

Оригинальная статья

УДК 579.6.504.06

<https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-4-466-480>

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ОБРАБОТКИ НА ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *CLOSTRIDIUM* (CLOSTRIDIA, BACTERIA) В ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОВОДСТВА

Н. В. Сырчина ^{1✉}, Л. В. Пилип ², Е. П. Колеватых ³, Т. Я. Ашихмина ^{1,4}

¹ Вятский государственный университет

Россия, 610000, г. Киров, ул. Московская, д. 36

² Вятский государственный агротехнологический университет

Россия, 610017, г. Киров, Октябрьский просп., д. 133

³ Кировский государственный медицинский университет

Россия, 610998, г. Киров, ул. К. Маркса, д. 112

⁴ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

Россия, 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28

Поступила в редакцию 26.06.2023 г., после доработки 23.07.2023 г., принята 23.07.2023 г., опубликована 12.12.2023 г.

Аннотация. Клостридии являются одним из самых крупных родов зубактерий, обитающих в воде, почве, кишечнике человека и животных. Род *Clostridium* включает как патогенные, так и непатогенные виды. Представители этого рода занимают лидирующее положение среди всех типов бактерий по продуцированию разнообразных токсинов. Благодаря способности к образованию спор эти микроорганизмы способны выживать в самых неблагоприятных условиях. Особую экологическую опасность представляют устойчивые к антибиотикам клостридии, переносимые в окружающую среду в составе навоза сельскохозяйственных животных. В настоящей работе изучено влияние различных способов обработки (аэрация, подкисление, внесение сурфактантов) жидкой фракции (ЖФ) свиных навозных стоков (НС) на видовой состав и численность клостридий. Установлено, что в НС навозонакопительных ванн доминирующее положение занимают *Cl. septicum* и *Cl. perfringens*. Оба вида принимают активное участие в аммонификации органических соединений, выделяя в окружающую среду широкий спектр летучих веществ с неприятным запахом. Наиболее высокая доля клостридий выявлена в биопленках, формирующихся на поверхности НС в анаэробных условиях. Такие условия складываются при хранении ЖФ в крытых лагунах, что повышает экологические риски переноса нежелательных микроорганизмов в окружающую среду. Круглосуточная аэрация и подкисление НС до pH 5.5 способствовали снижению количества клостридий. Соответствующие условия привели к формированию консорциумов микроорганизмов, в которых доминирующее положение занимали грибы. В биопленках подкисленных НС доминировали *Cl. difficile* (32.52%), *Cl. putrificum* (31.62%) и *Cl. septicum* (30.72%), в

✉ Для корреспонденции. Кафедра фундаментальной химии и методики обучения химии Вятского государственного университета.

ORCID и e-mail адреса: Сырчина Надежда Викторовна: <https://orcid.org/0000-0001-9695-7146>, nvms1956@mail.ru; Пилип Лариса Валентиновна: <https://orcid.org/0000-0001-8049-6760>, pilip_larisa@mail.ru; Колеватых Екатерина Петровна: <https://orcid.org/0000-0001-6147-3555>, hibica@mail.ru; Ашихмина Тамара Яковлевна: <https://orcid.org/0000-0003-4919-0047>, ecolab2@gmail.com.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ОБРАБОТКИ НА ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ

вариантах с добавкой ПАВ – *Cl. difficile* (69.98 – 95.26%). Наибольшая относительная численность патогенных *Cl. difficile* (95.26%) наблюдалась в варианте с добавкой катионактивного ПАВ (бензалкония хлорида).

Ключевые слова: *Clostridium*, поверхностно-активные вещества, серная кислота, навозные стоки, микробиота навозных стоков

Соблюдение этических норм. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования. Сырчина Н. В., Пилип Л. В., Колеватых Е. П., Ашихмина Т. Я. Влияние различных способов обработки на численность бактерий рода *Clostridium* (Clostridia, Bacteria) в побочных продуктах животноводства // Поволжский экологический журнал. 2023. № 4. С. 466 – 480. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-4-466-480>

ВВЕДЕНИЕ

Предотвращение рисков биологического загрязнения окружающей среды несвойственными природным экосистемам микроорганизмами (МО) входит в число важнейших задач современного сельского хозяйства. Основными источниками переноса в природные среды широкого спектра опасных биологических объектов (патогенных МО, гельминтов, яиц гельминтов) являются побочные продукты животноводства (ППЖ) – навоз и навозные стоки (НС), используемые в качестве органических удобрений. Перед внесением в почву ППЖ подвергают специальной обработке – обезвреживанию, направленному на обеспечение биологической безопасности соответствующего материала. Большинство патогенных МО в процессе обезвреживания погибает, однако наиболее устойчивые сохраняют свою жизнеспособность как в ППЖ, так и в природных средах (Пилип, Сырчина, 2022; Пилип и др., 2023; Сырчина и др., 2023). Высокую резистентность к различным способам обработки проявляют бактерии рода *Clostridium*. Экспериментальные исследования показывают, что споры клостридий выживают при переработке навоза в биореакторных и биогазовых установках, выдерживании в условиях низких температур, обработке бактерицидными препаратами (Гарайс, 2011; Leggett, 2012; Neuhaus et al., 2015).

