

УДК 631.461.51(-01)

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM В ПОЧВАХ РАЗНЫХ ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН

Л. К. НИЦЭ, ШИРАДЖУЛ ИСЛАМ ШЕЛЛИ

(Кафедра микробислогии)

Облигатно-анаэробные спорообразующие бактерии рода *Clostridium* широко распространены в природе, но наиболее часто они встречаются в почве. Эти бактерии принимают активное участие в трансформации разных природных и синтетических соединений, фиксации азота атмосферы и др.

Несмотря на длительную историю изучения *Clostridium*, многие вопросы их экологии разработаны слабо. До сих пор очень мало сведений о количественном и качественном составе почвенных облигатных анаэробов, доминирующих группах и видах, их распространении. Недостаточно изучены азотфиксирующая активность данных бактерий и их изменчивость в различных экосистемах. Этим вопросам и посвящена настоящая работа.

### Материал и методы

Для количественного учета сахаролитических анаэробов были взяты следующие почвы разных эколого-географических зон земного шара: подзолистая (Архангельская область), арктическая (о. Шпицберген), аллювиально-болотная (Египет, дельта р. Нила), красная ферралитная (Куба), дерново-карбонатная (Австралия), аллювиально-карбонатная (Бангладеш).

Образцы отбирали из горизонтов  $A_0$  и  $A_1$  целинных и пахотного слоя окультуренных почв; 10 г из каждого образца были разведены в 90 мл водопроводной стерильной воды. Численность сахаролитических анаэробов определяли путем посева водной суспензии ( $10^{-2}$ — $10^{-8}$ ) на питательные

среды. Для количественного учета сахаролитических *Clostridium* были использованы следующие среды:

среда 1:  $\text{KH}_2\text{O}_4$ —0,5 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —0,5,  $\text{MgSO}_4$ —0,5,  $\text{NaCl}$ —0,5 г,  $\text{FeSO}_4$  и  $\text{MnSO}_4$ —следы, смесь микроэлементов по Федорову—1 мл/л, глюкоза—20,0 г, пептон—5 г, дрожжевой автолизат—0,2 мл/л,  $\text{CaCO}_3$ —10 г, вода дистиллированная—1 л, pH 7,0 [2];

среда 2: кукурузный затор—5 %,  $\text{CaCO}_3$ —10 г, pH 5,0—6,0 [3];

среда 3: картофельный отвар—500 мл, морковный отвар—500 мл, глюкоза—20 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —1,  $\text{MgSO}_4$ —0,5 г,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MnSO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$ —следы, пептон—5 г, дрожжевой автолизат—0,2 мл/л,  $\text{CaCO}_3$ —4 г, агар—20 г [2].

среда 4: глюкоза—20 г,  $\text{MgSO}_4$ —50 мг,  $\text{NaCl}$ —50,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ —5 мг,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —0,25 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —0,25,  $\text{CaCO}_3$ —5,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ —5 г, раствор витаминов—5 мл,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ —1 г, дистиллированная вода—1 л, pH 7,0. Раствор витаминов содержит (мг на 100 мл воды): биотин—0,1, пантотенат Ca—0,1, п-аминобензойная кислота—1,0, тиамин HCl—2,0 [7].

Во все среды вносили по 1 мл 4 % водного раствора нейтральрота, являющегося индикатором на развитие анаэробов, цистеин 0,3 г/л, необходимый для понижения окислительно-восстановительного потенциала среды. Перед употреблением среды кипятили 20 мин для удаления растворенного кислорода. Посевы инкубировали в термостате при температуре 28—30 и 37—38 °C. Разведенные чистые культуры и почвы

вносили по 1 мл в пробирку с 10 мл соответствующей среды.

Количество сахаролитических *Clostridium* подсчитывали методом предельных разведений, а число клеток *Clostridium* в 1 мл культуры и в 1 г почвы — по таблицам Мак-Креди в 3-кратной повторности. Наблюдения за ростом проводили в течение 5—7 дней, ежедневно определяя снижение  $\text{rH}_2$  среды (восстановление нейтральности *Clostridium* вызывает флуоресценцию среды, которая приобретает золотисто-желтую окраску), наличие газообразования и клостридиальных клеток.

Сахаролитические *Clostridium* выделяли в чистую культуру двумя способами: 1) с помощью накопительных культур, полученных на жидких средах, с пастеризацией при  $85^\circ$  в течение 10 мин и без нее; 2) путем прямого посева разведения (пастеризованного и непастеризованного) на чашки Петри с твердой средой.

Выделение чистых культур анаэробов из накопительных культур (одноразовый посев) проводили в чашках Петри в анаэробных условиях, в которых создавали вакуум с остаточным давлением 13,33 Па. Для обогащения внутреннего пространства анаэробстата  $\text{CO}_2$  помещали смесь соды и лимонной кислоты. Поглотителем влажности служила прокаленная окись алюминия.

