

УДК 631.461.1

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM В ЗОНАЛЬНЫХ ПОЧВАХ

А. К. ГОРОВА, В. Т. ЕМЦЕВ

(Кафедра микробиологии)

Представители рода *Clostridium* широко распространены в природе, наиболее часто они обнаруживаются в почве. Это весьма разнообразная группа микроорганизмов, включающая сахаро-, пектино-, пурино- и протеолитические анаэробы. Наиболее подробно изучены сахаролитические клостридии [2, 5, 10, 15 и др.]. Мало исследованы протеолитические анаэробы, особенно как обитатели почвенных микробеценозов [12, 20—23]. Эти микроорганизмы исследовались главным образом в медицинской микробиологии как возбудители раневых инфекций, пищевых отравлений и других клостридиозов. Однако в последние годы протеолитические анаэробы привлекли внимание и почвенных микробиологов. Было показано, что большинство бактерий рода *Clostridium* находится в почве в состоянии вегетативных клеток и участвует в ряде важных биохимических процессов, в частности в протеолизе почвенных белков, входящих в состав растительных и животных остатков, гумуса, навоза, микробной массы, обогащая таким образом почву доступным для растений азотом [4, 5, 14].

Известно, что белки разлагаются как аэробными, так и анаэробными микроорганизмами. Имеются обширные литературные данные о трансформации белковых соединений аэробными микроорганизмами, показана роль последних в этом процессе, установлены основные закономерности их распространения в различных почвах [7, 9, 11, 13 и др.].

Цель нашей работы изучить распространение протеолитических анаэробов в различных типах почв и исследовать динамику их численности в течение вегетационного периода.

Материалы и методы

Для количественного учета протеолитических *Clostridium* были взяты следующие почвы широтных почвенных зон:

1) таежно-лесной — дерново-подзолистая почва Московской области (Опытная станция полеводства Тимирязевской академии); почва мощнодерновая сильноподзолистая,

2) степной — типичный чернозем Воронежской области, Каменная степь (территория Института сельского хозяйства Центральной черноземной области им. В. В. Докучаева),

3) зона сухих степей — светло-каштановая почва Кировабадской области,

4) пустынные степи — серозем Ташкентской области.

Образцы почв отбирали из горизонтов A_0 и A_1 целинных почв и пахотного слоя окультуренных почв (ежемесячно в течение вегетационного периода).

Численность протеолитических анаэробов определяли путем посева почвы из водной суспензии на питательные среды; почву предваритель-

но обрабатывали по Д. Г. Звягинцеву [6]. При подборе сред для количественного учета почвенных протеолитических *Clostridium* исходили из следующих моментов. Все они гидролизуют желатину, большинство видов способны к сульфитредукции — в среде, содержащей сульфиты и соли железа, образуют колонии черного цвета или вызывают ее почернение. Многие представители этой группы сбрасывают один или несколько углеводов в отличие от сахаролитических видов, ферментирующих широкий набор сахаров.

Для количественного учета протеолитических *Clostridium* было испытано 6 сред.

Т а б л и ц а 1

Сравнительное испытание питательных сред для количественного учета протеолитических *Clostridium* (число клеток чистой культуры в 1 мл бульонной культуры или в 1 г абсолютно сухой почвы)

