

Лээло АЛТОН

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ОТДЕЛЬНЫХ ШТАММОВ САПРОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ В РЕЧНОЙ ВОДЕ И ИХ АДАПТАЦИЯ

Сапрофитные бактерии, с точки зрения разложения органических веществ, имеют большое значение в процессе самоочищения водоемов. Популяция их состоит из отдельных штаммов, которые отличаются друг от друга по своим требованиям к внешней среде. Кроме водных бактерий, местом обитания которых является вода, в водоемы попадает массовое количество почвенных бактерий. Хотя для почвенных бактерий, попадающих в воду, в частности, в речную воду, эта среда резко отличается от их обычной среды обитания, все же можно предположить, что не все они там сразу погибают. Часть их осаждается с разными веществами, на которые они адсорбированы, на дно рек, часть уносится с водой в море далеко от устьев. Таким образом, изучение поведения этих бактерий в условиях воды имеет большое значение с точки зрения выяснения сущности биологических процессов в водных экосистемах.

Некоторые данные об этом уже имеются. В исследованиях О. И. Колешко и др. (1982) представлены сведения о нахождении разных бактерий, в том числе таких, которые обитают обычно в почве, в пробах воды из оз. Нарочь в Белоруссии. Авторы отмечают, что водоемы Белоруссии совершенно не изучены в отношении видового состава гетеротрофных бактерий. Аналогичное можно сказать и о внутренних водоемах Эстонии. Весьма мало имеется также данных о выживаемости отдельных штаммов почвенных бактерий в речной воде и об их адаптационной способности.

Необходимым условием, от которого зависит адаптационная способность всех микроорганизмов, в том числе и почвенных бактерий, является температура среды. По некоторым данным (Murchelango, Brown, 1970), количество бактерий бывает максимальным зимой, т. е. при наиболее низкой температуре воды, и минимальным — летом. По данным О. Хагена (Hagen, 1971), у некоторых штаммов бактерий (автор отмечает *Bac. subtilis* и *Bac. cereus*) споры образуются даже при температуре, являющейся слишком низкой для развития вегетативных клеток этих бактерий.

Мы пытались выяснить при каких температурах водной среды способны развиваться и адаптироваться отдельные штаммы почвенных бактерий.

Материал и методика

Объектами исследования служили отдельные штаммы почвенных бактерий, которые были получены в отделе типовых культур микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Экспериментальную часть работы проводили в двух частях. Во-первых, было определено, при каких температурах развиваются клетки отдель-

ных штаммов бактерий на мясо-пептонном агаре (МПА) и в агаризованной речной воде (Р). Среда была стерилизована в автоклаве. Среда Р не является селективной для культивирования отдельных штаммов почвенных бактерий, но по своему химическому составу близка к среде обитания клеток бактерий в условиях рек. Исследование отдельных штаммов бактерий на среде Р дает некоторую косвенную информацию о развитии клеток бактерий при данном химическом составе речной воды. Были установлены также сроки, необходимые для роста колоний бактерий на обеих питательных средах при разных температурах инкубирования. Прирост колоний считался законченным, когда их количество больше не увеличивалось или увеличивалось на 2—3 колонии.

Во второй части работы проведены лабораторные модельные эксперименты для выяснения выживаемости отдельных штаммов бактерий в речной воде и их адаптационной способности. Все опыты проводились с водой, которую брали из р. Пирита. Химический состав определяли по общепринятой методике (Лурье, 1970) в лаборатории санитарной техники Таллинского политехнического института. Состав воды был следующим: общего фосфора 0,092 и ортофосфатов 0,038 мг Р/л, нитритов, нитратов и аммиака соответственно 0,01, 0,44 и 0,40 мг N/л, хлоридов 13 мг Cl/л, рН воды 8,2. Вода была стерилизована в автоклаве.

Исследуемые штаммы бактерий вносили в воду по одному и целой группой (2—3 разных штамма), затем воду разливали по колбам и выдерживали при температурах 18—20, 4—6, 0—1 и от —8 до —12° С. Для установления адаптационной способности и выживаемости клеток бактерий в речной воде были сделаны периодические высевы на МПА и на среду Р. Посевы были инкубированы параллельно как при 18—20, так и при 4—6 или 0—1° в зависимости от того, при какой температуре находились клетки в пробах воды. Посевы из проб воды, выдержанных при температуре от —8 до —12°, были инкубированы при 18—20 и при 0—1°.

Эксперименты проводились в 1978—1981 г. в трех повторностях. Продолжительность экспериментов 12 месяцев.

