

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ЭУБАКТЕРИИ РОДА *CLOSTRIDIUM*, КАК ВОЗБУДИТЕЛИ
ПРОЦЕССОВ БРОЖЕНИЯ И ГНИЕНИЯ»**

Студент



Исмаилова Мээрим

Руководитель



Заплатин Б.П.

Нормоконтролер



Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 16.06.22 № 19)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

удовлетворительно

(протокол заседания ГЭК от 23.06.22 № 3)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Систематическое положение бактерий рода <i>Clostridium</i>	6
1.1.1. Особенности распространения <i>Clostridium</i> в различных типах почв. 8	
1.2. Биохимия, механизм, конечный продукт брожения и гниения.....	11
1.2.1. Маслянокислое брожение.....	14
1.2.2. Брожение пектиновых веществ.....	14
1.2.3. Брожение целлюлозы	15
1.3. Практическое значение микроорганизмов рода <i>Clostridium</i>	17
1.3.1. Практическое значение в промышленности.....	18
1.3.2. Практическое значение в сельском хозяйстве	18
1.3.3. Практическое значение в медицине	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	25
2.1. Объект исследования	25
2.2. Методы исследования	25
2.2.1. Питательные среды и посев культур	25
2.2.2. Отбор почвенных проб.....	26
2.2.3. Подготовка образца к микробиологическому анализу.....	26
2.2.4. Методы выделения различных физиологических групп рода <i>Clostridium</i> из разных объектов.....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	30
3.1. Результаты посевов для выявления возбудителей брожения пектиновых веществ	30
3.2. Результаты посевов в жидкую среду Омелянского для выявления возбудителей брожения целлюлозы	31
3.3. Результаты посевов на жидкую среду Виноградского.....	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	33
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	37

ВВЕДЕНИЕ

Миновало больше 100 лет с того этапа, когда Л.Пастер 1861 году определил вероятность существования жизни на Земле в отсутствии кислорода, а также аргументировал, что на определенные бактерии воздух воздействует как яд. Согласно его сведениям, подобными микроорганизмами стали возбудители маслянокислого брожения, принадлежащие к роду *Clostridium*.

Бактерии рода *Clostridium* является важнейшим фактором для сельского хозяйства, так как характерно выраженная способность к биологической фиксации атмосферного азота т.е. бактерии, принимающие непосредственное участие в биотехническом круговороте органических элементов, в совокупности процессов, обеспечивающие существование на Земле во всем ее современном многообразии.

Непатогенные клостридии широко используются как в биотехнологии так и медицине. Помимо этого, доказано различие клостридий одного вида друг от друга по ряду характеристик.

Помимо азотфиксации, медицинская микробиология интересуется немногочисленной группой клостридий, обладающих болезнетворными свойствами, которые являются главным фактором в патогенезе многих болезней. Главным фактором патогенности клостридий является свойство производить и выделять из клетки особо эффективные яды.

Бактерии клостридии, кроме того, находятся в обширном использовании в промышленной индустрии. Они находят применение в парфюмерном производстве.

В настоящее время, даже после того как проведено неисчислимое множество наблюдений и исследований, специалисты вынуждены признать отсутствие исчерпывающего ответа на важнейшие вопросы о клостридиях, об их путях циркуляции их в природе, источниках и механизмах передачи клостридий.

Патогенные представители составляют всего лишь около десятой части общего числа видов рода клостридий. Вопросы, касающиеся природы биологического значения и исторического происхождения свойств, ответственных за специфическую, уникальную по своим проявлениям патогенность этих видов клостридий, весьма редко затрагиваются в обобщающих работах по отдельным клостридиозам. Несколько чаще они рассматриваются при решении теоретических проблем общей эпидемиологии, поскольку представления о процессе филогенетического развития у отдельных представителей рода способности вызывать заболевания весьма важны для понимания эпидемиологии последних и для обоснования мероприятий по их специфической и неспецифической профилактике.

Среди непатогенных клостридий видное место по распространенности в природе занимают целлюлолитические и пектолитические виды. Ученый В. О. Таусон полагает, что эволюционное развитие анаэробных микробов, разлагающих вещества растительной природы, в частности целлюлозу, осуществлялось в связи с эволюцией растительных форм жизни. Появление нового вещества предшествовало развитию и обособлению особой группы микроорганизмов, способных разлагать это вещество. Вместе с тем имело место влияние микробов на исторический процесс формирования структурных элементов растений в плане повышения их устойчивости к воздействию бактерий, оказавшихся фитопатогенными. В соответствии с этой вполне логичной и обоснованной концепцией автор полагает возможным связать появление анаэробных микробов, разлагающих клетчатку, с развитием морских водорослей (кембрийский и силурийской периоды). Целлюлолитические анаэробы сформировались в девонском периоде после развития на Земле соответствующих форм растений. К этой позиции близка точка зрения ученого Г. А. Никитина, который рассмотрел вопросы филогении анаэробных целлюлолитических бактерий. Автор пришел к заключению, что предками целлюлолитического видов клостридий могли

быть представители этого рода, осуществляющие маслянокислое брожение и способные сбраживать углеводы более простого строения.

В связи с этим отработка методики выделения непатогенных клостридий,

перспективных в настоящее время для изучения и использования в биотехнологии и медицине, имеет большую практическую значимость.

На основе вышесказанного, целью моей работы является исследование зубактерий рода *Clostridium*, важных сельскохозяйственной точки зрения, как непосредственных возбудителей процесса брожения и гниения.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Сравнительная оценка эффективности выделения непатогенных клостридий из различных образцов почвы;
- Описать влияние распространения азотфиксирующих микроорганизмов рода *Clostridium* в различных типах почв;
- Описать выявление из разных типов почв микроорганизмов рода *Clostridium*, участвующих в маслянокислом брожении;
- Изучить выявление из разных типов почв микроорганизмов рода *Clostridium*, участвующих в брожение целлюлозы;
- Изучить выявление микроорганизмов рода *Clostridium*, из волокон растений вызывающих брожение пектиновых веществ;

Для достижения поставленных в работе задач использовали методы отбора почвенных образцов для анализа, культивирование микроорганизмов осуществляли на плотной питательной среде, идентификацию – бактериологическим методом, микроскопией, по оценке биохимических свойств микроорганизмов.

Выпускная квалификационная работа содержит 40 листов, 1 таблицу и 4 рисунка, список литературы на русском языке из 45 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Систематическое положение бактерий рода *Clostridium*

Клостридии – это обширная группа микроорганизмов, представителям которой с каждым годом уделяется все большее внимание со стороны ученых, работающих в области биотехнологии, микробиологии, фармакологии, иммунологии и генной инженерии [2].

Клостридии составляют многочисленную группу (около 90 видов) анаэробных микроорганизмов, обладающих рядом весьма характерных общих свойств, и вследствие этого их таксономическое объединение представляется достаточно оправданным. По классификации Берги, они включены в класс шизометов, порядок истинных бактерий, семейство *Bacillacea*, род клостридий. Аналогичные таксономические единицы рода, семейства и порядка указаны и в классификации Красильникова. Соответствующие микроорганизмы входят в роды клостридий, отнесенные к разным отрядам класса спорообразующих бактерий. Объединение рассматриваемых микроорганизмов в пределах рода базируется на принципиальном сходстве большого числа признаков (морфологических, культуральных, физиологических, отчасти серологических), признается достаточно обоснованным и с точки зрения молекулярно-биологических критериев таксономии. Морфологически популяция клостридий характеризуется дискретностью составляющих их единицы (клеток), которые лишь изредка образуют цепочечные короткие формы. Клостридиальные клетки относительно крупного размера, формы продолговатой, иногда нитевидные. Они образуют споры, нередко больших размеров, чем сама клетка. Если спора при этом расположена центрально, микробная клетка напоминает по форме веретено. На основании этого сходства для микроорганизмов данной группы предложено по окрашиваются по Граму [4].