Чистоту культур *Clostridium* проверяли на следующих средах: мясо-пептонном бульоне с 2 %-ным агаром (МПА) косячком и в чашках Петри в аэробных и анаэробных условиях. Для идентификации выделенных чистых культур использовали определитель Берге [6].

### Результаты и их обсуждение

Сахаролитические анаэробы рода *Clostridium* распространены во всех исследованных почвах. Их количество исчисляется от сотен до тысяч и миллионов клеток на 1 г почвы. На эколого-географическое распространение анаэробов в почве существенное влияние, кроме отсутствия кислорода (анаэробноз), оказывают восстановительная способность окружающей среды, доступность питательных веществ, температура и влажность почвы и др.

В табл. 1 приводятся средние данные о численности анаэробов разных видов в ряде почв северных, субтропических и тропических зон, полученные на основании большого числа анализов. Субтропические аллювиально-карбонатные, тропические красно-ферралитные и дерново-глеявая почвы (рис. 1—3) характеризуются высо-

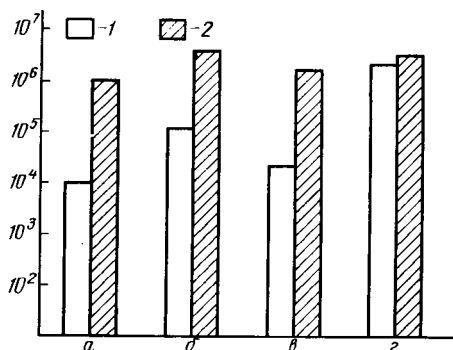


Рис. 1. Численность *Clostridium* в аллювиально-карбонатных почвах (Бангладеш).

а, б и в — неокультуренная почва соответственно Дакка, пойма р. Подмы и лес; 2 — окультуренная почва (из-под риса); 1 — *Cl. pasteurianum*; 2 — *Cl. acetobutylicum*.

ким содержанием анаэробов рода *Clostridium*. Их численность ниже в почвах северных зон (рис. 2). Наименьшее количество бактерий рода *Clostridium* выявлено в арктических гидроморфных глеевых почвах о. Шпицберген (несколько повышенная численность микроорганизмов в арктических почвах — орнитогенной и моховом пятне — объясняется скоплением на поверхности последних слабо разложившихся растительных остатков, которые служат хорошим питательным материалом). Анаэробные бактерии энергично развиваются под влиянием моха (табл. 1).

Численный состав анаэробов в тропических аллювиально-карбонатных почвах

Таблица 1

### Развитие бактерий рода *Clostridium* в исследуемых почвах

Тип или состояние почвы	<i>Cl. pasteurianum</i>	<i>Cl. acetobutylicum</i>	<i>Cl. butyricum</i>	<i>Cl. saccharobutyricum</i>
Арктические почвы о. Шпицберген				
Гидроморфные глеевые	$1,4 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^2$	—
Орнитогенная	$8,7 \cdot 10^2$	$5,1 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^2$	—
Моховое пятно	$8,6 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$	—
Тропические аллювиально-карбонатные почвы (Бангладеш)				
Целина (пойма)	$5,5 \cdot 10^5$	$9,9 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^5$
Неокультуренная (под кокосом)	$3,8 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^4$	$6,1 \cdot 10^5$
Окультуренная (просо)	$1,5 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^6$
Подзолистые почвы Архангельской обл.				
Целина	$3,63 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	—	—
Окультуренная (под картофелем)	$8,36 \cdot 10^5$	$8,95 \cdot 10^5$	—	—

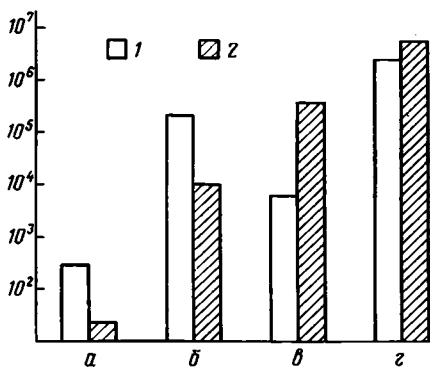


Рис. 2. Численность *Clostridium* в почвах. а — арктическая орнитогенная (о. Шпицберген); б — подзолистая (Архангельск); в — аллювиально-болотная (Египет); г — красная ферралитная (Куба). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

(Бангладеш) во многом определяется состоянием последних. В неокультуренной почве в зависимости от топографического расположения и флористического покрова развитие анаэробов существенно различается. Так, *Cl. pasteurianum* и *Cl. butyricum* лучше развиваются в целинной пойме, а *Cl. pasteurianum* и *Cl. saccharobutyricum* в неокультуренной, занятой кокосом. В окультуренных почвах создаются оптимальные условия для развития большинства видов анаэробов. *Cl. pasteurianum* — преобладающий вид анаэробов в почвах северных зон — при определенных оптимальных условиях (по-видимому, одно из них — обилие легко растворимых органических соединений) может занимать ведущее место в микробных сообществах и в почве тропических зон. В этом случае, очевидно, в почве содержатся свежие растительные остатки. Растительный материал на более поздних стадиях разложения обеспечивает интенсивное развитие *Cl. acetobutylicum*.