Результаты исследования

В первой части работы было установлено, что при температурах 18—20 и 8—10° на МПА и Р развивались все изучаемые штаммы бактерий кроме *B. pumilis*, клетки которой на среде из агаризованной речной воды без предварительной адаптации не развивались. При температуре 4—6° на МПА не развивались *B. mycoides* и *B. cereus*. При этой же температуре на среде Р и при температуре около 0° на обеих средах изучаемые штаммы бактерий без предварительной адаптации колоний не образовывали.

На разных средах при одной и той же температуре время роста колоний отдельных штаммов бактерий было разным (табл. 1). Сроки роста колоний отдельных штаммов бактерий на МПА и на Р со снижением температуры среды значительно удлинялись. На среде из агаризованной речной воды бактерии развивались медленнее, чем на МПА. Клетки *Bacillus polymyxa* развивались вообще медленнее по сравнению с другими штаммами бактерий.

Во второй части работы было установлено, что клетки *B. pumilis* стали развиваться в речной воде после 2- и 4-месячного выдерживания их при 18—20 и 4—6° (табл. 2). В речной воде с температурой около 0° количество клеток *B. pumilis* не увеличивалось. На среде Р при температуре 0° колоний у этого штамма не образовалось, а на МПА обра-

Таблица 1

Время, необходимое для роста колоний отдельных штаммов бактерий на МПА и Р при разных температурах, сут

Штамм	Температура, °С									
	28		18—20		8—10		4—6		0—1	
	Питательная среда									
	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р
<i>B. mycoides</i>	2	5—6	5	10—12	12	16—20	—	—	—	—
<i>B. cereus</i>	2	5—6	5	12—14	12	20—22	—	—	—	—
<i>B. pumilis</i>	3	—	5	—	12	—	19	—	—	—
<i>B. subtilis</i>	2	5—6	4	10—14	11	20—26	18	—	—	—
<i>B. megatherium</i>	2	6—8	5—6	14—16	12	21—26	18	—	—	—
<i>B. megatherium</i> var. <i>malabarensis</i>	2	3—6	4	10—14	11	20—24	18	—	—	—
<i>E. polymyxa</i>	3—4	8—10	7—9	10—16	14—15	нет данных	23	—	—	—

Примечание: — колоний не образовывалось (то же в табл. 2—4).

Таблица 2

Развитие *B. mycoides* (I) и *B. pumilis* (II) при разных температурах и сроках экспозиции в речной воде (число клеток $\times 10^2$ в 1 мл речной воды)

Продолжительность экспозиции, месяцы	Температура речной воды, °С											
	18—20				4—6				0—1			
	Количество клеток, образующих колонии на МПА и Р											
	I		II		I		II		I		II	
МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	
0	10	0,6	640	—	—	—	500	—	—	—	—	
1	7	3	520	—	—	—	570	—	—	—	—	
2	140	90	410	—	—	—	520	—	—	—	—	
3	150	160	570	1,9	—	—	590	—	—	—	—	
4	80	100	2000	130	—	—	700	—	—	—	0,5	
5	190	140	4500	370	—	—	680	2,8	—	—	нет данных	
6	9	80	3300	590	—	—	590	600	—	—	17	
7	1,5	1,2	51 000	22 000	—	—	нет данных	—	—	—	нет данных	
8	—	—	6,0	4,3	—	—	68 000	45 000	—	—	27	
10	—	—	—	—	—	—	35	39	—	—	нет данных	
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,8	

зовалось. Для появления колоний на МПА при температуре 18—20° требовалось 5 сут, а при 4—6 и 0—1° — 19 и 60 сут. На среде Р при 18—20 и 4—6° рост колоний *B. pumilis* отмечен соответственно через 14—16 и 18—20 сут после посева. Клетки *B. mycoides* развивались в речной воде только при температуре выше 4—6°. Для появления их колоний на среде Р при температуре 18—20° требовалось от 10 до 12 сут. Способность к развитию в речной воде *B. cereus* и *B. mycoides* была одинаковой. При температуре 18—20° клетки *B. subtilis* и *B. megatherium* (табл. 3) развивались. При температуре воды 4—6° клетки *B. megatherium* стали развиваться только после 4 месяцев адаптации. Для роста их колоний на Р при этой температуре требовалось от 21 до 26 сут. *B. subtilis* при этой температуре в речной воде не развивалась. При температуре около 0° *B. subtilis* и *B. megatherium* не разви-

Таблица 3

Развитие *B. subtilis* (III) и *B. megatherium* (IV) при разных температурах и сроках экспозиции в речной воде (число клеток $\times 10^4$ в 1 мл речной воды)