Облигатно анаэробные клостридии предпочитают в качестве места обитания среды с низким содержанием кислорода. Поэтому многие из них

живут в почве. В организме человека, например, в кишечнике, встречается типичный представитель этого рода — *Clostridium difficile*, который входит в состав нормофлоры толстой кишки [6].

Они могут передвигаться, палочки крупного размера (многие из них), образуют форму яйца, круглые эндоспоры, которые переводится от греческого языка *kloster* - веретено) своеобразную веретенообразный внешний вид. Спора в длину всегда больше поперечника самой вегетативной клетки. Являются строгими анаэробами [28].

Систематическое положение бактерий рода *Clostridium*:

- Царство *Bacteria*;
- Тип *Firmicute*;
- Класс *Clostridia*;
- Порядок *Clostridiales*;
- Семейство *Clostridiaceae*;
- Род *Clostridium*;

Наряду с указанными общими чертами сходства свойств, определяющих отправление клостридиями их основных биологических функций (использование жизненных ресурсов, развитие, выживание, размножение и расселение) отдельные виды данного рода имеют в этом отношении ряд очень существенных особенностей. При всем многообразии свойств, послуживших основанием для инфференциации отдельных видов, рассматриваемые микроорганизмы проявляют значительное количество признаков, которые дают основание считать клостридии группой действительно родственных бактерий. Помимо уже охарактеризованных выше общих признаков, в этом плане могут быть отмечены некоторые биохимические и в особенности серологические свойства клостридий [7].

Распространение в природе тех или иных видов патогенных клостридий в соответствии с их биологическими свойствами определяются географией почвенных зон. Клостридия видов, отнесенных к экологической группе возбудителей процессов брожения, например, *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* и

др., развиваются главным образом в почвах, содержащих свежие растительные остатки. Зоной оптимального роста бактерий этих видов являются дерново-подзолистые почвы лесных зон, которые характеризуются наличием значительных запасов растительных остатков такого рода. и значительное количество пектинолитических клостридий, к которым относятся *Cl. saturnirubrum*, *Cl. virens*, *Cl. haumanii*, *Cl. pektinovorum* и др. Напротив, клостридий ацетобутиликум (группа возбудителей процессов гниения) развиваются, главным образом, в относительно богатых белком каштановых почвах и сероземах. Соответственно клостридии этой группы активизируются в почве при внесении в нее свежих органических удобрений, богатых белком, например, клевера и люцерны. Наибольшее количество клостридий обнаруживается в верхних слоях почвы, более богатых органическими веществами, где они находятся преимущественно в состоянии вегетативных клеток. Размножение клостридий в илах определяется содержанием в них органических веществ. Окультуренные и удобренные органическими веществами почвы содержат большие количества клостридиальных фиксаторов азота [12].

1.1.1 Особенности распространения *Clostridium* в различных типах почв.

Облигатно анаэробные клостридии предпочитают в качестве места обитания среды с низким содержанием кислорода. Поэтому многие из них живут в почве. Представительство клостридий в воде морей и океанов крайне немногочисленно, проводившие исследования в ряде районов акватории Индийского океана, Красного, Черного и Средиземного морей, обнаружили 305 видов бактерий, и только один из них был отнесен к роду клостридий. Вместе с тем следует отметить более высокую клостридиальную обременённость прибрежных, особенно придонных, участков. Распределение *Cl. pasteurianum* в пресноводных водоемах характеризуется увеличением (плотности популяции в соответствии с глубиной исследуемых слоев [37].

Микробная активность бактерий сильно зависит от питательных, химических и физических условий, создаваемых в почве. Микроорганизмы быстро реагируют на малейшие изменения свойств почвы, вызванные абиотическими и антропогенными факторами. Доказано различие клостридий по ряду характеристик, относящихся к одному виду, при выделении их из разных источников почвы [13].

Интенсивность жизнедеятельности клостридий зависит от степени насыщенности почвы органическими веществами, соответствующими их питательным потребностям. Например, целлюлолитические клостридии наиболее широко представлены в субстратах, богатых целлюлозой. Распространение в природе тех или иных видов непатогенных, клостридий *B* соответствии с их биологическими свойствами определяется географией почвенных зон. Клостридии видов, отнесенных нами к экологической группе возбудителей процессов брожения, например, *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* и др., развиваются главным образом в почвах, содержащих свежие растительные остатки. Зоной оптимального роста бактерий этих видов являются дерновоподзолистые почвы лесных зон, которые характеризуются наличием значительных запасов растительных остатков такого рода. В этих же почвенных зонах обнаруживается значительное количество пектинолитических клостридий, к которым относятся *Cl. saturnimbrum*, *Cl. virens*, *Cl. haumanii*, *Cl. pektinovorum* и др. Напротив, *Cl. acetobutylicum* (группа возбудителей процессов гниения) развиваются главным образом в относительно богатых белком каштановых почвах и сероземах. Соответственно клостридии этой группы активизируются в почве при внесении в нее свежих органических удобрений, богатых белком, например, клевера и люцерны. Наибольшее количество клостридий обнаруживается в верхних слоях почвы, более богатых органическими веществами, где они находятся преимущественно в состоянии вегетативных клеток [26].

Род клостридии, включающий обитателей почвы, онтобионтов паразитов, представляет взору исследователей «яркие примеры широчайшей

вариации приспособлений различных видов к самым разнообразным условиям существования [14].

Размножение клостридий в илах определяется содержанием в них органических веществ. Окультуренные и удобренные органическими веществами почвы содержат большие количества клостридиальных фиксаторов азота. Северные и дерново-подзолистые почвы богаче клостридиальными возбудителями брожения, нежели почвы южных районов, содержащие большие количества белковых веществ и в большей степени населенные возбудителями гниения. Клостридиальные фиксаторы азота и возбудители брожения значительно более интенсивно размножаются в зоне корней растений, особенно в ризосфере. Микробиолог В. Т. Емцев отметил интенсивное размножение *Cl. pasteurianum*, *Cl. butyricum*, *Cl. ielsineum*, *Cl. pectinivorum* в ризосфере растений. Почвенные клостридий неприхотливы к физико-химическим условиям среды, в частности они способны (раздаиваться в диапазоне pH 4,7—8,5 при оптимуме 5,9—8,3. Многие из них являются мезофилами, имея оптимум температуры 25—30° и максимум 37—45°. Отсутствие узкой избирательности почвенных клостридий рассматривают как причину их широкого, или, можно даже сказать - повсеместного распространения. Среди клостридий — возбудителей брожения нет видов, имеющих самостоятельное значение в развитии болезней людей и животных [4].

Отдельные представители данной группы обладают гемолитической активностью. Возможно, именно с ней связана и их слабо выраженная патогенность, выявляющаяся только в условиях эксперимента [15].

Распространение в природе тех или иных видов патогенных клостридий в соответствии с их биологическими свойствами определяются географией почвенных зон. Клостридия видов, отнесенных к экологической группе возбудителей процессов брожения, например, *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* и др., развиваются главным образом в почвах, содержащих свежие растительные остатки. Зоной оптимального роста бактерий этих видов

являются дерново-подзолистые почвы лесных зон, которые характеризуются наличием значительных запасов растительных остатков такого рода. и значительное количество пектинолитических клостридий, к которым относятся *Cl. saturnirubrum*, *Cl. virens*, *Cl. haumanii*, *Cl. pektinovorum* и др. Напротив, *Cl. ацетобутиликум* (группа возбудителей процессов гниения) развиваются главным образом в относительно богатых белком каштановых почвах и сероземах. Соответственно клостридии этой группы активизируются в почве при внесении в нее свежих органических удобрений, богатых белком, например, клевера и люцерны. Наибольшее количество клостридий обнаруживается в верхних слоях почвы, более богатых органическими веществами, где они находятся преимущественно в состоянии вегетативных клеток. Размножение клостридий в плах определяется содержанием в них органических веществ. Окультуренные и удобренные органическими веществами почвы содержат большие количества клостридиальных фиксаторов азота [18].