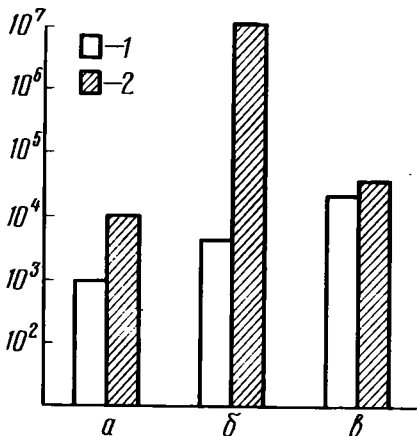


Рис. 3. Численность *Clostridium* в почвах Канады.

а — дерново-карбонатная (г. Оттава); б — дерново-глеевая; в — глеевая, серая коричневая, лювисол. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Положение организмов в любой экосистеме определяется в первую очередь их трофическими связями, т. е. местом, которое они занимают в цепи превращений веществ и энергии. Анаэробные бактерии рода *Clostridium*, являясь гетеротрофами, принимают активное участие в разложении органического вещества. По мере разложения субстрата происходит смена видов. Анаэробные *Clostridium*, усваивающие легкодоступные вещества, интенсивно развиваются в первый период распада растительных остатков. В северных почвах низкая температура и высокая влажность обуславливают повышенный анаэробноз, что приводит к замедлению скорости минерализации. Это и объясняет преобладание в них *Cl. pasteurianum* наряду с *Cl. butyricum* и *Cl. saccharobutyricum*. В южных почвах растительные остатки минерализуются очень быстро, что, по-видимому, обуславливает неровный и кратковременный (периодический) характер притока в почву растворимых органических соединений, отражающийся на развитии маслянокислых бактерий.

Наши данные, как и литературные [1], показывают, что по мере продвижения с севера на юг в почвах уменьшается численность сахаролитических (маслянокислых) бактерий и, наоборот, возрастает количество ацетонабутиловых бактерий, обладающих протеолитической активностью и энергично потребляющих растительные остатки на заключительном этапе их распада. Очевидно, микроорганизмы *Cl. acetobutylicum*, предпочитающие белковую среду и нуждающиеся в комплексе витаминов, могут успешно развиваться лишь при наличии органических остатков, обогащенных микробным протеином и биологически активными соединениями, что характерно в основном для целинных почв. В случае окультуренных почв картина иная.

О влиянии агротехнических факторов (обработка, внесение удобрений и др.) на развитие маслянокислых и ацетонабутиловых бактерий можно судить по данным табл. 1 (на примере подзолистых почв Архангельской области). В данной климатической зоне в окультуренной почве интенсивно развиваются не только *Cl. pasteu-*

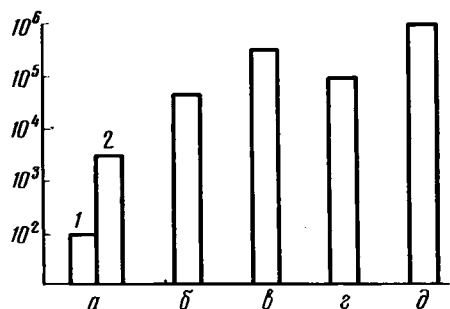


Рис. 4. Численность сахаролитических железовосстанавливающих бактерий *Clostridium*.

а — арктическая (1 — орнитогенная; 2 — гидроморфная); б — подзолистая (Архангельская обл.); в — аллювиально-болотная; г — аллювиально-карбонатная (Бангладеш); д — красная ферралитная (Куба).

Т а б л и ц а 2

Продукты сбраживания глюкозы  
*Cl. pasteurianum* (мг %)

Штамм	Кислота			
	муравьиная	уксусная	пропионовая	масляная
Из аллювиально-карбонатных почв (Бангладеш)				
315	4,79	16,42	—	52,00
322	5,50	19,68	—	49,30
405	4,35	19,05	—	50,06
Из дерново-подзолистых почв (Архангельская обл.)				
622	3,08	11,72	1,05	22,56
633	2,56	10,05	—	24,70
647	3,30	11,02	1,26	25,30

*gianum*, но и *Cl. acetobutylicum*. Таким образом, под влиянием антропогенных факторов происходят существенные изменения в количественном соотношении видов или групп анаэробов. Анализ образцов почв из-под картофеля показывает, что соотношение *Cl. pasteurianum* и *Cl. acetobutylicum* близко к 1, в целинной почве ~3:1.