Продолжительность экспозиции, месяцы	Температура речной воды, °C											
	18—20				4—6				0—1			
	Количество клеток, образующих колонии на МПА и Р											
	III		IV		III		IV		III		IV	
МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	
0	4,9	3,7	0,069	0,020	4,0	—	—	—	—	—	—	
1	240	140	4,2	2,3	—	нет	данных	нет	данных	—	—	
2	570	400	7,8	5,1	3,2	—	—	—	—	—	—	
4	78 000	67 000	28	19	3,7	—	0,13	0,11	—	—	—	
6	48 000	40 000	30	12	1,5	—	32	34	—	—	—	
8	2,0	2,4	3,9	3,5	0,041	—	59	68	—	—	—	
10	0,026	0,011	3,0	2,6	0,012	—	15	12	—	—	—	
12	—	—	—	—	—	—	48	50	—	—	—	

Таблица 4

Развитие *B. megatherium* var. *malabarensis* (V) и *B. polymyxa* (VI) при разных температурах и сроках экспозиции в речной воде (число клеток $\times 10^3$ в 1 мл речной воды)

Продолжительность экспозиции, месяцы	Температура речной воды, °C											
	18—20				4—6				0—1			
	Количество клеток, образующих колонии на МПА и Р											
	V		VI		V		VI		V		VI	
МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	МПА	Р	
0	0,35	0,12	49	2,2	—	—	40	—	—	—	—	
1	50	40	39	2,7	—	—	35	—	—	—	—	
2	620	580	310	29	0,10	0,08	31	—	—	—	—	
3	690	770	1800	730	0,25	0,20	нет	данных	0,09	0,07	—	
4	700	620	3900	3400	31	24	40	—	0,20	0,26	—	
6	580	510	2700	1500	300	370	37	—	3,6	4,0	—	
8	720	670	1300	2600	470	330	20	—	2,6	2,3	—	
10	190	230	64	58	500	460	16	—	3,0	2,9	—	
12	25	29	42	37	410	430	13	—	15	12	—	

вались и в течение опытного периода не адаптировались. *B. megatherium* var. *malabarensis* и *B. polymyxa* (табл. 4) при температуре 18—20° стали развиваться без длительного периода адаптации. При температуре 4—6 и 0° клетки *B. polymyxa* не развивались. Количество клеток *B. malabarensis* при температуре 4—6° стало увеличиваться лишь через 2 месяца, время появления колоний на Р составляло от 35 до 40 сут. Штаммы *B. malabarensis* адаптировались также к температуре речной воды около 0°. Было установлено, что время роста их колоний на МПА и на Р при 0° было соответственно от 50 до 55 и от 70 до 85 сут.

Штаммы почвенных бактерий в речной воде развивались и были жизнеспособными достаточно долго. В большинстве случаев они сохраняли жизнеспособность даже после 12-месячного выдерживания при отмеченных выше температурах воды.

Современные методы видовой характеристики бактерий, выделенных из речной воды, не позволяют различать штаммы, которые приспособлены к условиям воды, и штаммы, которые приспособлены к земным условиям, но сохранившие жизнеспособность в речной воде. Не имеется также методов, которые дали бы возможность проследить за динамикой развития бактерий непосредственно в водоемах. При инкубировании посевов в термостатах при температуре, оптимальной для развития бактерий (28°), и на богатой питательной среде (МПА) колонии образуют все бактерии, находящиеся в воде в жизнеспособном состоянии. Однако это не дает ответа на вопрос: какие из этих бактерий могут развиваться в речной воде, т. е. при иных условиях питания и ином температурном режиме. В лаборатории трудно моделировать природные условия, но для изучения отдельных аспектов жизненной деятельности микроорганизмов они необходимы.

В результате нашей работы было установлено, что отдельные штаммы почвенных бактерий, попавшие в речную воду, не сразу там погибают. При более оптимальных температурах они продолжают размножаться без особенно длительного периода адаптации. Исключение составляют клетки штамма *B. pumilis*, которым требовалось 2 месяца для адаптации. То, что некоторые штаммы бактерий, попавшие из почвы в водоем, там быстро приспосабливаются и продолжают размножаться, мы отмечали и ранее (Рахно, Алтон, 1978; Алтон, 1980а, б, 1981а).

Наши данные подтверждают предположение А. Е. Крисса (1976), по которому не исключается возможность, что некоторые виды бактерий способны размножаться как в морской воде (в наших экспериментах — в речной), так и в почве. При более низких температурах речной воды обстоятельство изменяется. Например, при температуре воды 4—6° три штамма почвенных бактерий из семи изучаемых требовали для развития адаптационный период сроком от 2 до 6 месяцев. Остальные четыре штамма находились при этой температуре в речной воде в инертном состоянии, причем два из них (*Bac. cereus* и *Bac. malabarensis*) не были способны к развитию при этой температуре даже на МПА, а два были. Очевидно, на голодной среде обмен веществ тормозится быстрее, чем на богатой питательными компонентами среде.