Вид микроорганизма и название почвы	Номер среды					
	1	2	3	4	5	6
<i>Cl. lentoputrescens</i> M1	25·10 ⁵	950·10 ⁵	2500·10 ⁵	950·10 ⁵	75·10 ⁵	0,4·10 ⁵
<i>Cl. sporogenes</i> 532	20·10 ⁵	340·10 ⁵	2400·10 ⁵	4500·10 ⁵	250·10 ⁵	0,25·10 ⁵
<i>Cl. sporogenes</i> 322	15·10 ⁵	950·10 ⁵	1500·10 ⁵	950·10 ⁵	450·10 ⁵	Роста нет в 3-м разведении
<i>Cl.</i> , штамм С ₃ протеолитический	75·10 ⁵	450·10 ⁵	1500·10 ⁵	1500·10 ⁵	450·10 ⁵	То же
<i>Cl. putrificum</i> 495	12·10 ⁵	200·10 ⁵	950·10 ⁵	300·10 ⁵	20·10 ⁵	» »
<i>Cl. pasteurianum</i> MU-1	Желатину не разжижает	Желатину не разжижает	Есть рост, но колонии не черного цвета	Слабый рост без почернения среды	Рост отсутствовал в 3 разведениях	Роста нет во 2-м разведении
<i>Cl. butyricum</i> b ₇	То же	То же	Роста нет	То же	То же	То же
<i>Cl. butyricum</i> ЯП ₂	» »	» »	» »	Роста нет	» »	» »
<i>Cl. butyricum</i> bc	» »	» »	Слабый рост в 1-м разведении, но колонии не черного цвета	Слабый рост без почернения среды	Роста нет в 1-м разведении	» »
<i>Cl. tyrobutyricum</i> 1757	» »	» »	То же	То же	То же	Роста нет в 3-м разведении
<i>Cl. tertium</i> 44	» »	» »	» »	» »	Рост отсутствовал во 2-м разведении	То же
<i>E. coli</i>	Есть рост без разжижения желатины	Есть рост без разжижения желатины	Рост без почернения среды	Рост без почернения среды	—	—
<i>E. coli</i> 42	То же	То же	Почернение среды	Почернение среды	—	—
Дерново-подзолистая почва	6,8·10 ⁸	9,4·10 ⁸	10,8·10 ⁸	9,5·10 ⁸	4,5·10 ⁸	Рост отсутствовал во 2-м разведении
Светло-каштановая почва	64,3·10 ⁸	167,0·10 ⁸	287,0·10 ⁸	250·10 ⁸	75·10 ⁸	15·10 ⁸

Среда № 1 — мясо-пептонный бульон с 10% желатины, смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл на 1 л среды, дрожжевой экстракт — 7 мг на 1 л среды, пептон — 3%.

Среда № 2 — это среда № 1 с 1% глюкозы.

В обе среды вносили окислительно-восстановительный индикатор — нейтральрот (rH_2 — 3,2) в концентрации 0,004%, рН 7,2—7,4. Стерилизацию сред проводили при 0,5 ат (49,0332 кПа) в течение 30 мин.

Среда № 3 — модифицированная нами среда, предложенная Биренс и Гарсиа [17] для количественного определения сульфитредуцирующих протеолитических видов *Clostridium* (среда TGTS, 1970). В ее состав входят: триптиказеин — 15 г, дрожжевой экстракт — 10 г, глюкоза — 1 г, агар — 15 г, дистиллированная вода — 1000 мл. К этой агаризованной основной среде, расплавленной в кипящей водяной бане, добавляют 0,25 мл 5%-ного раствора железозамещенного цитрата и 1 мл раствора тирозина с сульфитом натрия. Смесь аминокислоты с сульфитом готовят следующим образом: 0,8 г l-тирозина и 2,5 г $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Для полного растворения тирозина добавляют углекислую соду 1 н. концентрации.

Стерилизацию основной среды и смеси тирозин — сульфит производят при 1 ат (98,0664 кПа) в течение 15 мин.

Нами был модифицирован состав основной среды, входящей в триптиказеин — глюкоза — тирозин — сульфит среду: гидролизат казеина — 50%, пептон — 3, глюкоза — 0,1, дрожжевой автолизат — 4%, смесь микроэлементов по Форду — 10 мл на 1 л среды, агар — 1,5%, дистиллированная вода — до 1000 мл.

Среда № 4 — модифицированная мясо-пептонная глюкозная среда Вильсон — Блера, рекомендуемая Пести [19] для учета протеолитических анаэробов рода *Clostridium*. Перед засевом к расплавленной среде добавляли отдельно простерилизованный фильтрацией 40%-ный раствор $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 1%-ный раствор FeSO_4 из расчета конечной дозы соответственно 0,2 и 0,005%.

Среда № 5 (СААМ) — модификационная селективная среда для анаэробов (ССА), предложенная А. В. Гудковым [3] и используемая для количественного учета протеолитических *Clostridium* в молочных продуктах. Состав среды по Гудкову: триптический гидролизат казеина — 1,5%, дрожжевой экстракт — 1, цистеин — 0,05, агар — 2%. Селективные условия создаются путем внесения в среду смеси двух антибиотиков: неомицина и полимиксина М в концентрациях соответственно 50 мкг/мл и 50 ед/мл. Большинство сахаролитов в среде не развиваются, из протеолитов учитывались *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. botulinum*. К этим антибиотикам чувствителен *Cl. bifermentans*.