Жизнедеятельность многочисленных видов клостридиальных возбудителей брожения, таким образом, связана в основном с фито биомассой. Последняя, как известно, составляет большую часть «живого вещества» планеты Земля [38].

1.2 Биохимия, механизм, конечный продукт брожения и гниения

Группа возбудителей процессов брожения включает в себя примерно достигает 39 видов. Они имеют общее свойство сбраживать углеводы простого и сложного происхождения такие как (крахал, пекин, целлюлза, глиоген) и т.д. Отдельные представители этой группы характеризуются выраженной способностью к биологической фиксации атмосферного азота. Питательные потребности подобных микроорганизмов могут быть минимальными. Типичный представитель этой грушы *Cl. pasteurianum* - первый из описанных и наиболее энергетичный из известных фиксаторов атмосферного азота. Это подвижные грамположительные палочки. При

образовании в них центрально расположенных спор клетки приобретают форму веретена. Среда Виноградского, достаточная для развития этих бактерий, содержит глюкозу в качестве единственного источника углерода, сульфаты железа и магния, фосфат калия, карбонат кальция. Помимо атмосферного азота, они могут использовать соли аммония. Потребив 1 т источника углевода, популяции *Cl. pasteurianum* усваивают до 5-10 мт атмосферного азота. Микробы этого вида разлагают также сложные углеводы [17].

Все виды рода объединяются в несколько специфичных групп, которые отличаются по свойству сбраживать одни или другие органические соединения.

Первая группа — это сахаролитические виды *Clostridium*, которые сбраживают растворимые углеводы, крахмал, а также пектин, в результате чего образуются бутират, этанол, сукцинат, оксид углерода и водород являются конечными продуктом брожения [34].

К второй группе — относятся *Clostridium* сбраживающий аминокислоты, также они могут сбраживать углеводы.

Третья группа — это те виды *Clostridium*, которые сбраживают пурины и пиримидины. К пуринам относятся (гуанин, ксангин и др.) под влиянием таких видов как *Cl. cylindrosporum* образует аммиак, ацетат и CO_2 . *Cl. oroticum* сбраживают пиримидины, и урацил распадается до (*i*-аланина, CO_2 и NH_3).

Четвертой группе есть один вид — *Cl. kluyveri*, который сбраживает смесь этанола с ацетатом до бутирата и капроновой кислоты, а также небольшого количества водорода [44].

Наиболее подробно изучена распространенность клостридий, фиксирующих атмосферный азот. Показано, что клостридии данной группы существуют в почвах всех континентов. Клостридиальная флора почв в средних широтах по своему качественному составу не отличается от таковой в полярных районах. Исследователи этого вопроса не без оснований считают,

что данные микроорганизмы являются очень устойчивыми, приспособившимися к различным условиям, в том числе к температурным, световым и другим показателям почвенного режима полярных районов. В то же время представительство клостридий в воде морей и океанов крайне немногочисленно, проводившие исследования в ряде районов акватории Индийского океана, Красного, Черного и Средиземного морей, обнаружили 305 видов бактерий, и только один из них был отнесен к роду клостридий. Вместе с тем следует отметить более высокую клостридиальную обсемененность прибрежных, особенно придонных, участков. Распределение *Cl. pasteurianum* в пресноводных водоемах характеризуется увеличением плотности популяции в соответствии с глубиной исследуемых слоев. Интенсивность жизнедеятельности клостридий зависит от степени насыщенности почвы органическими веществами, соответствующими их питательным потребностям. Например, целлюлолитические клостридии наиболее широко представлены в субстратах, богатых целлюлозой [20].

Число видов, которые могут быть отнесены к группе возбудителей процессов гниения, достаточно велико (около 30). Некоторые виды наряду с отмеченным фиксируют также молекулярный азот атмосферы. По сравнению с возбудителями брожения среди бактерий данной группы отмечается наряду с возрастанием протеолитической активности уменьшение числа видов, способных разлагать сложные углеводы. Некоторые из них при наличии в среде аминокислот могут развиваться в отсутствии углеводов. Гнилостные клостридии обладают в своем большинстве значительно более низким биосинтетическим потенциалом, чем возбудители брожения, рассматривают подобные свойства как (признаки, характерные для фазы перехода к обмену веществ, свойственному паразитическому способу использования жизненных ресурсов. Отдельные виды, включенные нами в группу гнилостных клостридий, в условиях эксперимента проявляют слабо выраженную патогенность, причем иногда это не связано с продукцией определенных экзотоксинов.

1.2.1 Маслянокислое брожение

К возбудителям маслянокислого брожения относится большое число бактерий, которые находят широкое распространение чрезвычайно широко распространены в природе. Около 90% видов почв характеризуются содержанием таких бактерий. Их можно обнаружить на поверхности растений, загрязненных водоемах и т. д [23].

Самым основным возбудителем данного брожения является *Clostridium Pasteurianum* – которая является масляно-кислым бактериумом, основной азотофиксатор. *Clostridium saccharobutyricum*, не фиксирует азот. *Clostridium butyricum* сбраживает углеводы с образованием бутилового и изопропилового спирта *Clostridium butyricum*, конечный продукт брожения подразделяются на истинно маслянокислое брожение, ацетонобутиловое брожение, брожение пектиновых веществ. Механизм Маслянокислого брожения идет по схеме Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Энергетическим материалом для масляных бактерий служит крахмал, водорастворимые углеводы. Характерная особенность маслянокислых бактерий способность накапливать в клетках гранулы перед образованием спор [31].

Процесс маслянокислого брожения протекает по схеме:



1.2.2 Брожение пектиновых веществ

Пектиновые вещества не растворимы в воде, но способны к набуханию, разложение происходит без доступа кислорода. с помощью фермента пектиназы разрушают пектин с образованием пектиновой кислоты, превращающейся далее в галактуроновую кислоту. Образующиеся одновременно углеводы (арабиноза, галактоза и др.) сбраживаются пектиноразлагающими бактериями с образованием уксусной, муравьиной, масляной кислот, водорода и углекислоты.

Данный процедура ферментации пектинов кроме того считается значимым в превращениях углерода, что содействует ускорению минерализации растительных материалов. Уже после уничтожения межклеточных элементов целлюлозные стенки единичных клеток проще подвергаются воздействию целлюлозоразлагающих бактерий [22].

Пектиновое брожение вызывают клостридии, содержащие фермент пектиназу (рис.1). В результате сбраживают пектин глюкозу арабиноз, но не сбраживают целлюлозу [27].

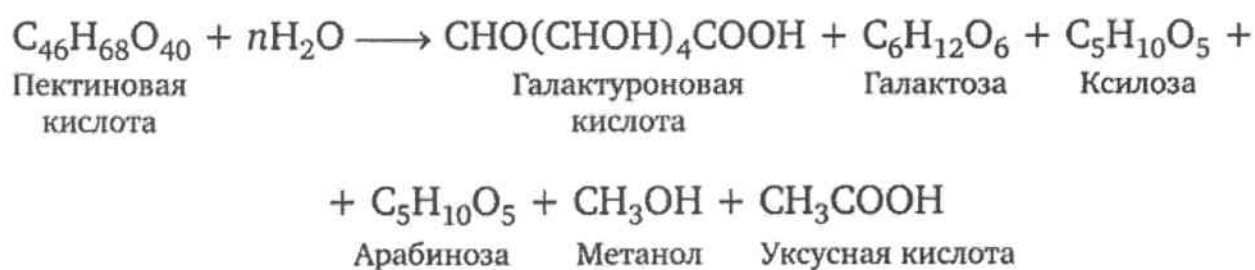


Рисунок 1. Схема распада пектина

1.2.3 Брожение целлюлозы

Ученым Омелянским в первые было выделено спорообразующие бактерии которые могут сбраживать целлюлозу.. Отдельные представители этой группы характеризуются выраженной способностью к биологической фиксации атмосферного азота. Питательные потребности подобных микроорганизмов могут быть минимальными. Типичный представитель этой группы *Cl. pasteurianum* - первый из описанных и наиболее энергичный из известных фиксаторов атмосферного азота. Это подвижные грамположительные палочки. При образовании в них центрально расположенных спор клетки приобретают форму веретена. Среда Виноградского, достаточная для развития этих бактерий, содержит глюкозу в качестве единственного источника углерода, сульфаты железа и магния, фосфат калия, карбонат кальция. Помимо атмосферного азота, они могут использовать соли аммония. Потребив 1 т источника углевода, популяции *Cl.*

pasteurianum усваивают до 5-10 мт атмосферного азота. Микробы этого вида разлагают также сложные углеводы [25, 42].

