

МИКРОБИОЛОГИЯ

Член-корреспондент АН СССР Н. А. КРАСИЛЬНИКОВ

**ОБРАЗОВАНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
В ПОЧВЕ**

Ранее нами было показано, что растения усваивают корнями различные антибиотические вещества, образуемые микроорганизмами — грибами, актиномицетами и бактериями (1).

В указанных исследованиях применялись готовые антибиотики, полученные от культур антагонистов в условиях искусственного выращивания на питательных средах. Но могут ли эти организмы оказывать аналогичное действие на растения в условиях естественного обитания? Образуют ли микробы-антагонисты антибиотические вещества непосредственно в почве?

В природных субстратах, особенно в почве, обитает большое количество микробов-антагонистов — бактерий, грибов, актиномицетов, образующих антибиотические вещества. Общебиологическое значение антагонистов мало изучено, но оно, безусловно, огромно как для формирования микробных сообществ, так и в развитии растений. По нашим подсчетам, микробы-антагонисты насчитываются тысячами, десятками и сотнями тысяч и даже миллионами в 1 г почвы в зависимости от ее свойств и окружающих условий.

Обилие антагонистов в почвах заметно сказывается на составе микробных популяций и ценозов, а в равной степени на развитии и урожайности растений. Для последних особое значение имеют микроорганизмы, которые обильно развиваются в зоне корней.

В своих исследованиях мы применяли антагонистов из актиномицетов. Были отобраны 5 наиболее активных культур разных видов; высевали их в разные почвы: краснозем, чернозем, серозем и подзол — стерильные и нестерильные. Выращивали их в почве с различными источниками питания: крахмалом (1%), соевой мукой (1%), сеном люцерны (2%), рыбным экстрактом (1%), кукурузным экстрактом (1%), сахарами и мясным бульоном. Опыты проводились при температуре 25°.

По истечении определенного срока инкубации почвы анализировались на наличие антибиотиков путем: а) наложения комочков на тест-микроба

Таблица 1

Образование антибиотиков в почве (число стафилококковых единиц в 1 г на 16-е сутки инкубации)

Почвы	Условия опыта	Акг. 290	Акт. 287	Акт. Б
Серозем	Стерильн.	20	20	10
	Нестерильн.	0	+*	0
Подзол	Стерильн.	120	80	100
	Нестерильн.	40	10	20
Контроль (почва без органики)	Стерильн.	0	0	0
	Нестерильн.	0	0	2

* Знак + указывает, что количество антибиотиков определяется только качественной пробой.

(качественная проба) и б) экстрагирования их растворителями, водными и органическими. Результаты опытов приведены в табл. 1.

Во всех почвах, обогащенных органикой, актиномицеты развивались хорошо; антибиотические вещества образовали три штамма: № 290, 287 и Б только в двух почвах — в подзоле и, слабее, в сероземе. В других почвах они либо вовсе не обнаружены, либо наблюдались только следы. В стерильной почве активных веществ было больше, чем в нестерильной.

Как и следовало ожидать, образование антибиотических веществ происходило не во всех опытных колбах, а только в колбах с определенными источниками питания,

Таблица 2

Минимальные дозы антибиотиков, при которых выявляются антибактериальные свойства почвы (в ед/г)

Антибиотики	Почвы			
	серозем	чернозем	краснозем	подзол
Стрептомицин . . .	350	850	300	80
Глобиспорин . . .	100	800	400	80
Тетрацилин . . .	600	850	200	400
Препарат 1609 . . .	10000	10000	10000	50000
Пенициллин . . .	120	300	150	60

различными для каждого штамма. Для штамма 290 более пригодными оказались соевая мука и кукурузный экстракт, для штамма 287 — люцерна и крахмал, а для штамма Б — люцерна и кукурузный экстракт. В контрольных сосудах с нестерильной почвой без внесения органики тоже отмечалось образование антибиотиков, но в очень малом количестве, в виде следов.

На основании своих исследований мы приходим к заключению, что в каждой почве имеются свои микробы-антагонисты, которые продуцируют антибиотические вещества в большем или меньшем количестве.