Состав данной среды был нами модифицирован. В нее вносили также нейтральрот в концентрации 0,004% как специфический индикатор присутствия *Clostridium*. Таким образом, состав модифицированной селективной среды для анаэробов (ССАМ) был следующим: гидролизат казеина — 50%, пептон — 3, дрожжевой автолизат — 4, NaCl — 0,3, ацетат натрия — 0,1, агар — 0,1%, смесь микроэлементов по Форду — 10 мл на 1 л среды, цистеин — 0,05%, дистиллированная вода — до 1000 мл, нейтральрот — 1 мл 4%-ного водного раствора на 1 л. Ацетат натрия добавляли для стимуляции роста споровых анаэробов, агар — для снижения ОВП. рН 7,2—7,4. Стерилизацию среды проводили при 0,5 ат (49,0332 кПа) в течение 30 мин. Неомицин (50 мкг/мл) и полимиксин М (50 ед/мл) стерилизовали фильтрацией и вносили в среду перед употреблением.

Среда № 6 — это среда № 5, в которой в качестве селективного агента вместо смеси антибиотиков использовали азид натрия в концентрации 0,03%.

Снижение окислительно-восстановительного потенциала у всех ука-

занных выше сред обуславливалось внесением 0,05% цистеина. Все среды перед употреблением кипятили 20 мин для удаления растворенного кислорода воздуха.

Агаризованные среды после посева и их застывания заливали слоем голодного агара. Инкубацию посевов проводили в термостате при температуре 37°. Разведения чистых культур и разведения почвы (от 1/10 до 1/10 000 000) вносили по 1 мл в пробирку с 10 мл соответствующей среды (размер пробирки 1×25 см).

Количество протеолитических клостридий подсчитывали методом предельных разведений, а число клеток протеолитических *Clostridium* в 1 мл культуры бактерий и в 1 г почвы — по таблицам Мак-Креди в 4-кратной повторности.

Наблюдения за ростом и учет протеолитических клостридий проводили каждые сутки в течение 7—10 дней по ряду показателей.

Для сред № 1 и 2:

1) по снижению rH_2 среды (восстановление нейтральрота *Clostridium* приводит к флюоресценции среды, которая приобретает золотисто-желтую окраску);

2) разжижению желатинны (пробирки с посевами выдерживали при температуре 4° в течение 3 ч, контролем служила пробирка с незаженной средой);

3) наличию брожения (преимущественно в среде № 2 в результате сбраживания глюкозы и образования CO_2 и H_2 . На среде № 1 газообразование было умеренное. Протеолитические виды *Clostridium*, как известно, в жидких питательных средах без углеводов не образуют достаточного количества газа. В их культурах очень сильный гнилостный запах;

4) по микроскопической картине (присутствие клеток, типичных для протеолитических *Clostridium*).

Для сред № 3 и 4:

Рост протеолитических *Clostridium* отмечали в пробирках, в которых наблюдали образование колоний черного цвета или общее почернение среды вследствие редукции сульфита натрия в сульфид, который, соединяясь с солями железа, образует черный осадок сернистого железа.

Для сред № 5 и 6:

1) по изменению цвета нейтральрота,

2) по микроскопической картине.

Для определения пригодности указанных выше сред при количественном учете *Clostridium* были использованы чистые культуры протеолитических и сахаролитических споровых анаэробов. На испытанные питательные среды сделан также посев *E. coli* для установления возможности роста в данных условиях факультативных анаэробов.

Количество клеток протеолитических *Clostridium* определяли в дерново-подзолистой почве (Опытная станция полеводства) и в светло-каштановой почве (Кировобадская область). Коллекционные культуры *Cl. putrificum* и *Cl. sporogenes* были получены из ГосНИТИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, остальные культуры — из отдела микробиологии ВНИИ маслodelьной и сыродельной промышленности.

В среде № 3 создаются наиболее благоприятные условия для роста протеолитических *Clostridium* (табл. 1), что Биренс и Гарсиа объясняют стимулирующим воздействием тирозина, который связывается с сульфитом во время автоклавирования. На сахаролитические клостридии он оказывает ингибирующее действие и совсем не влияет на *Cl. perfringens*. Но мы отказались от этой среды при количественном определении споровых протеолитических анаэробов в почве, так как один штамм *E. coli* тоже дал почернение среды. Кроме того, из литературных данных [18] известно, что редуцировать сульфиты и вследствие этого вызывать почернение среды могут некоторые виды *Salmonella*, *Proteus* и *Bacteroides*,

обитающие и в почвах. Таким образом, данную среду нельзя использовать для количественного учета гнилостных анаэробов в таких смешанных популяциях, как почвенный микробеценоз. От использования среды № 4 мы отказались по этим же соображениям.