В настоящее время, даже после того как проведено неисчислимое множество наблюдений и исследований, специалисты вынуждены признать отсутствие исчерпывающего ответа на важнейшие вопросы о клостридиях, об их путях циркуляции их в природе, источниках и механизмах передачи клостридии [40].

Патогенные представители составляют всего лишь около десятой части общего числа видов рода клостридий. Вопросы, касающиеся природы биологического значения и исторического происхождения свойств, ответственных за специфическую, уникальную по своим проявлениям патогенность этих видов клостридий, весьма редко затрагиваются в обобщающих работах по отдельным клостридиозам. Несколько чаще они рассматриваются при решении теоретических проблем общей эпидемиологии, поскольку представления о процессе филогенетического развития у отдельных представителей рода способности вызывать заболевания весьма важны для понимания эпидемиологии последних и для обоснования мероприятий по их специфической и неспецифической профилактике.

Среди непатогенных клостридий видное место по распространенности в природе занимают целлюлолитические и пектолитические виды. Микробиолог В. О. Таусон полагает, что эволюционное развитие анаэробных микробов, разлагающих вещества растительной природы, в частности целлюлозу, осуществлялось в связи с эволюцией растительных форм жизни. Появление нового вещества предшествовало развитию и обособлению особой группы микроорганизмов, способных разлагать это вещество. Вместе с тем имело место влияние микробов на исторический процесс формирования структурных элементов растений в плане повышения их устойчивости к воздействию бактерий, оказавшихся фитопатогенными. В соответствии с этой вполне логичной и обоснованной концепцией автор полагает возможным связать появление анаэробных микробов, разлагающих клетчатку, с развитием

морских водорослей (кембрийский и силурийской периоды). Целлюлолитические анаэробы сформировались в девонском периоде после развития на Земле соответствующих форм растений. К этой позиции близка точка зрения Г. А. Никитина, который в специальной работе рассмотрел вопросы филогении анаэробных целлюлолитических бактерий. Автор пришел к заключению, что предками целлюлолитического видов клостридий могли быть представители этого рода, осуществляющие маслянокислое брожение и способные сбраживать углеводы более простого строения.

Выделяется также некоторое количество специализированных видов анаэробных бактерий (точных данных об их количестве и распространенность в природе, в том числе почвах, в настоящий момент не установлено), использующих органические кислоты и спирты в качестве источника углерода и энергии [41].

1.3 Практическое значение микроорганизмов рода *Clostridium*

Бактерии рода клостридиум является важнейшим фактором для сельского хозяйства, пищевой промышленности и т.д. и только представьте, что было бы нашей планетой если бы не было микроорганизмов, так как они очищают нашу Землю, без них были бы одни трупы. Современные достижения естествознания отвергают мнение о первичности аэриоза, поскольку, во-первых, установлено, что микроорганизмы являются древнейшими формами существования живой материи и, во-вторых, атмосферный кислород, необходимый для жизни аэробов и губительный для анаэробов, является относительно более поздним продуктом процесса развития жизни на Земле. Первоначальные формы живой материи развивались в отсутствии атмосферного кислорода и, следовательно, первые живые существа на Земле могли быть только анаэробами.

1.3.1 Практическое значение клостридий в промышленности

Непатогенные разновидности клостридий обнаружили обширное использование в изготовлении масляной кислоты, нужной с целью парфюмерной индустрии; ацетонобутиловом брожении, нужном с целью извлечения ацетона, а также бутанола. Кроме этого, данную категорию бактерий применяют с целью контролирования производительности стерилизации, а также в свойстве их веществ лечение множества болезней, в том числе также онкологических.

Последующий рост микробиологической индустрии сопряжен с поиском и также введением новейших многообещающих продуцентов элементов, применяемых в промышленном объекте. Для получения текстильной промышленности используется спороносные анаэробные бактерии, при использовании конопли и льна. При воздействии микробных ферментов пектиназу расщепляют вещества пектина [5].

1.3.2 Практическое значение клостридий в сельском хозяйстве

Бактерии рода *Clostridium* является важнейшим фактором для сельского хозяйства, так как характерно выраженная способность к биологической фиксации атмосферного азота т. е бактерии, принимающие непосредственное участие в биотехническом круговороте органогенных элементов, в совокупности процессов, обеспечивающие существование на Земле во всем ее современном многообразии.

Бактерии рода *Clostridium* являются важнейшим фактором для сельского хозяйства, так как для этих микроорганизмов характерно выраженная способность усваивать азот атмосферы. Способность фиксировать молекулярный азот из атмосферы, не вступая в симбиотические отношения с растениями, являются преимуществом бактерии рода *Clostridium* [3].

Среди множества микроорганизмов рода клостридий болезнетворные виды составляют относительно не многочисленную группу. Вместе с тем они исследованы более подробно, так как болезни, вызываемые этими бактериями,

большей частью исключительно своеобразны по своим клинико-морфологическим проявлениям и многие из них не без оснований относятся к числу патологических состояний, наиболее опасных для жизни и здоровья. Исходя из родового названия возбудителей, эти болезни обозначаются обобщенным наименованием «кlostридиозы». Характерной общей особенностью возбудителей кlostридиозов является полипатогенность. Они поражают как людей, так и различные виды сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Перечень кlostридиальных инфекций возглавляют ботулизм, столбняк, газовая гангрена. Столбняк и газовая гангрена — грозные травматические инфекции, ботулизм относится к категории исключительно опасных пищевых отравлений бактериальной природы. Специалистам хорошо известны также такие кlostридиозы, как некротический энтерит, энтероколит геморрагический, браздот, энтерококкемия и др., Поражающие преимущественно животных. В сравнительно недавнее время некоторые аналогичные формы энтеральных кlostридиозов выявлены и у людей. К числу видов кlostридий, имеющих первостепенное значение в патологии, относятся *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium fallax*, *Clostridium chauvoei*.

В настоящее время активно назначаются антибиотики при заболевании животных, это основная причина увеличения умножения кlostридий. При употреблении антибиотиков погибают бактерии, которые поддерживают нормальную кишечную флору, а для кlostридий не остается конкурентов и они начинают размножаться. Для нормализации назначаются пробиотики, которые оказывают благоприятное условие для восстановления.

Немалое значение имеет участие почвенных анаэробных микроорганизмов и в процессах мобилизации и восстановления соединений железа, марганца, различных соединений серы и других элементов, а также синтез этими микроорганизмами биологически активных веществ, ингибирующих или активирующих рост растений. Изучение этой активности

анаэробов становится все более актуальным в связи с интенсификацией орошаемого земледелия во многих странах мира [8].

На урожайность сельскохозяйственных культур оказывают влияние клостридии так как они мобилизируют труднорастворимые соединения в почве, продуцируя продукты обмена в среду [9].

Накопление в почве свежих растительных остатков приводит к интенсивному размножению маслянокислых клостридий.

Свежие органические вещества являются источником энергии, питательных веществ, витаминов, факторов роста, микроэлементов для *Clostridium* [16].

Маслянокислые бактерии рода *Clostridium* вызывают в почве процессы превращения и распада растительных остатков, прежде всего, их углеродистых составных частей, образуя в результате своей жизнедеятельности гуминовые вещества. Обнаружение и определение клостридий в почве и ризосфере дает представление об интенсивности данного процесса, имеющего в конечном счете большое значение в образовании сложного природного вещества - гумуса почвы [29].