Своими методами анализа мы могли обнаруживать лишь небольшую часть имеющихся активных веществ. Из почвы удается экстрагировать максимум 120 ед/г, а чаще 20—50 ед/г. Во многих почвах антибиотики выявляются только качественной пробой.

Опыт показывает, что большая часть антибиотических веществ не выделяется экстрагированием ни промывкой водой, ни органическими растворителями (спирт, эфир, хлороформ).

Известно, что почвы обладают большой поглотительной способностью. По нашим наблюдениям, они активно поглощают и антибиотические вещества, причем часть поглощенных антибиотиков тут же исчезает, инактивируется, часть вымывается, а часть остается в адсорбированном и активном состоянии. Чтобы иметь представление о поглотительной способности почвы, а следовательно, о фактическом образовании и содержании антибиотиков в ней, мы провели ряд опытов с химически чистыми препаратами — пенициллином, стрептомицином и др. Сначала мы установили инактивирующую способность почв, т. е. нацело поглощаемую часть антибиотиков. Для этого в небольшие навески почв (5—10 г) вводили разные дозы антибиотика: 1000, 500, 250, 125, 60 и 30 ед/г. Затем качественной пробой устанавливали минимальную дозу, при которой почва приобретает антибактериальные свойства. Опыт показал, что размеры поглощения для насыщения почвы антибиотиком различны в разных почвах (см. табл. 2).

Например, чтобы придать 1 г сероземной почвы антибактериальную способность, необходимо минимум 350 ед. стрептомицина, 100 ед. глобиспорина, 600 ед. тетрацицина, более 10000 ед. препарата 1609 и 120 ед. пенициллина. Если в эту почву внести несколько меньше антибиотиков, то они не проявляются ни качественной пробой, ни экстракцией. То же самое отмечается и в опытах с другими почвами. Повидимому, эти количества либо разрушаются и инактивируются непосредственно после внесения, либо находятся в состоянии скрытой адсорбции. Приведенные

здесь данные показывают, что к тем величинам, которые мы получали при количественном определении антибиотиков, образуемых в почве антагонистами, следует прибавить величину и поглощенной части.

Если в сероземе было найдено 20 ед/г антибактериальных веществ, образуемых актиномицетами № 290 и 287 (см. табл. 1), то к этому количеству следует добавить и ту часть, которая была поглощена, а эта часть, судя по опыту, может быть весьма значительной, в пределах сотен единиц и более в одном грамме.

Образуемые антибиотические вещества инактивируются не нацело, часть их остается в активном состоянии. Чтобы установить активную часть адсорбированных антибиотиков, нами была проведена серия специальных опытов.

В определенные навески почв (5—10 г) вводили по 2000 ед/г антибиотика, тщательно перемешивали и тут же промывали повторными порциями воды до тех пор, пока в промывных водах не обнаруживался антибиотик. Для более полного извлечения мы применяли буферные растворы, а в отдельных случаях органические растворители (спирт, эфир, хлороформ). В промывных жидкостях определяли количество антибиотика, вымываемого из почвы. Были испытаны те же антибиотики и на тех же почвах, которые применялись в предыдущих опытах. Результаты сведены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, лишь небольшая часть внесенных антибиотиков

Количество антибиотиков в почвах, сохранившихся в активном состоянии (в ед/г; глобиспорина, стрептомицина и тетрацицина внесено по 2000 ед/г, препарата 1609 внесено 10000 ед/г)

Антибиотики	Почвы			
	краснозем	чернозем	серозем	подзол
Глобиспорин	1540	1080	1670	1800
Стрептомицин	1656	1120	1600	1900
Тетрацицин	1620	900	1200	1250
Препарат 1609	0	0	0	100

вымито 2820 ед/г из краснозема и 2600 ед/г из подзола; кроме того, в почве еще оставалось значительное количество пенициллина). Такое явление можно объяснить либо вымыванием из почвы каких-то дополнительных антибактериальных веществ, либо активацией антибиотика.

