курорта. — Архив биол. наук, 32, 285.
- Разумов А. С. 1961а. Микробиальные показатели сапробности водоемов, загрязненных промышленными сточными водами. Нитчатые бактерии рода *Cladotrix*. — Микробиол., 30, 515.
- Разумов А. С. 1961б. Физиология и экология нитчатых бактерий из рода *Cladotrix*. — Микробиол., 30, 938.
- Разумов А. С. 1961в. О систематике нитчатых бактерий. — Микробиол., 30, 1088.
- Савельева Н. Д. 1965. Метод количественного учета окисляющих марганец *Leptothrix*. — Микробиол., 34, 895.
- Соколова Г. А. 1959. Железобактерии озера Глубокого. — Микробиол., 28, 246.
- Соколова Г. А. 1961. Сезонные изменения видового состава и численности бактерий и круговорот железа в Глубоком озере. — Труды гидробиол. общества, 11, 5.
- Соколова-Дубинина Г. А., Дерюгина З. П. 1967. Изучение процесса образования железо-марганцевых конкреций в озере Пуннус-Ярви. — Микробиол., 36, 1066.
- Соколова-Дубинина Г. А., Дерюгина З. П. 1968. Влияние условий озерной среды на микробиологическое образование марганцевой руды. — Микробиол., 37, 147.
- Страхов Н. М. 1947. Железорудные фашии и их аналоги в истории Земли. — Тр. Ин-та геол. наук АН СССР, вып. 73, геол. сер. № 22.
- Страхов Н. М. 1962. Основы теории литогенеза. М., Изд-во АН СССР.
- Тен Хук Мун. 1968. О биологической природе железо-марганцевых корок почвообразующих пород в горных почвах Сахалина. — Микробиол., 37, 749.
- Трошинов Э. П. 1964. Бактерии, восстанавливающие марганец и железо в допных осадках. — В кн. «Роль микроорганизмов в образовании железо-марганцевых озерных руд» Гуревич М. С. (ред.). М.—Л., «Наука», стр. 118.
- Францев А. В. 1959. Марганец в Учинском водохранилище. — Труды Всесоюз. гидробиол. общества, 9, 13.
- Хири П. 1968. Биология почкующихся бактерий. — Микробиология, 37, 953.
- Холодный Н. Г. 1953. Железобактерии. М., Изд-во АН СССР.
- Штернберг Л. Е., Степанова К. А., Стравинская Е. А., Уранова О. В. 1968. Состав и происхождение микроконкреций профундали озера Пуннус-Ярви. — Литология и полезные ископаемые, № 6, 105.
- Allen J. A. 1960. Manganese deposition on the shells of living molluscs. — Nature, 185, 336.
- Aristovskaja T. V., Zavarzin G. A., 1970. Biochemistry of iron in soil. — In: Soil Biochemistry, v. 2, McLaren A. D. and Skujins J. J. (Eds), p. 385.