Б.Р. Волобуев указывает на тесную зависимость разложения органических остатков от гидротермических условий. Возможно, что увеличение влажности почвы способствует растворению и доступности органических веществ для анаэробных бактерий [35].

1.3.3 Практическое значение в медицине

Непатогенные клостридии широко используются как в биотехнологии, так и в медицине. Помимо этого, доказано различие клостридий одного вида друг от друга по ряду характеристик.

Помимо азотфиксации, медицинская микробиология интересуется немногочисленной группой клостридий, обладающих болезнетворными свойствами, которые являются главным фактором в патогенезе многих

болезней. Главным фактором патогенности клостридий является свойство производить и выделять из клетки особо эффективные яды.

Спорообразование — коренной признак рода, присущий самому «стволу» «древа жизни» клостридий. Оно характерно для всех видов этого рода, в том числе и тех, которые являются аборигенами почвы, а не кишечника, и абсолютно лишены каких бы то ни было патогенных свойств [43].

Среди множества микроорганизмов рода клостридии болезнетворные виды составляют относительно немногочисленную группу. Вместе с тем они исследованы более подробно, так-как болезни, вызываемые этими бактериями большей частью исключительно своеобразны по своим клинικο-морфологическим проявлениям и многие из них не без оснований, относятся к числу патологических состояний, наиболее опасных для жизни и здоровья. Исходя из родового названия возбудителей, эти болезни обозначаются обобщенным наименованием «клостридии». Характерной общей особенностью возбудителей клостридиозов является поли патогенность. Они поражают как людей, так и различные виды сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Перечень клостридиальных инфекций возглавляют ботулизм, столбняк, газовая гангрена. Столбняк и газовая гангрена — грозные травматические инфекции, ботулизм относится к категории исключительно опасных пищевых отравлений бактериальной природы. Специалистам хорошо известны также такие клостридиозы, как некротический энтерит, геморрагическим энтероколит, браздот, энтеротоксемия и др., поражающие преимущественно животных. В сравнительно недавнее время некоторые аналогичные формы латеральных клостридиозов выявлены и у людей. К числу видов клостридии, имеющих [первостепенное значение в патологии, относятся *Cl. botulinum*, *Cl. tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. histoliticum*, *Cl. bifermentans*, *Cl. fallax*, *Cl. chauvoei*. Патогенные клостридии обладают всеми основными свойствами, присущими представителям рода в целом. Они могут развиваться на искусственных питательных средах, преимущественно животного происхождения. В этом отношении они близки

к клостридиальным возбудителям процессов гниения. Главным биологическим отличие является патогенных клостридий, отличающей их от прочих представителей этого рода, является способность выделять высокоактивные токсины, которые при воздействии на определенные структуры макроорганизма нарушают нормальную функцию последних, обуславливая тем самым развитие специфических и весьма опасных для жизни патологических состояний. Токсины патогенных клостридий весьма своеобразны по ряду свойств, определяющих силу и характер их специфического действия на организм. Сила летального действия токсинов столбняка и ботулизма, в сотни и тысячи раз превосходит аналогичную активность любого из наиболее сильных ядов бактериального, животного или растительного происхождения. У клостридий, являющихся возбудителями болезней, при сравнении их с гнилостными представителями отмечается редукция сахаролитических и протеолитических свойств и в то же время нарастание числа или степени выраженности признаков, определяющих их болезни. Представления о природе факторов патогенности клостридий вполне определены. Они обоснованы бесспорными фактическими данными наблюдений и экспериментов. Доказано, что патогенность возбудителей столбняка, газовой гангрены, ботулизма и др. обусловлена специфическими экзотоксинами, которые продуцируются данными бактериями в процессе их жизнедеятельности.

Clostridium spp. входят в состав нормальной микрофлоры ЖКТ и женских половых путей; иногда их обнаруживают на коже и в полости рта. Из материала, полученного от больных людей, выделены по крайней мере 30 видов клостридий [30].

Как некоторые микроорганизмы, клостридий на воздухе не гибнут, но на питательных средах в присутствии кислорода не растут.

Способность патогенных клостридий к существованию во внешней среде, в «гниющих отбросах» и в содержимом кишечника, приводимая рядом авторов в числе других доказательств бесполезности патогенных свойств,

также нуждается в детальном анализе. Способность размножаться на питательных субстратах вне организма присуща практически всем патогенным бактериям. В. И. Терских подчеркивает, что отдельные возбудители зоонозов и антропонозов не утратили способности размножаться во внешней среде. Решающим в этом плане является вопрос об условиях образования такого рода субстратов в природе. В достижении современного состояния учения о природе клостридиозов особую роль сыграло использование термина «условно патогенный» по отношению к их возбудителям. Казалось бы, действительно, ботулизм возникает при условии предварительного размножения возбудителя и образования им токсина в соответствующем субстрате. Столбняк возникает при условии хотя бы минимального травматического повреждения тканей и образования очага некроза, в котором возбудитель начинает размножаться и продуцировать токсин, вызывающий заболевание. Проявление патогенности этих клостридий происходит при определенных условиях [45].

Роль наиболее действенного стимула в достижении этих успехов имели насущные запросы развития науки и практики, необходимость проникновения в сущность явлений. Понимание происхождения и, следовательно, сущности заразных болезней на современном этапе становится необходимой предпосылкой решения актуальных вопросов теории и соответственно практики борьбы с инфекциями. К теоретическому же решению любого научного вопроса «можно солидно, с уверенностью подойти, лишь бросив исторический взгляд на все развитие его в целом»

В нормальной микрофлоре толстой кишки входит более 30 видов клостридий. В 1 г кала их содержится 10 в степени 9-10.

Показано, что по конечным продуктам воздействия на углеводы возбудители ботулизма, например, обнаруживают близость к не патогенным маслянокислым клостридиям [32].

Аналогичными данными не патогенными клостридиями газовой гангрены Аналогичными данными, обитающими в почве.

Различные виды рода клостридий, как патогенные, так и непатогенные, являются родственными в антигенном отношении. Хотя систематическое преследование этого вопроса фактически еще только разворачивается, а уже полученные данные наиболее полно характеризуют главным образом патогенных представителей все же имеется возможность для некоторых обобщений в этом плане. В частности, установлено, что антигенное родство распространяется не только на «структурные» (жгутиковые и соматические) но и на «функциональные» антигены клостридий (токсины и ферменты) [24].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследования

Материалом для данного исследования являлись образцы почв на территории села Барковка и поля.

Объектами исследования послужили микроорганизмов рода *Clostridium*, выделенные из почвенных образцов.

Как было отмечено, что *Clostridium* является индикатором окультуренности почвы, поэтому в данном исследовании благодаря двум совершенно разным образцам почвы, можно сравнить динамику и особенности роста культуры на каждом из образцов, и проанализировать взаимоотношения бактерии рода *Clostridium* на воздействие научных внешних факторов.

2.2. Методы исследования

Забор почвы осуществляли при помощи метода отбора почвенных образцов для анализа ГОСТ 17.4.4.01-83 [10]. Для идентификации непатогенных клостридий были использованы следующие методы исследования: культуральный метод (описание морфологии колоний, выращивание на селективных питательных средах); метод микроскопии (окраска мазков по Граму). Все эксперименты проведены в трехкратной аналитической повторности и статистически обработаны.

2.2.1. Питательные среды и посев культур

Для выявления клостридии в почве и определение его относительного содержания, применялся метод Виноградского на гелевых пластинах. Для этого гелевые пластины были пропитаны 3-5 мл питательные среды следующего состава (г/200мл дистиллированной воды); KNO_3 -2,5; K_2HPO_4 -1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; NaCl -0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,01. После этого на поверхности геля раскладывали 50 комочков почвы (диаметром 1-2

мм). Затем чашку поместили во влажную камеру вверх дном и поставили в термостат при 28-30°C. Чтобы вырастить клостридии, в среде обязательно должно отсутствовать кислород, и она должна быть строго анаэробной [39].