Сахаролитические железовосстанавливающие бактерии (рис. 4) хорошо развиваются в красно-ферралитной (Куба), аллювиально-карбонатной (Бангладеш) и аллювиально-болотной (дельта р. Нил) почвах. Доминирующими представителями этой группы здесь являются *Cl. saccharobutyricum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. multifementans*, *Cl. acetobutylicum*. В арктических почвах анаэробные сахаролитические железовосстанавливающие бактерии интенсивно развиваются в гидроморфных почвах, слабо — в орнитогенных (о. Шпицберген). Их развитие связано со способностью восстанавливать  $Fe_2O_3$  [7].

Сахаролитические анаэробы в разных зонах их распространения обладают рядом морфолого-физиологических особенностей. При наблюдении в световом микроскопе выявлено, что ширина и длина вегетативных клеток у штаммов *Cl. pasteurianum* из северных почв меньше, чем из южных. Например, у штаммов 65, 103, 106 (из

северных подзолистых почв) значения этих параметров колеблются от 0,3 до 7 мкм, а у штаммов 450, 465, 305 (красная ферралитная почва) и штаммов 545, 548, 550 (аллювиально-карбонатные) от 5,5 до 9 мкм. У штаммов тропических почв, характеризующихся быстрым ростом и более высокой синтетической способностью на твердой питательной среде, размер колоний больше, чем у штаммов арктических зон.

Значение микроорганизмов в биогеоценологических системах часто определяется не столько их общей численностью, сколько специфичностью процессов, осуществляемых ими во внешней среде [7]. На примере штамма *Cl. pasteurianum* было установлено, что бактерии, выделенные из аллювиально-карбонатных почв (Бангладеш), при сбраживании глюкозы (табл. 2) образуют большее количество масляной кислоты, чем бактерии, выделенные из подзолистой почвы. Соотношение продуктов брожения углеводов зависит от антропогенного воздействия на почву.

На основании полученных данных можно заключить, что антропогенные факторы наряду с почвенно-климатическими условиями влияют на темпы развития сахаролитических анаэробных бактерий рода *Clostridium*, определяют их видовой состав, морфологические и физиолого-биохимические особенности.

#### Заключение

Экологические исследования, проведенные на клеточном уровне, показывают, что почвенно-климатические условия оказывают определенное влияние на соотношение видов или групп анаэробных почвенных бактерий. Почвы южных зон (тропические и субтропические) характеризуются широким диапазоном видового состава анаэробных сахаролитов. Среди них особое значение имеют сахаролитические железовосстанавливающие бактерии рода *Clostridium* (*Cl. saccharobutyricum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. multifementans*, *Cl. acetobutylicum* и др.). В северных почвах указанные бактерии слабо развиты. На примере выделенных чистых культур показано, что эколого-географические условия определяют морфолого-физиологические особенности этих бактерий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Емцев В. Т. Почвенные анаэробные азотфиксаторы рода *Clostridium*. — Успехи микробиологии, 1974, вып. 9, с. 153—182. — 2. Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Анаэробные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. М.: Наука, 1974. — 3. Омельянский В. Л. Практическое руководство по микробиологии. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1940. — 4. Скиппер Ф. А. (Skipper F. A.). Анаэробные бактерии и их дея-

тельность в почве. В сб.: Почвенная микробиология, 1979. М.: Колос, с. 12—32. — 5. Alexander M. — Microbiol. ecology. N. Y., 1971. — 6. Bergey's Manual of Determinative Bacteriol. Eight ed. Buchanan R. E. and Gibbons N. E. co-editors. Baltimore, 1974. — 7. Hamman R. a. Ottow Y. L. G. — Soil Biol. Biochem, 1976, vol. 8, N 3, p. 357—364.

Статья поступила 7 января 1983 г.

#### Summary

Soil and climatic conditions considerably affect the correlation of specific composition of anaerobic soil bacteria. Soil of southern zones (tropical and subtropical) are characterized by wide range of specific composition of anaerobic saccharolytic bacteria. Among them the saccharolytic iron-reducing bacteria of the genus *Clostridium* (*Cl. sac-*

charobutyricum, *Cl. tyrobutyrium*, *Cl. multifermentas*, *Cl. acetobutylicum*, etc.) are of special importance. In northern soils saccharolytic iron-reducing anaerobic bacteria are underdeveloped. On the basis of pure cultures obtained the influence of ecological and geographical conditions on morphological and physiological variability of these bacteria was found.