- Arrhenius G.* 1963. Pelagic sediments. — In: The sea, v. 3. M. N. Hills (Ed), N. Y., Intersci. Publ., p. 655.
- Baier C. R.* 1937. Die Bedeutung der Bakterien für die Bildung oxydischer Eisen und Manganerze. — Geol. Meere und Binnengewässer, **1**, 325.
- Bauernfeind A., Poschenrieder H.* 1960. Untersuchungen über die Manganfeststellung durch Bodenbakterien. — Bayer. Landwirtschaft. Jahrb., **37**, 610.
- Beijerinck M. W.* 1913. Oxidation des Mangancarbonates durch Bakterien und Schimmelpilze. — Verzam. Geschr. van M. W. Beijerinck, **4**, 242, 1922.
- Beger H.* 1937. Die Biologie der Eisenbakterien (Die Eisenfällung). — Gas und Wasserfach., **80**, 779.
- Beger H.* 1949a. Beiträge zur Systematik und geographischen Verbreitung der Eisenbakterien. — Ber. Dtsch. bot. Ges., **62**, 7.
- Beger H.* 1949b. Über *Zoogloea fillipendula* Formen und einige neue Eisenbakterien. — Zbl. Bakteriologie, I Abt., **154**, 61.
- Beger H.* 1966. Leitfaden der Trink- und Brauchwasserbiologie. II Abt. Stuttgart, Fischer.
- Beger H., Bringmann G.* 1953. Bisherige Anschauung über die Morphologie von *Gallionella* und neuere elektronmikroskopische Befunde. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., **107**, 20.
- Bergey's Manual of determinative bacteriology. 7th ed. Baltimore, Williams a. Wilkins, 1957.
- Branter H.* 1970. Untersuchungen zur biologischen Eisen- und Manganoxidation. — Zbl. Bakteriologie, II Abt., **124**, 412.
- Bromfield S. M.* 1956. Oxidation of manganese by soil microorganisms. Austral. J. Biol. Sci., **9**, 238.
- Bromfield S. M., Skerman V. B. D.* 1950. Biological oxidation of manganese in soils. — Soil Sci., **69**, 337.
- Cataldi M. S.* 1939. Estudio Fisiologico y Systematico de Algunas Chlamydocacteriales. — Thesis. Univ. Buenos Aires. Citr. no *Pringsheim*, 1949.
- Charlet E., Schwartz W.* 1954. Beiträge zur Biologie der Eisenmikroben. Untersuchungen über die Lebensweise von *Leptothrix ochracea* und einigen begleitenden Eisenmikroben. — Schweiz. Z. Hydrobiologie, **16**, 318.
- Cholodny N.* 1926. Die Eisenbakterien. — Pflanzenforschung, **14**, 1.
- Darland G., Brock T. D., Samsonoff W., Conti S. F.*, 1970. A thermophilic acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. — Science, **170**, 1416.
- Dondero N. C.* 1961. *Sphaerotilus*, its nature and economic significance. — Advanc. Appl. Microbiologie., **3**, 77.
- Dorff P.* 1934. Die Eisenmicroorganismen. — Pflanzenforschung, **16**.
- Drake H.* 1965. Occurrence of *Siderocapsa treubii* in certain waters of the Niederrhein. — Gewässer und Abwässer, **39/40**, 41.
- Dubinina G. A.* 1970. Untersuchungen über die Morphologie von *Metallogentum* und die Beziehungen zu Mycoplasma. — Z. allg. Mikrobiologie, **10**, 309.
- Ehrlich H. L.* 1963. Bacteriology of manganese nodules. I. Bacterial action on manganese in nodule enrichment. — Appl. Microbiologie., **11**, 15.
- Ellis D.* 1907. Iron bacteria and their connection with stone decay. — Proc. Roy. Philos. Soc. Glasgow, **37**, 175.
- Ellis D.* 1919. Iron bacteria. London, Methuen Co.
- Gerretsen F. C.* 1937. Manganese deficiency of oats and its relation to soil bacteria. — Ann. Bot. London, **1**, 207.
- Hairiya Y., Kikuchi T.* 1964. Precipitation of manganese by bacteria in mineral springs. — Nature, **202**, 416.
- Hanert H.* 1968. Untersuchungen zur Isolierung, Stoffwechselphysiologie und Morphologie von *Gallionella ferruginea* Ehrenberg. — Arch. Mikrobiologie., **60**, 348.
- Hanert A.* 1970. Struktur und Wachstum von *Gallionella ferruginea* Ehrenberg am natürlichen Standort in den ersten 6 Std. der Entwicklung. — Arch. Mikrobiologie, **75**, 10.