Значительное число клеток протеолитических *Clostridium* выявлено на среде № 2. На среде № 5 их было меньше, и для количественного учета протеолитических *Clostridium* мы ее не применяли, поскольку некоторые виды этих бактерий чувствительны к антибиотикам, но в дальнейшем она была использована в качестве селективной среды для выделения чистых культур из почвы.

На среде № 6 с азидом натрия в концентрации 0,05% наблюдали ингибирование гнилостных анаэробов, поэтому она не подходит для количественного подсчета этих микроорганизмов.

На наш взгляд, наиболее приемлемой для определения количества протеолитических *Clostridium* в почве является среда № 2, в которой учет ведется по протеолитической активности (разжижению желатин). Изменение цвета нейтральрота и появление золотисто-желтой флюоресценции указывают на присутствие клеток *Clostridium* в питательной среде. Сахаролитические виды не мешают подсчету, так как известно, что они не гидролизуют желатину. *E. coli*, развиваясь на этой среде, также не разжижает желатину. Кроме того, при подсчете проводили микроскопию на наличие в среде клеток, типичных для гнилостных анаэробов.

При изучении распространения протеолитических *Clostridium* в различных почвах для количественного определения этих бактерий были применены среда № 1 (без углеводов) и среда № 2 (с глюкозой).

Результаты и их обсуждение

Протеолитические анаэробы рода *Clostridium* распространены во всех исследованных почвах широтных зон Союза. В наибольшем количестве они содержатся в сероземе,

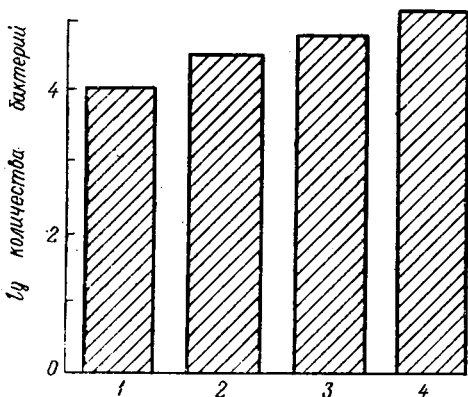


Рис. 1. Количество протеолитических анаэробов в целинных почвах.

1 — дерново-подзолистая; 2 — чернозем; 3 — светло-каштановая; 4 — серозем.

в наименьшем — в дерново-подзолистой почве (рис. 1). Количество анаэробов с протеолитическими свойствами в почвах с севера на юг несколько увеличивается, что видно из приведенных ниже данных (тыс. на 1 г абсолютно сухой почвы; среда № 1, 1976 г.).

Представляет интерес сопоставить полученные данные с результатами наших прежних исследований [5], которые показали, что по мере продвижения с севера на юг в почвах уменьшается численность маслянокислых бактерий и возрастает количество ацетобутиловых бактерий, обладающих, как известно, протеолитической активностью.

В данном случае количество протеолитических анаэробов увеличилось в южных почвах.

Известно, что в дерново-подзолистой почве вследствие сравнительно низкой биогенности и слабой скорости минерализации раститель-

Почвенная зона	Целинная почва	Окультуренная почва
Тажно-лесная, дерново-подзолистая почва (ТСХА)	14,3	27,0
Степная, чернозем типичный (Воронежская обл.)	31,9	79,0
Сухих степей, светло-каштановая почва (Кировабадская обл.)	64,3	180,0
Пустынных степей, серозем (Ташкентская обл.)	125,0	198,0

ных остатков накапливается большое количество легкодоступных соединений (типа углеводов), что обуславливает преимущественное развитие маслянокислых бактерий. Но именно эти условия оказываются неблагоприятными для развития протеолитических анаэробов, которые требуют наличия белков и пептидов для нормального роста [16].

Для почв южных районов характерна быстрая минерализация растительных остатков, что ограничивает развитие маслянокислых бактерий. Вследствие большой обогащенности этих почв белком из-за высокой биогенности среди анаэробов доминирующее положение начинают занимать протеолитические анаэробы.