Чтобы установить какая из исследуемых почв, хорошо заселена клостридием, провели сравнительную оценку.

Далее проводили микроскопирование и получение чистой культуры клостридии.

2.2.2 Отбор почвенных проб

Для сбора проб использовалась стерильная лопатка, банки стерильные с ватной пробкой. Для каждой пробы были написана где именно брали почву и дату взятия образца. Так как клостридии - это палочки, которые в зависимости от возраста культуры могут проявлять грамвариабельность, то для второго этапа исследования были отобраны культуры, которые в мазках находились в виде Гр (+) и Гр (-) палочек. В некоторых мазках были обнаружены споры, что можно объяснить длительностью инкубирования данных образцов. При длительном инкубировании создаются неблагоприятные условия культивирования за счет истощения питательной среды, что вызывает нехватку питательных веществ для микроорганизмов. На втором этапе исследования провели получение чистой культуры бактерий из почвенных проб, отобранных на первом этапе.

Отбор проб почв осуществлялось согласно ГОСТ 17.4.4.02-84 [11].

2.2.3. Подготовка образца к микробиологическому анализу

На сухое стерильное предметное стекло выкладывали почву в пламени спиртовки фламбировали пинцет и удаляли им посторонние объекты присутствующие в почве. Для того, чтобы работать было удобно, из уже очищенной почвы отбирали небольшие порции [21].

2.2.4. Методы выделения различных физиологических групп рода *Clostridium* из разных объектов

Были использованы объекты, такие как растительные волокна из почв.

Выявление возбудителей брожения пектиновых веществ

Постановка опыта. Снопик льняной соломы высотой 7-8 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в пробирку лучше большего, чем стандартного размера, наполненную на 2/3 водопроводной водой. Пробирку зажимают пинцетом и кипятят на горелке 2-3 мин для удаления экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Ее сливают. Вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Так поступают 5-6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном, и в снопик вводят свежую соломинку, не подвергшуюся нагреванию [36].

Пробирку со снопиком ставят в термостат при 30-35°C. Через 2-3 дня в ней начинается брожение, а через 5-8 суток оно заканчивается. Накопление в культуральной жидкости масляной кислоты наряду с уксусной, образующейся при сбраживании продуктов гидролиза пектина, можно обнаружить при помощи качественных реакций на масляную кислоту.

Микроскопирование. Извлекают снопик из пробирки, из его середины вынимают несколько соломинок и выжимают из него немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой [15].

На препарате обычно видны крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и прерывистым расположением гранулезы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum*. Нередко обнаруживается *Cl. felsineum* – палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулеза может заполнять всю вегетативную часть клетки [33].

Выявление возбудителей брожения целлюлозы

Постановка опыта. Для получения накопительной культуры целлюлозоразрушающих бактерий используют среду Омелянского. В высокие пробирки на 2/3 заливают среду Омелянского, добавляют 1 г исследуемой почвы, затем пастеризуют 10 мин при 80° в целях освобождения от сопутствующих аэробных бесспорных бактерий. На дно пробирки помещают полоски фильтровальной бумаги слоем 1,5–2 см, доливают стерильной питательной среды доверху и закрывают пробкой. Пробирки инкубируют при 30–35°С. Через 5–7 суток начинается брожение целлюлозы, в ходе которого интенсивно выделяются газы, фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизняется, желтеет и постепенно разрушается [1].

Микроскопирование. При исследовании целлюлозоразрушающих бактерий извлекают пинцетом со дна пробирки кусочек разлагающейся бумаги и размазывают по предметному стеклу без добавления воды. Мазок сушат обычным способом, фиксируют на пламени горелки и окрашивают фуксином. В пробирках развиваются длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце – *Clostridium omelianskii*, также наблюдается развитие длинных крупных палочек с грушевидной спорой на конце – *Clostridium dissolvens* [39].

Выявление анаэробных азотфиксирующих микроорганизмов, вызывающих маслянокислое брожение

Постановка опыта. Для обнаружения в почве анаэробных азотфиксирующих бактерий рода, которые также вызывают маслянокислое брожение, *Clostridium* пользуются методом накопительной культуры в жидкой среде Виноградского (приложение). Среду наливают в пробирки высоким слоем, засевают комочками исследуемой почвы и пастеризуют 10 мин при 80° в целях освобождения от сопутствующих аэробных бесспорных бактерий. Через 2–3 суток после посева среда мутнеет, из нее начинают выделяться пузырьки газа, что свидетельствует о развитии анаэробных споровых бактерий, вызывающих в соответствующих элективных условиях маслянокислое брожение. Глюкоза при этом превращается в масляную

кислоту и углекислый газ, а в пробирках образуется много пены, появляется запах масляной и уксусной кислот. Последняя также является одним из продуктов маслянокислого брожения. Обычно этот метод используют для обнаружения клеток *Clostridium pasteurianum*, которые легко увидеть при микроскопировании осадка. Перед спорообразованием в клетках *Clostridium Pasteurianum* накапливается много гранулезы, для которой характерно окрашивание раствором Люголя. Каплю жидкости, содержащую клетки клостридиев, накрывают покровным стеклом и к одному краю стекла подносят пипетку с раствором Люголя, а к другому – фильтровальную бумагу, которая засасывает раствор под покровное стекло. При микроскопировании препарата видны клетки клостридиев с потемневшим содержимым. Спора в клетке остается при этом неокрашенной и хорошо различима на темном фоне [19].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Результаты посевов для выявления возбудителей брожения пектиновых веществ

По результатам исследования были получены следующие данные:

Во всех трех пробирках (рис.2) наблюдается помутнение среды, выделение газа, небольшое пенообразование. При микроскопировании обнаружены крупные палочковидные спорообразующие бактерии в виде барабанной палочки, окрашенные в синий цвет, с хорошо различимыми неокрашенными спорами, что свидетельствует о присутствии клостридиев.

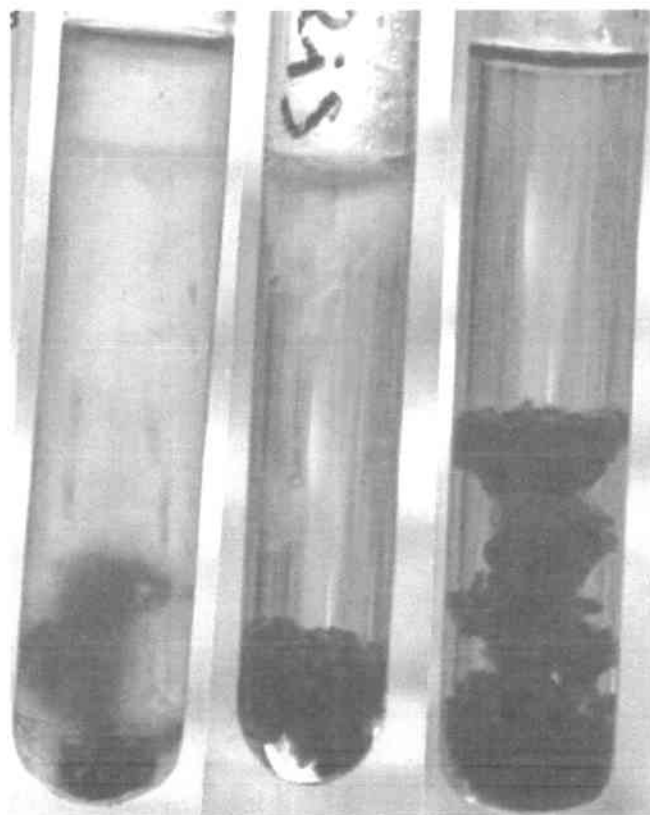


*Рисунок 2. Результаты посевов для выявления возбудителей брожения
пектиновых веществ*

3.2. Результаты посевов в жидкую среду Омелянского для выявления возбудителей брожения целлюлозы

При осмотре накопительных культур со средой Омелянского через несколько суток в пробирках с разными пробами почвы получены следующие результаты.