- Hardmann I., Henrici A. 1939. Studies of freshwater bacteria. V. Distribution of *Siderocapsa treubii* in some lakes and streams. — J. Bacteriol., **37**, 97.
- Hayflick L. (Ed.) 1969. The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. Amsterdam, North Holland Publ. Co.
- Hochster R. M., Quastel J. H. 1952. Manganese dioxide as a terminal electron acceptor in the study of respiratory systems. — Arch. Biochem. and Biophys., **36**, 132.
- Kalbe D. L. 1966. Planktische Bakterien mit Eisen und Manganabscheidungen. — Mikrokosmos, **55**, 137.
- Kenten H. H., Mann P. J. G. 1949. The oxidation of manganese by plant extracts in the presence of hydrogen peroxide. — Biochem. J., **45**, 255.
- Kenten H. H., Mann P. J. G. 1950. The oxidation of manganese by peroxidase systems. — Biochem. J., **46**, 66.
- Krauskopf K. B. 1957. Separation of manganese from iron in sedimentary processes. — Geochim. et cosmochim. acta, **12**, 61. Русский перевод: в кн. «Геохимия литогенеза», стр. 258. А. Б. Ронов (ред.). М., ИЛ.
- Kral I. M., Hirsch P., Staley I. I. 1970. *Toxothrix trichogenes* (Chol.) Beger et Bringmann: the organism and its biology. — Ant. Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., **36**, 409.
- Kucera A., Wolfe R. 1957. A selective enrichment method for *Gallionella ferruginea*. — J. Bacteriol., **74**, 344.
- Leeper G., Swaby R. 1940. The oxidation of manganese compounds by microorganisms in the soil. — Soil Sci., **49**, 163.
- Lieske R. 1911. Beitrag zur Kenntnis der Physiologie von *Spirophyllum ferrugineum* Ellis, einem typischen Eisenbakterium. — Jahrb. wiss. Bot., **49**, 91.
- Lieske R. 1919. Zur Ernährungsphysiologie der Eisenbakterien. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **49**, 413.
- Mann P. J. G., Quastel J. H. 1946. Manganese metabolism in soils. — Nature, **158**, 154.
- Molisch H. 1910a. *Siderocapsa treubii* Molisch, eine neue weitverbreitete Eisenbakterie. — Ann. Jahr. Buitenzorg., **5**, 29.
- Molisch H. 1910b. Die Eisenbakterien. Jena. Fischer.
- Molisch H. 1926. Die Eisenorganismen in Japan. — In: Pflanzenbiologie in Japan. Jena, p. 30.
- Mulder E. G. 1964a. Iron bacteria, particularly those of the *Sphaerotilus-Leptothrix* group and industrial problems. — J. Appl. Bacteriol., **27**, 151.
- Mulder E. G. 1964b. Some observations on the *Sphaerotilus* group. — In: Principles and applications in aquatic microbiology, 98.
- Mulder E. G., van Veen W. L. 1963. Investigation on the *Sphaerotilus-Leptothrix* group. — Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., **29**, 121.
- Naumann E. 1921. Untersuchungen über die Eisenorganismen Schwedens. Kgl. Svenska Vetenskaps akad. Handl., **62**. Cur. no Dorff, 1934.
- Ottow J. C. G. 1969. The distribution and differentiation of iron reducing bacteria in gley soils. — Zbl. Bakteriol., II Abt., **123**, 600.
- Panknin W. 1941. Über ein Vorkommen von *Leptothrix echinata* Beger in Tiefplankton des Scharmützelsees bei Beeskow (Mark Brandenburg.) — Zbl. Bakteriol., II Abt., **103**, 400.
- Poindexter J., Lewis R. F. 1966. Recommendations for revision of the taxonomic treatment of stalked bacteria. — Internat. J. Syst. Bacteriol., **16**, 377.
- Präze P. 1957. Untersuchungen über die Stoffwechselphysiologie des Eisenbakteriens *Leptothrix ochracea* Kütz. — Arch. Mikrobiol., **27**, 33.
- Pringsheim E. G. 1949a. Iron bacteria. — Biol. Revs Cambridge Philos. Soc., **24**, 200.
- Pringsheim E. G. 1949b. The filamentous bacteria *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Cladotrix* and their relation to iron and manganese. — Trans. Roy. Soc. London, ser. B, **233**, 453.
- Pringsheim E. G. 1963. Farblose Algen. Jena. Fischer.