Клостридии представляют собой один из самых крупных родов эубактерий, характерными особенностями которого являются облигатно-анаэробный энергетический метаболизм, неспособность к осуществлению диссимиляционного восстановления сульфата и образование эндоспор при попадании МО в неблагоприятные для жизнедеятельности условия. Споры могут сохраняться в почве на протяжении многих лет и прорасти в вегетативные клетки при изменении условий в благоприятном направлении.

К роду клостридий относятся как непатогенные, так и патогенные виды. Патогенные спорообразующие клостридии представляют большую опасность для животных и человека. Известно, что представители этого рода занимают лидирующее положение среди всех типов бактерий по продуцированию разнообразных токсинов (Hailegebreal, 2017). Такие виды, как *C. botulinum*, *C. septicum*, *C. chau-*

voei, *C. haemolyticum*, *C. sordellii*, *C. perfringens*, *C. tetani* могут вызывать заболевания у сельскохозяйственных животных: эмфизематозный карбункул у крупного рогатого скота, браздот у овец, клостридиальный некротический энтерит у птиц, анаэробную энтеротоксемию, злокачественный отек, столбняк, хронический кормовой клостридиоз, а также у человека: ботулизм, столбняк, газовая гангрена (Джавадов и др., 2020; Bagge et al., 2010).

Серьезные экологические проблемы вызывают не только патогенные, но и непатогенные виды клостридий, обитающие в кишечнике сельскохозяйственных животных. Попадая во внешнюю среду, соответствующие МО продолжают активно метаболизировать содержащиеся в ППЖ органические компоненты, выделяя при этом различные вещества, имеющие характерный неприятный запах. Так *C. scatologenes* является продуцентом скатола (Whitehead et al., 2008), *C. tyrobutyricum* – масляной и уксусной кислот (Liu et al., 2006), *C. saccharoperbutylacetonicum* – индола (Keis et al., 2001). Запаховое загрязнение воздуха, обусловленное микробиологическими процессами деструкции биогенных соединений на животноводческих предприятиях и прилегающих территориях, становится все более актуальной и злободневной проблемой (Сырчина и др., 2022; Пилип, Сырчина, 2023).

Для клостридий, попадающих в навоз из кишечника сельскохозяйственных животных, характерна повышенная резистентность к антибиотикам. Контаминация почвы такими штаммами МО приводит к переносу генов антибиотикорезистентности в агроценозы и другие экосистемы, что существенно затрудняет борьбу с бактериальными инфекциями человека и животных (Пилип и др., 2022; Scott et al., 2018; Blau, 2019).

Широкий спектр экологических, ветеринарных и санитарно-гигиенических проблем, обусловленных переносом клостридий из навоза сельскохозяйственных животных в природные биоценозы, свидетельствует о высокой актуальности исследований, направленных на выявление условий, способствующих снижению количества этих МО в ППЖ.

Цель настоящей работы – оценить влияние различных методов обработки побочных продуктов животноводства на численность бактерий рода *Clostridium*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований использовали жидкую фракцию (ЖФ) НС, полученную методом сепарирования. Время нахождения НС в подпольных навозо-накопительных ваннах производственных помещений – 10 суток. Образцы ЖФ отбирали в стерильные емкости сразу после сепарирования и транспортировали в химическую лабораторию. Влажность исследуемых образцов ЖФ – 99.4%; pH 6.7; зольность – 19.0% от массы сухого вещества.

В качестве приемов обработки использовали разные режимы аэрации ЖФ атмосферным воздухом и добавку реагентов (различных типов поверхностно-активных веществ (ПАВ) и раствора H_2SO_4). Оба приема находят применение в производственных условиях для снижения эмиссии запахообразующих веществ и улучшения микробиологических характеристик ППЖ (Колеватых и др., 2022). Следует отметить, что если влияние аэрации и подкисления на активность микро-

организмов-аммонификаторов достаточно хорошо исследованы и описаны (Миров, Хмыров, 2002; Пилип и др., 2020), то сведения о характере воздействия различных типов ПАВ на микробиоту НС до настоящего времени весьма противоречивы и неоднозначны, что затрудняет оценку эффективности применения ПАВ для обработки НС.

Образцы ЖФ (объем 4.0 л каждый) помещали в пластиковые пятилитровые емкости, вносили добавки реагентов согласно вариантам эксперимента, перемешивали и на протяжении всего эксперимента (14 суток) выдерживали при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в условиях слабого освещения (в помещении с закрытыми шторами окнами). Началом эксперимента считали момент внесения добавок и включения аэратора. Для аэрации ЖФ применяли регулируемый воздушный компрессор с керамическими распылителями. Объем подаваемого воздуха устанавливали на уровне 150 мл в минуту на 1 л ЖФ.