При температуре речной воды около 0° развивались только клетки *B. malabarensis* (срок адаптации 3 месяца).

Отдельные клетки почвенных бактерий, которые находились в речной воде в инертном состоянии, сохраняли жизнеспособность около года и дольше. При отрицательных температурах среды клетки некоторых бактерий погибали несколько быстрее. При обсуждении данных о выживаемости следует учесть, что при культивировании бактерий в лабораторных условиях, во-первых, исключается приток питательных веществ в среду и, во-вторых, в среде концентрируются различные компоненты обмена веществ бактерий, что может тормозить дальнейшее развитие клеток. В природных условиях развитие бактерий лимитируется степенью чистоты воды (питание), а концентрирование продуктов обмена веществ происходит крайне редко. Таким образом, можно предположить, что клетки в условиях речной воды при достаточном содержании питательных веществ сохраняются жизнеспособными дольше.

Время роста колоний отдельных штаммов почвенных бактерий при одних и тех же условиях среды несколько различалось. При снижении температуры развития значительно замедлялось. Колонии почвенных бактерий на среде из агаризованной речной воды вообще развивались значительно медленнее, чем на МПА. Одной из причин этого, оче-

видно, является неоптимальный состав питательных компонентов в среде. Подобное явление мы отмечали и раньше при исследовании сапрофитных бактерий в почве (Алтон, 1981б). Следует отметить, что метаболические процессы некоторых штаммов почвенных бактерий при температуре около 0° могут проходить настолько медленно, что сроки инкубирования 90—100 сут оказываются слишком короткими для их выявления. Однако можно предположить, что штаммы, развитие которых происходит столь медленно, участвуют в микробиологических процессах, происходящих при более низких температурах речной воды, весьма скромно.

Таким образом, нами установлено, что при оптимальных температурах речной воды отдельные штаммы почвенных бактерий способны к развитию. Многие из них даже не нуждаются для этого в периоде адаптации. Очевидно, клетки этих штаммов бактерий также способны участвовать в процессах разложения органических веществ в воде. Однако трудно установить, какую роль в этих сложных процессах играет селекция, а какую — адаптация. Очевидно, они происходят одновременно, влияя друг на друга.

ЛИТЕРАТУРА

- Алтон Л. В. Адаптация некоторых штаммов *Escherichia coli* к разным температурам морской воды. — Микробиология, 1980а, 49, 776—782.
- Алтон Л. В. Выживаемость и адаптация сапрофитных бактерий бытовых сточных вод в морской воде. — Гигиена и санитария, 1980б, 10, 73—74.
- Алтон Л. Адаптация кишечных палочек коммунальных сточных вод к разным температурам морской воды. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1981а, 30, 54—62.
- Алтон Л. О методике посевов при микробиологических анализах почвы. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1981б, 30, 217—225.
- Крисс А. Е. Микробиологическая океанография. М., 1976.
- Колешко О. И., Потаенко Ю. С., Шарангович Л. Н. Количество и видовой состав гетеротрофных бактерий озера Нарочь. — Микробиология, 1982, 51, 143—147.
- Лурье Ю. Ю. Унифицированные методы анализа вод. М., 1970.
- Рахно П. Х., Алтон Л. В. Влияние температуры на жизнеспособность некоторых штаммов *Escherichia coli* в речной воде. — Гигиена и санитария, 1978, 8, 95—96.
- Hagen, O. The effect of low temperatures on microorganisms conditions under which cold becomes lethal. — In: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. London—New York, 1971.
- Murchelango, R. A., Brown, C. Heterotrophic bacteria in Long Island Sound. — Marine Biol., 1970, 7, 1—6.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
20/IX 1982

Leelo ALTON

SAPROFÜÜTSETE BAKTERITE ADAPTATSIOONIST JÕEVEES

Artiklis on esitatud andmeid seitsme mullabakterite tüve adaptatsiooni kohta.

Steriliseeritud jõevett koos sinna külvatud bakteritega hoiti 12 kuu vältel temperatuuril 18—20, 4—6, 0—1 ja —8 kuni —10°C. 18—20°C juures paljunesid uuritavad tüved (v. a. *B. pumilis*) pikema adaptatsiooniperioodita. Temperatuuril 4—6 ja 0—1°C hoitud bakterid katsete algperioodil ei paljunenud. Kolm tüve adapteerus 4—6°C juures 3—5 kuu järel. Temperatuuril 0—1°C katseaja vältel adaptatsiooni ei toimunud. Bakterite eluvõime ületas enamikus katsevariantides 12 kuud.