Проба почвы №1 (с.Барковка) (рис.3): появление неприятного гнилостного запаха, небольшое газообразование, помутнение среды, выпадение осадка белого цвета, появление на бумаге желтых пигментных пятен. При микроскопировании обнаружены длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце, что свидетельствует о присутствии предположительно *Clostridium omelianskii*, *Clostridium pasteurianum*.

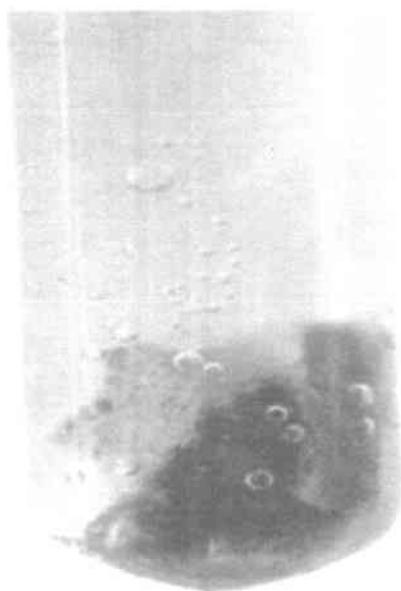


Рисунок 3. Результаты посевов в жидкую среду Омелянского для выявления возбудителей брожения целлюлозы

Проба почвы №2 (поле): появление неприятного гнилостного запаха, обильное газообразование, помутнение среды, пожелтение и разрушение бумаги в некоторых местах. При микроскопировании обнаружены длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце, что свидетельствует о присутствии предположительно *Clostridium omelianskii*.

3.3. Результаты посевов на жидкую среду Виноградского

При осмотре накопительных культур со средой Виноградского через несколько суток в пробирках с разными пробами почвы получены следующие результаты (Рис.4).

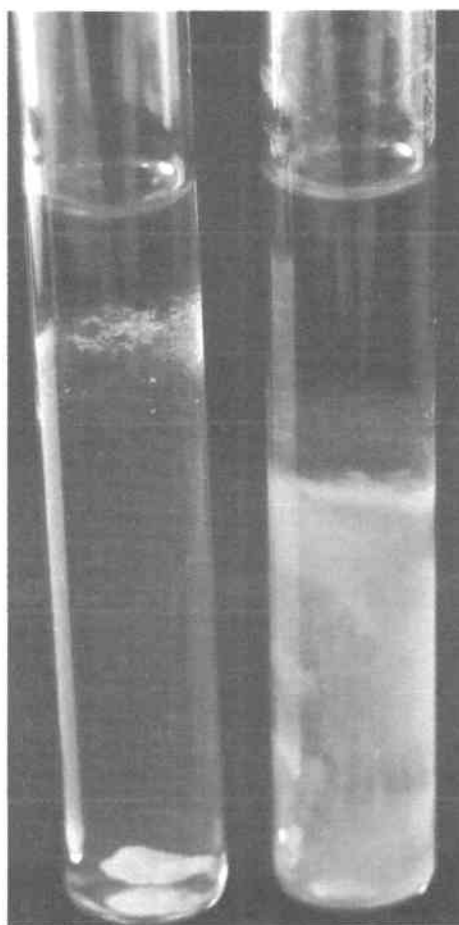


Рисунок 4. Результаты посевов на жидкую среду Виноградского

Проба почвы №1 (с.Барковка): четко видимые изменения, такие как помутнение среды, выделение пузырьков газа, образование пены, появление запаха уксусной кислоты. При микроскопировании капли жидкости накопительной культуры, окрашенной раствором Люголя, видны клетки с потемневшим содержимым и неокрашенными спорами, хорошо различимой на темном фоне. Это свидетельствует о присутствии в среде предположительно *Clostridium pasteurianum*.

Проба почвы №2 (поле): видимых изменений практически нет, за исключением небольшого, едва заметного, помутнения. Однако, при микроскопировании капли жидкости накопительной культуры, окрашенной раствором Люголя, обнаружены клетки с потемневшим содержимым и неокрашенными спорами, хорошо различимой на темном фоне, в небольшом количестве. Это свидетельствует о присутствии в среде предположительно *Clostridium pasteurianum*.

При сравнении морфологических и культуральных признаков с данными в определителе бактерий можно сказать, что данные микроорганизмы предположительно *Cl. perfringens*, *Cl. thermoaceticum* и *Cl. nigrificans*.

Таблица 1 - Результаты теста на каталазу.

Объект	Предположительный вид	Результаты теста на каталазу	Окончательно определенный вид
Почва ясневый лес	<i>Cl. pasteurianum</i> , <i>Cl. omelianskii</i>	отрицательный	<i>Cl. pasteurianum</i> , <i>Cl. omelianskii</i>
Почва поле	<i>Cl. omelianskii</i> , <i>Cl. pasteurianum</i>	отрицательный	<i>Cl. omelianskii</i> , <i>Cl. Pasteurianum</i>
Растительные волокна	<i>Cl. pectinovorum</i> , <i>Cl. felsineum</i>	отрицательный	<i>Cl. pectinovorum</i> , <i>Cl. felsineum</i>

Бактерии рода *Clostridium* выделены из следующих объектов: – из почвы – *Cl. pasteurianum* (обладающий азотфиксирующими свойствами и вызывающий маслянокислое брожение), *Cl. omelianskii*, вызывающий брожение целлюлозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клостридии составляют многочисленную группу (около 100 видов) аэробных микроорганизмов, обладающие характерными общими свойствами. Облигатно анаэробные клостридии предпочитают в качестве места обитания среды с низким содержанием кислорода. Поэтому многие из них живут в почве.

Клостридиальная флора почв в средних широтах (г. Пенза) по своему качественному составу не отличается от таковой в полярных районах. Интенсивность жизнедеятельности клостридий зависит от степени насыщенности почвы органическими веществами, соответствующими их питательным потребностям. Распространение в природе тех или иных видов непатогенных клостридий в соответствии с их биологическими свойствами определяется географией почвенных зон.

Возбудителями маслянокислого брожения является *Clostridium Pasteurianum* - типичная маслянокислая бактерия, один из основных азотфиксаторов, *Clostridium saccharobutyricum*, по-видимому, не фиксирует азот. *Clostridium butyricum* сбраживает углеводы с образованием бутилового и изопропилового спирта.

Пектиновые бактерии с помощью фермента пектиназы разрушают пектин с образованием пектиновой кислоты, превращающейся далее в галактуроновую кислоту. Образующиеся одновременно углеводы (арабиноза, галактоза и др.) сбраживаются пектиноразлагающими бактериями с образованием уксусной, муравьиной, масляной кислот, водорода и углекислоты.

Большая группа высокоспециализированных анаэробных спорообразующих бактерий получает энергию за счет сбраживания целлюлозы. Конечными продуктами брожения являются уксусная, пропионовая, масляная и молочная кислоты, этиловый спирт, водород и углекислый газ.

Непатогенные клостридии широко используются как в биотехнологии, так и медицине. Помимо этого, доказано различие клостридий одного вида друг от друга по ряду характеристик.

В ходе выполнения данной работы были сделаны следующие выводы:

- Сравнение выделяемости непатогенных клостридий из почв показало, что использованные методы достаточно эффективны для выделения разнообразных клостридий из всех типов анализируемых субстратов;
- Культивирование на среде Виноградского позволяет предположить наличие в изученных типах почв активного азотфиксатора *Clostridium pasteurianum*. Его максимальное присутствие было обнаружено в пробах взятых с территории с. Барковка. Меньше всего этих бактерий содержится в образцах, собранных на территории поля;
- Этот же вид *Clostridium*, активно участвующий в маслянокислом брожении так же в наибольшем количестве был обнаружен почвах пробы №1 (с. Барковка);
- Клостридии, сбраживающие целлюлозу (*Clostridium Omelanski*), в большом количестве обнаруживались в почвах собранных на территории (с.Барковка) в пробе №1.
- Брожение пектиновых веществ вызвали Клостридии выделенные из волокон растений, собранных в образцах почв на территории поля.
- Почва различных территории имеет различную обсеменённость *Clostridium*. Наиболее богата представителями этого рода окультуренная почва, взятая с территории с. Барковка. Меньше всего клеток и наиболее низкая биохимическая активность клостридий обнаружилась в образцах, собранных на территории поля. Эти различия, видимо, связаны с различными плодородием и загрязнением почв разных участков.