Ниже приводятся результаты количественного учета протеолитических анаэробов (тыс. в 1 г абсолютно сухой почвы; среда № 2, 1976 г.) в различных почвах (на среде с углеводами):

Почвенная зона	Целина	Окультуренная почва
Тажно-лесная, дерново-подзолистая почва (ТСХА)	14,4	28,1
Степная, типичный чернозем (Воронежская обл.)	42,0	53,2
Сухих степей, светло-каштановая почва (Кировобадская обл.)	80,0	183,0
Пустынных степей, серозем (Ташкентская обл.)	150,0	254,3

Как видно из представленных данных, протеолитические анаэробы, сбраживающие углеводы, в южных почвах также встречаются в большем количестве, чем в северных. Их численность возрастает в августе и сентябре (табл. 2, 3 и рис. 2).

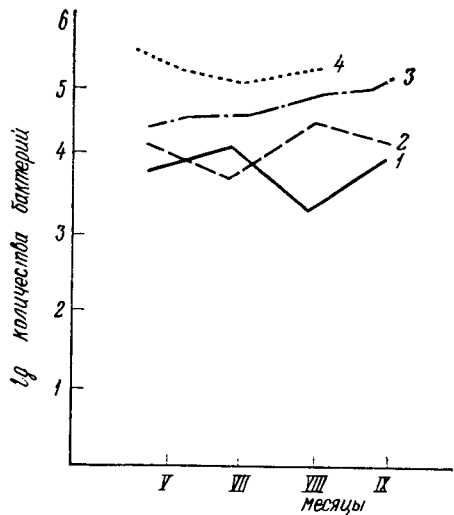


Рис. 2. Динамика численности протеолитических анаэробов в течение вегетационного периода в целинных почвах.

Обозначения те же, что на рис. 1.

Т а б л и ц а 2

Динамика численности протеолитических анаэробов в течение вегетационного периода в различных почвах (тыс. в 1 г абсолютной сухой почвы). Среда № 1, 1976 г.

Почва	Май	Июль	Август	Сентябрь
Дерново-подзолистая:				
целинная	5,91	6,8	14,3	5,3
окультуренная	—	18,9	27,0	20,0
Чернозем:				
целинная	15,7	18,0	31,9	20,0
окультуренная	—	32,3	79,0	37,7
Светло-каштановая:				
целинная	24,1	28,4	64,3	58,3
окультуренная	—	42,3	180,0	76,0
Серозем:				
целинная	114,0	105,0	125,3	—
окультуренная	—	165,0	198,0	—

П р и м е ч а н и е: — учет не проводили.

Динамика численности протеолитических анаэробов, сбраживающих углеводы, в течение вегетационного периода в различных почвах (тыс. в 1 г абсолютно сухой почвы). Среда № 2. 1976 г.

Почва	Май	Июль	Август	Сентябрь
Дерново-подзолистая:				
целинная	10,7	9,4	14,4	15,9
окультуренная	—	28,2	28,1	36,0
Чернозем:				
целинная	19,9	26,9	42,0	66,0
окультуренная	—	29,0	53,2	55,4
Светло-каштановая:				
целинная	45,4	26,3	80,0	88,4
окультуренная	—	38,1	183,0	118,0
Серозем:				
целинная	183,0	115,4	150,0	—
окультуренная	—	188,1	254,3	—

П р и м е ч а н и е: — учет не проводили.

Сходные результаты были получены при изучении динамики численности аэробных аммонификаторов — максимальное их количество наблюдалось осенью [8, 9]. Вероятно, такую тенденцию можно объяснить благоприятными условиями для их жизнедеятельности в этот период: накоплением растительных остатков, содержащих белковые вещества, обогащением почвы биологически активными соединениями и т. д.

Что касается влияния окультуривания почвы на распространение протеолитических анаэробов, то, по нашим данным, в большинстве исследованных почв их численность была меньше на целине.

Выводы

1. Сравнительное изучение пригодности различных сред для количественного учета протеолитических *Clostridium* в почве показало, что наиболее приемлемыми являются среды № 1 (мясо-пептонная желатина без углеводов) и № 2 (мясо-пептонная желатина с глюкозой).

2. Протеолитические анаэробные бактерии рода *Clostridium* были обнаружены во всех исследованных почвах. Отмечена тенденция к увеличению численности указанных микроорганизмов в почвах с севера на юг. Их количество было наименьшим в дерново-подзолистой почве и наибольшим — в сероземе.