- Quastel J., Mann P. 1946. Manganese metabolism in soils. — *Nature*, **158**, 154.
- Redinger K. 1931. *Siderocapsa coronata* Redinger eine neue Eisenbakterie aus Lunzer Obersee. — *Arch. Hydrobiol.*, **49**, 132.
- Recháčková V. 1963. *Leptothrix echinata* Beger in dem Stausee Klíčava (Böhmen, Tschechoslowakei). — *Zbl. Bakteriol.*, II Abt., **117**, 189.
- Rouf M. A., Stokes J. L. 1964. Morphology, nutrition and physiology of *Sphaerotilus discophorus*. — *Arch. Mikrobiol.*, **49**, 132.
- Ruttner F. 1938. Limnologische Studien an einigen Seen der Ostalpen. — *Arch. Hydrobiol.*, **32**, 162.
- Štůja H. 1948. Taxonomie des Phytoplanktons einiger Seen in Uppland Sweden. — *Symbolae Bot. — Uppsal.*, **9**, 1—399.
- Skuja H. 1956. Taxonomische und biologische Studien über das Phytoplankton Schwedischer Binnengewässer. — *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Uppsala*, Ser. IV, **16**, 1—404.
- Söhngen N. Z. 1914. Umwandlungen von Manganverbindungen unter dem Einfluss mikrobiologischer Prozesse. — *Zbl. Bakteriol.*, II Abt., **40**, 545.
- Stanier R. Y., van Niel C. B. 1941. The main outlines of bacterial classification. — *J. Bacteriol.*, **42**, 437.
- Starr M. P., Skerman V. B. D. 1965. Bacterial diversity: the natural history of selected morphologically unusual bacteria. — *Ann. Rev. Microbiol.*, **19**, 407.
- Stokes J. L. 1954. Studies on the filamentous sheathed iron bacterium *Sphaerotilus natans*. — *J. Bacteriol.*, **67**, 278.
- Stokes J. L. 1966. Manganese oxidation by *Sphaerotilus discophorus*. — *J. Bacteriol.*, **72**, 248.
- Timonin M. I. 1950. Soil microflora in relation to manganese deficiency. — *Sci. Agric.*, **30**, 324.
- Tyler P. A., Marshall K. C. 1967. Form and function in manganese oxidizing bacteria. — *Arch. Mikrobiol.*, **56**, 344.
- Van Iterson W. 1958. *Gallionella ferruginea* Ehrenberg in a different light. — *Verhandel. Konink. niederl. Akad. wet. Reeks 2*, 52.
- Vatter A. E., Wolfe R. 1956. Electron microscopy of *Gallionella ferruginea*. — *J. Bacteriol.*, **72**, 248.
- Vavra J. P., Frederick L. R. 1952. The effect of sulphur oxidation on the availability of manganese. — *Soil Sci. Soc. America Proc.*, **16**, 141.
- Wolfe R. 1964. Iron and manganese bacteria. — In: *Principles and applications aquatic microbiology*, 82.
- Zavarzin G. A. 1968. Bacteria in relation to manganese metabolism. — In: *The ecology of soil bacteria*. T. R. G. Gray and Parkinson D. (Eds). Liverpool Univ. Press, p. 612.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Литотрофные бактерии принадлежат к таксономически различным группам организмов. Тионовые и водородные бактерии тяготеют к псевдомонадам, а нитрифицирующие бактерии, по-видимому, близки к метанооксиляющим и вместе с ними к почкующимся бактериям. Слабо изученные серобактерии по своей морфологии так сходны с синезелеными водорослями, что несомненно они должны быть объединены с ними. Разнообразие морфологии литотрофных бактерий заставляет сделать вывод, что у бактерий не существует морфофизиологического единства, и морфологические и физиологические признаки свободно комбинируются друг с другом. Это представляет значительную трудность для систематики, так как оказывается невозможным разбить объекты на четко разграниченные таксоны. Вследствие этой особенности бактериальной системы сравнительные методы, разработанные на высших организмах, мало плодотворны при применении к бактериям.