Суммируя полученные нами данные результаты и литературные данные, можно сделать вывод, что из-за интенсивного развития промышленного и сельскохозяйственного производства в значительной

степени усилились загрязнение почвенного покрова различными химическими веществами, что пагубно влияет на жизнедеятельность почвенных микроорганизмов, некоторым из которых удалось выработать адаптации, увеличивающие уровень резистентности к токсичности среды. Возможно необходимо отказаться от применения химических веществ в сельском хозяйстве, в больших количествах и заменить их на естественной почвенной микрофлоры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ассонов Н. Р. Микробиология. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 2009. 350 с.
2. Бабайцева В.А. Почвенные анаэробные бактерии рода *Clostridium* и их роль в трансформации пуриновых и пиримидиновых соединений. Автореф. канд. дисс., 2008. 24 с.
3. Башкинова О.В., Волкова И.Н., Позднякова О.Ю., Романычева А.А., Осипов Г.А. Изменение структуры микробных сообществ почв промышленного пригорода под влиянием комплексного антропогенного воздействия / Проблемы агрохимии и экологии. 2011. № 3. С. 58-64.
4. Вайсман И. Ш. Оболочечные структуры вегетативных клеток *Clostridium tetani*. В сб. Криогенные методы в электронной микроскопии., 2007. 18 с.
5. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М.: Высшая школа, 2009. 293 с.
6. Гудков А.В. Биология споровых анаэробов, Автореф. канд. дисс. Вологда. 2005. 24 с.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М.; Практика, 2019. 459 с.
8. Гуйда О.Г. *Clostridium difficile* возбудитель острых кишечных заболеваний // Респ. сб. науч. труд: Острые кишечные инфекции. Л., 2016. Вып. 10. С. 115-119.
9. Горова А.К.. Протеолитические анаэробы рода *Clostridium* и их роль в трансформации белковых веществ в почве. Автореф. канд. дисс. М., 2009. 24 с.
10. ГОСТ 17.4.4.01 83 Общие требования к отбору проб почвы. М.: Стандртинформ, 1983. 4 с.
11. ГОСТ 17.4.4.02-84. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

12. Емцев В. Г. Некоторые вопросы морфологии и физиологии азотфиксирующих *Clostridium*. М.: Колос, 2006. 60 с.
13. Елецкий И.К.. О некоторых особенностях физиологии *Cl.pasteurianum*. Микробиология, 2002. 21 (4), С. 429.
14. Емцев В.Т. Об источниках углеродного питания для азотфиксирующих микроорганизмов рода *Clostridium*. Микробиология, 2012. С. 310
15. Емцев В.Т. Систематика *Clostridium*. Успехи микробиологии, вып.5, 2008. С. 24-28.
16. Емцев В.Т., Дзадзамия, Т.Д., Мурзаков Б.Г. Изменчивость некоторых физиологических свойств анаэробных азотфиксаторов рода *Clostridium*. В сб. "Новое в биологической фиксации молекулярного азота". М.: Наука, 2001, с.160.
17. Емцев В.Т., Развожевская З.С. Влияние географических факторов на изменчивость анаэробных маслянокислых (*Cl. butyricum*) и бутиловых (*Cl. butylicum*) азотфиксирующих бактерий. вып. 4, 18, 2001. 160 с.
18. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н., Микробиология: учебник для вузов. М.: Дрофа, 2005. 445 с.
19. Зенова Г.М., Степанов А.Л. Практикум по биологии почв. Изд. Московского университета, 2002. 120 с.
20. Заварзин Г.А. Литотрофные микроорганизмы. М.: Наука, 2002, 263 с.
21. Звягинцев Д.Г., Асеева И.В., Бабьева И.П., Мирнинк Т.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд. МГУ, 2000. 166 с.
22. Иващенко А.Д. Развитие культуры маслянокислых бактерий. Микробиология, 2001, 123 с.
23. Имшенецкий А.А. Микробиология целлюлозы. М.: Изд-во МГУ, 2013. 203 с.
24. Исаченко Б.Л. Избранные труды. М.: Изд во МГУ, 2015, т.1. Козлов А.В., Селицкая О.В. Значение микроорганизмов в поддержании устойчивости почв к воздействию антропогенных факторов // Вестник Минского университета. 2015. № 3. С. 27.

25. Инструкция 4.2.10.15.21.2 Микробиологические методы выделения и идентификации возбудителей при бактериальных пищевых отравлениях. Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2004. 62 с.
26. Казанцев А.П., Зубик Т.Н., Иванов К.С. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней. М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2009. 482 с.
27. Иммунология, микробиология [Текст]: Атлас по микробиологии / А.В. Караулов [и др.], М.: БИНОМ, 2012. 67 с.
28. Кравец А.Н. Мембранный аппарат бактериальной клетки. Успехи современной микробиологии. 2004, С.25.
29. Лучков А.А. Лесная энциклопедия: В 2 х т. / под. ред. Воробьев Г.И. М.: энциклопедия, 2005. 224 с.
30. Мафарская Л.И. Острые бактериальные кишечные заболевания [Текст]: учебно-методическое пособие / Л.И. Мафарская, Москва, 2011. 53с.
31. Мантейфель А.Я. Спорообразование у бактерий. Выяснение условий спорообразования у ацетоно-бутиловых бактерий. Микробиология. 2000, с. 89.
32. Мейнелл Дж. Г., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология (теория и практика). М.: Мир, 2007. 341 с.
33. Ницэ Л.К., Годова Г.В. Несимбиотическая фиксация азота атмосферы в корневой зоне растений. В сб. "Микроорганизмы как компонент биогеоценоза". Алма Ата. Изд во Каз.ГУ. 2012. 134 с.
34. Непомилуев В.Ф., Козырев М.А. Роль микроорганизмов в процессе гниения почв. В кн. "Микроорганизмы в сельском хозяйстве". Изд-во МГУ. 2017, С. 273-275.
35. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 600 с.

36. Овруцкая И.Я., Погодяева А.Я. Микробиология и микробиологический контроль производства сухих картофельных и овощных продуктов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 2003. 88 с.
37. Пивоваров Ю.П., Королин В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы. М.: Издательство ИКАР, 2000. 268 с.
38. Практикум по микробиологии / Под редакцией Шильниковой В.К. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
39. Работнова И.Л. Общая микробиология. М.: Высш. школа, 2016. 271 с.
40. Рогачева А.И. Микробиологический контроль консервного производства. М.: Пищепромиздат, 2013. 95 с.
41. Работнова И.Л., Егорова Б.К., Озолина Г.К., Елецкий И.К. 2002. О некоторых особенностях физиологии *Cl.pasteurianum*. Микробиология, 21 (4), С. 429-430.
42. Редькина Т.В., Калининская Т.А. Эпифитная микрофлора семян риса как источник азотфиксирующих микроорганизмов в его ризосфере. Киев. 2011. С. 215-220.
43. Видовой спектр бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах: Российский ветеринарный журнал. / Серентьева Т.Е., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. М: Сельскохозяйственные животные, 2016 (1): С. 5–9.
44. Уваров М.М. Ассоциативная азотфиксация. Автореф. докт. дисс. Изд- во МГУ, 2003. 28 с.
45. Nestorovich E.M., Karginov V.A., Bezrukov S.M. Polymer partitioning and ion selectivity suggest asymmetrical shape for the membrane pore formed by epsilon toxin. Biophys. J. 2010; 99(3): p. 782.