3. Установлено положительное влияние окультуривания почв на развитие протеолитических анаэробных бактерий рода *Clostridium*.

4. В большинстве исследованных почв максимальная численность протеолитических анаэробов выявлена в августе — сентябре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бургасов П. Н., Румянцев С. Н. Эволюция клостридиозов. М., «Медицина», 1974. — 2. Гудков А. А. Биология споровых анаэробов, вызывающих порчу сыров. Автореф. канд. дис. Вологда, 1965. — 3. Гудков А. В. Определение количества споровых анаэробов в молочных продуктах. «Молочная промышленность», 1966, № 11, с. 18—

21. — 4. Дуда В. И. и др. Роль анаэробных микроорганизмов в мобилизации и редукции железа, марганца и серы, а также в других почвенных восстановительных процессах при культуре риса. В сб.: Химия почв рисовых полей. М., «Наука», 1976, с. 44—75. — 5. Емцев В. Т. Почвенные анаэробные азотфиксаторы рода *Clostridium*. «Успехи

микробиологии», 1974, вып. 9, с. 153—183. — 6. Звягинцев Д. Г. Методы подготовки почвы к количественному учету микроорганизмов. Науч. докл. высшей школы. Биол. науки, 1969, № 3, с. 131—144. — 7. Илялетдинов А. Н. Микробиологические превращения азотфиксирующих соединений в почве. Алма-Ата, «Наука», 1976. — 8. Лапшина Н. А., Кручинина Л. К. Состав микрофлоры дерново-подзолистой супесчаной почвы. Тр. ВСХИЗО, 1973, вып. 68, с. 84—88. — 9. Кондратьева Е. В. Аммонификаторы почв Каракульского оазиса. «Узб. биол. журн.», 1972, № 1, с. 13—16. — 10. Мантейфель А. Я. Сравнительная характеристика возбудителей маслянокислого и ацетонобутилового брожения. «Микробиология», 1939, т. 8, вып. 9—10, с. 1096—1108. — 11. Митрофанова Н. С. Микробиологические особенности окультуренных южных черноземов и светло-каштановых почв. Тр. Ин-та почвоведения АН КазССР, 1969, т. 16, с. 90—123. — 12. Поляков В. А., Тютиков Ф. М., Катрич В. Н. К вопросу микробиологического исследования почв Чукотки. Тр. ВНИИ ветеринарии и санитарии, 1973, т. XIV, с. 50—60. — 13. Путьати-

на Т. Н. Разложение в почве различных белков и влияние их на состав микрофлоры. «С.-х. биол.», 1966, т. 1, № 5, с. 770—775. — 14. Соболева К. П., Волкова Д. А., Тарков М. И. Размножение патогенных клостридий в почве. Кишинев, «Штиинца», 1977. — 15. Френкель Г. М. Биология анаэробов и анаэробноз. Киев, Изд-во АН УССР, 1956. — 16. Шведова В. Н. Азотистый обмен и характеристика протеолитических ферментов некоторых анаэробов рода *Clostridium*. Автореф. канд. дис. Л., 1963. — 17. Beerens H., Garcia C. "Ann. Inst. Pasteur", 1970, t. 119, N 3, p. 329—337. — 18. Gibbs B., Freamе B. "J. appl. Bact.", 1965, vol. 28, N 1, p. 95—111. — 19. Pesti L. "Acta veterin. Acad. Sci. Hung.", 1965, vol. 15, N 4, p. 447—449. — 20. Smith L. "Appl. Microbiol.", 1975, vol. 29, N 5, p. 590—594. — 21. Takeda K., Furusaka C. "J. Agric. Chem. soc. Japan", 1970, vol. 44, N 8, p. 343—349. — 22. Takeda K., Furusaka C. "J. Agric. Chem. soc. Japan", 1970, vol. 44, N 8, p. 349—355. — 23. Takeda K., Furusaka C. "Soil. Sci. a. Plant Nutr.", 1975, vol. 21, N 2, p. 113—118.

Статья поступила 8 февраля 1978 г.

SUMMARY

The problem of quantitative estimation of proteolytic anaerobes in the soils of different zones of the USSR is discussed in the paper. Optimal nutrient media for estimating the anaerobes in the soil have been selected. It has been found that in different soils they are in different numbers. The numbers of these microorganisms have been found to increase from the north to the south. Their seasonal dynamics has been noted.