Биохимические механизмы, обуславливающие литотрофный обмен, включают: 1) оксидоредуктазы с неорганическим донором электрона, сопряженные с системой фосфорилирования, 2) ферменты восстановительного пентозофосфатного цикла, 3) биосинтетический тип регуляции. Эти отличия достаточно невелики, чтобы сделать возможным переход от литотрофного к органотрофному обмену и обратно. Отсюда следует возможность независимого возникновения способности к литотрофному обмену в разных группах организмов.

Часто ставится вопрос о том, кто был первыми обитателями Земли: автотрофы, способные синтезировать все необходимые им органические вещества из минеральных, или гетеротрофы? Такая постановка вопроса некорректна, так как можно говорить лишь об экосистеме, включающей и органические и неорганические факторы. При этом становится очевидно, что все соединения, которые организм неспособен синтезировать сам, должны синтезироваться в среде и, следовательно, в этом смысле усложнения экосистемы не происходит.

Относительно характера первичных прокариотных экосистем на Земле до появления синезеленых водорослей можно лишь строить гипотезы. Экспериментальные данные показывают, что бакте-

рии существовали и функционировали одновременно с образованием первых осадочных пород. Об этом свидетельствуют находки бактериальных клеток в древнейших осадочных породах и данные органической геохимии. Таким образом, бактерии представляют наиболее длительно действовавший биологический фактор на Земле. Судить о деятельности литотрофных бактерий можно по тем геохимическим изменениям, которые они производят в окружающей обстановке. Другой подход состоит в том, чтобы сопоставить предполагаемые условия в отдаленный период времени с физиологией современных микроорганизмов. Литотрофные бактерии способны использовать вещества, выделяющиеся в поствулканической деятельности: водород, окись углерода, метан, аммиак, соединения серы. Учитывая, что некоторые из них являются анаэробами, можно допускать, что они находили условия для своего развития и в древнейшие периоды истории Земли, когда образование кислорода и органических веществ в процессе фотосинтеза еще не было ведущим биогеохимическим процессом. Обильное развитие литотрофных бактерий на современных вулканах является дополнительным указанием, что так могло быть и в прошлом.

В современной экологической системе, где ведущим является цикл углерода, литотрофные бактерии осуществляют циклы других биогенных элементов. В разложении органического вещества, образованного фотосинтезирующими организмами, можно выделить три этапа. При аэробном разложении органического вещества до 60% его вновь ассимилируется микроорганизмами, а 40% освобождается в виде углекислоты. Брожение органических веществ под действием первичных анаэробов характеризуется накоплением летучих органических кислот, прежде всего уксусной. При этих брожениях образуется также водород. Вторичные анаэробы используют продукты первичных брожений, образуя сероводород и метан.

Литотрофные бактерии окисляют восстановленный азот аминок групп, освободившийся при аэробном разложении органических веществ. В этом процессе участвуют нитрификаторы. Водород, выделяющийся при первичных брожениях, обуславливает развитие водородных бактерий. Водород используется также вторичными анаэробами — сульфатвосстанавливающими и метанобразующими бактериями — которых также можно отнести к литотрофам, хотя они могут окислять и органические вещества. Образующийся при этом сероводород окисляется тионовыми и серными бактериями. Формально метанокисляющие бактерии метилотрофы, не могут быть отнесены к литотрофным организмам, но фактически они имеют много общего с ними как по месту в экосистеме, так и по регуляции обмена. Окисление горючих газов особенно характерно для литотрофных бактерий, так как эти вещества, образуясь в анаэробной зоне как конечные продукты анаэробных превращений, самопроизвольно поднимаются в окислительную зону.