Сопоставляя данные о полном поглощении или инактивации антибиотиков с данными об их вымывании, мы можем судить о реальном содержании их в почве или о действительной емкости поглощения этих веществ почвой, а следовательно, и об антибактериальном эффекте последней. Например, в подзолистой почве при введении 2000 ед/г глобиспо-

Таблица 3

Вымывание антибиотиков из почвы (число отмытых единиц из 1 г почвы; вносилось по 2000 ед/г)

Почвы	Антибиотики				
	препарат 1609	стрептомицин	глобиспорин	тетрацицин	пенициллин
Краснозем	0	44	60	180	2820
Чернозем	0	30	120	250	1320
Серозем	0	46	230	200	2120
Подзол	300	40	120	350	2600

Таблица 4

вымывается из почвы водой или органическими растворителями. Больше всех вымывается тетрацицин, затем глобиспорин, слабее стрептомицин, а препарат 1609 совсем не вымывается из чернозема, краснозема и серозема. Небольшую часть его (300 ед.) удалось отмыть только из подзола.

Интересные данные получены для пенициллина. В промывных водах краснозема и подзола оказалось антибактериального вещества больше, чем было внесено (внесено 200 ед/г, а от-

рина инактивируется около 80 ед/г, вымывается водой (и спиртом) около 120 ед/г, а остальное количество (около 1800 ед/г) находится в адсорбированном, активном состоянии. Препарат № 1609 в той же почве полностью поглощается, инактивируется в количестве 9600 ед/г, вымывается около 300 ед/г, а в активном адсорбированном состоянии всего 100 ед/г.

Аналогичные данные получают в опытах с другими антибиотиками и на других почвах (см. табл. 4).

Адсорбция и инактивация антибиотических веществ зависят от разных причин и в значительной степени от кислотности почвы. Ауреомицин и тетрацилин насыщают нейтральный глинозем дозой в 30000 мкг/г, а для насыщения кислого глинозема требуется 60000 мкг/г и более, т. е. в 2 раза больше. Гумусированная почва поглощает при рН 3,2 400 мкг/г антибиотика, а при рН 5,6—7,6 400 мкг/г — в 10 раз меньше.

В зависимости от погложительной и инактивирующей силы антимикробное действие почв различно. Чтобы подавить рост бактерий *B. subtilis* в подзолистой почве, требуется тетрацилин: при рН 5,6—200 мкг/г, а при рН 6,2—69 мкг/г.

С течением времени количество антибиотиков в почве уменьшается. Если почвы промыть через 2—3 суток после внесения антибиотиков, то получим значительно меньшие показатели. Почва постепенно теряет привитые ей антибактериальные свойства, если нет притока антибиотических веществ.

Чтобы установить длительность сохранения антибиотических веществ в почве, мы вносили их в определенных дозах, чаще 500—600 ед/г почвы, и затем определяли по срокам наличие их качественной пробой. Результаты этих опытов сведены в табл. 5. Как видно, сохранение антибиотиков зависит от почвы и окружающих условий. В одних случаях антибиотики разрушаются и инактивируются через несколько часов после введения их, в других сохраняются днями и даже неделями. В стерильной почве они сохраняются значительно дольше, чем в нестерильной. Дольше всего антибиотики сохраняются в подзоле, затем в сероземе; наиболее быстро исчезают из чернозема и краснозема.

По степени сохраняемости более стойки глобиспорин, стрептомицин, биомицин и тетрацилин; быстро разрушаются пенициллин и препарат 1609.

Приведенный нами материал показывает, что антибиотические вещества образуются непосредственно в почве и других природных субстратах, если для этого имеются благоприятные условия. Чем активнее антагонисты продуцируют антибиотические вещества и чем длительнее эти вещества сохраняются, тем больше их накапливается в субстрате.

Институт микробиологии
Академии наук СССР

Поступило
24 XI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Н. А. Красильников, ДАН, 79, № 6, 879 (1951).

Таблица 5

Длительность сохранения антибиотиков в почвах (в днях)

Почвы	Глобиспорин	Стрептомицин	Биомицин	Тетрацилин	Препарат 1609	Пенициллин
Краснозем						
Стерильн.	22	18	20	15	2	5
Нестерильн.	2	2	3	3	0	0,5
Чернозем						
Стерильн.	25	20	30	30	2	10
Нестерильн.	5	3	6	6	0	1
Серозем						
Стерильн.	35	30	40	30	3	15
Нестерильн.	5	4	8	8	0	1
Подзол						
Стерильн.	90	80	60	50	5	20
Нестерильн.	7	6	10	8	1	3