Развиваясь на границе между окислительной и восстановительной зонами, литотрофные бактерии способствуют установлению резкой границы между ними. Здесь могут происходить сопряженные с основной побочные химические реакции веществ, на которые литотрофные бактерии непосредственно не воздействуют. Отсюда следует первостепенное значение литотрофных бактерий для геохимии. Часто можно составить предварительное представление о том, какие ассоциации минералов могут возникнуть под действием литотрофных бактерий, сопоставляя поля устойчивости минералов с той областью E_h — рН, в которой развиваются литотрофные бактерии.

Таким образом, литотрофные бактерии, несмотря на то, что они составляют немногочисленную, уникальную по своей физиологии группу, вносят значительный вклад в превращения веществ в экологической системе.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
ГЛАВА 1. ХЕМОЛИТОТРОФНЫЙ ОБМЕН	7
Открытие хемосинтеза	7
Типы питания	11
Перенос электрона	16
Автотрофная ассимиляция углекислоты	26
Синтез мономеров хемоавтотрофами	34
Взаимосвязь полиферментных систем обмена	39
Литература	49
ГЛАВА 2. ВОДОРОДНЫЕ БАКТЕРИИ	54
История открытия	54
Выделение, культивирование и систематика водородных бактерий	56
Окисление водорода	66
Конструктивный обмен	71
Органотрофный рост водородных бактерий	79
Лизис водородных бактерий	80
Возможное применение водородных бактерий	81
Окисление одноуглеродных соединений водородными бактериями	85
Водородная денитрификация	90
Литература	99
ГЛАВА 3. АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ВОДОРОДА. МЕТАНОБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ	106
История открытия	108
Выделение, культивирование и систематика	111

Биохимия образования метана	122
Образование летучих органических кислот из углекислоты и водорода	128
Образование метана в природе	130
Литература	135
ГЛАВА 4. АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ВОДОРОДА. СУЛЬФАТВОСТАНАВЛИВАЮЩИЕ БАКТЕРИИ	138
История открытия	138
Выделение и систематика	141
Литогетеротрофный рост	146
Биохимия сульфатовосстанавливающих бактерий	149
Практическое значение	154
Литература	157
ГЛАВА 5. МИКРООРГАНИЗМЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ СЕРЫ	162
История открытия	162
Серобактерии	166
Таксономия серобактерий	171
Тионовые бактерии	180
Физиологические типы и систематика тионовых бактерий	182
Биохимия тионовых бактерий	196
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> Colmer et Hinkle, 1947	204
Сернокислотное выветривание и выщелачивание металлов из руд	211
Литература	214
ГЛАВА 6. НИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ	222
История открытия нитрификации	222
Выделение нитрификаторов	227
Первая фаза нитрификации	228
Биохимия окисления аммиака	238
Вторая фаза нитрификации	242
Биохимия окисления нитрита	247
Нитрификация в круговороте азота	252
Литература	255
ГЛАВА 7. ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИИ	261
История изучения и основные группы микроорганизмов	261

Образующие охру бактерии	264
Окисление органических соединений железа	277
Окисление марганца микроорганизмами	281
Отложение железа	289
Систематика железобактерий	292
Литература	313
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	318

ГЕОРГИИ АЛЕКСАНДРОВИЧ
ЗАВАРЗИН
ЛИТОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Утверждено к печати
Институтом микробиологии
Академии наук СССР

Редактор Л. И. Кузьмина
Художник Н. П. Шевцов
Технический редактор Р. М. Денисова

Сдано в набор 11/1 1972 г.
Подписано к печати 8/VIII 1972 г.
Формат 60×90^{1/16}. Усл. печ. л. 21,12
Уч.-изд. л. 22,3. Тираж 1600 экз.
Тип. зак. 1072. Бумага № 1. Т-14066.
Цена 1 р. 92 к.

Издательство «Наука», 103717 ГСП,
Москва, К-62, Подсосенский пер., 21

Набрано в Чеховском полиграфкомбинате
Главполиграфпрома Комитета по печати
при Совете Министров СССР
г. Чехов, Московской области

Отпечатано во 2-й типографии
издательства «Наука».

121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10