Варианты эксперимента: контроль (нативная ЖФ без добавок и аэрации в емкости с открытой крышкой); 1) круглосуточная аэрация; 2) аэрация 2 часа в сутки; 3) анаэробные условия хранения (в емкости с герметично закрытой на протяжении всего эксперимента крышкой); 4) добавка раствора H_2SO_4 до pH 5.5 ± 0.1 ; 5) добавка катионактивного ПАВ (бензалкония хлорида); 6) добавка неионогенного ПАВ (оксида лаурилдиметиламина); 7) добавка анионактивного ПАВ (лауретсульфата натрия). Все ПАВ вносили в дозировке 10.0 мл на 1 м^3 ЖФ (в расчете на безводную форму ПАВ).

Микробиологические исследования контрольных и экспериментальных вариантов ЖФ осуществляли в специализированной микробиологической лаборатории. Для исследований отбирали пробы биопленок (с поверхности ЖФ) и пробы бактериопланктона (с глубины 12 – 15 см от поверхности). Образцы отбирали через 14 суток после начала эксперимента и сразу доставляли в лабораторию. Из исследуемого материала готовили ряд серийных разведений с применением стерильного физиологического раствора. Посев осуществляли в питательную среду Анаэроагар (Himedia, Индия), инкубировали при 37°C в анаэробных условиях с использованием газогенерирующих пакетов «АНАЭРОГАЗ» (НПО «ИНКО», Россия). Изучали характерные для кластридий колонии, а также морфологические особенности клеток при микроскопии фиксированных препаратов, окрашенных методами Грама и Ожешко. МО идентифицировали в биохимическом тесте АНАЭРОтест23 (Pliva – Lachema, Хорватия) (ГОСТ 31744-2012; Шельгин и др., 2018; ГОСТ Р 70152-2022).

Дополнительно были исследованы ЖФ сразу после сепарирования (ЖФ-1) и свежий свиной навоз (СН), отбор проб которого осуществляли стерильным инструментом в стерильную тару при соблюдении правил асептики непосредственно после дефекации животных. Влажность исследуемых образцов навоза – 87.0%; pH 7.2; зольность – 28.5% от массы сухого вещества.

Все исследования проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных результатов выполняли стандартными методами с использованием встроенного пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Corp., USA). Статистическую значимость различий средних величин оценивали по *t*-критерию Стьюдента (использовали гетероскедастический двусторонний тест ТТЕСТ из статистического пакета Microsoft Excel).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате микробиологических исследований ССН и ЖФ-1 было выявлено 6 видов клостридий, принимающих активное участие в процессах аммонификации (табл. 1).

Таблица 1. Видовое разнообразие бактерий рода *Clostridium* в свином навозе и жидкой фракции (ЖФ-1)

Table 1. Bacterial species of the genus *Clostridium* in pig manure and the liquid fraction of manure effluents (LF-1)

Вид бактерий рода <i>Clostridium</i> / Species of the genus <i>Clostridium</i>	Навоз свиной нативный / Pig manure native		Жидкая фракция свиных навозных стоков (ЖФ-1) / Liquid fraction of manure effluents (LF-1)	
	Абс-ное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Отн-ное значение, % / Relative value, %	Абс-ное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Отн-ное значение, % / Relative value, %
<i>Cl. sporogenes</i>	$(9.6 \pm 0.6) \times 10^3$	0.14	$(8.7 \pm 0.3) \times 10^2$	0.14
<i>Cl. bifermentans</i>	$(7.0 \pm 1.5) \times 10^5$	10.00	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^4$	1.97
<i>Cl. putrificum</i>	$(3.2 \pm 1.3) \times 10^6$	45.70	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^4$	2.79
<i>Cl. septicum</i>	$(9.0 \pm 1.4) \times 10^4$	1.29	$(3.5 \pm 0.4) \times 10^5$	57.52
<i>Cl. perfringens</i>	$(3.0 \pm 0.6) \times 10^6$	42.86	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^5$	36.16
<i>Cl. (Clostridioides) difficile</i>	$(3.7 \pm 0.3) \times 10^2$	0.01	$(8.6 \pm 0.3) \times 10^3$	1.41
Общее число бактерий рода <i>Clostridium</i> / Total numbers of bacteria of the genus <i>Clos-</i> <i>tridium</i>	$(7.0 \pm 0.5) \times 10^6$	100	$(6.1 \pm 0.3) \times 10^5$	100

Общее количество бактерий рода *Clostridium* в ЖФ-1 оказалось на порядок меньше количества этих МО в ССН. Доминирующее положение в ССН занимали *Cl. putrificum* и *Cl. perfringens*, в ЖФ-1 – *Cl. septicum* и *Cl. perfringens*, относящиеся к возбудителям газовой гангрены (анаэробной раневой инфекции). Выявленные в ЖФ-1 и ССН *Cl. putrificum* принимают активное участие в процессах аммонификации и формировании неприятного запаха. Для *Cl. septicum* характерны выраженная протеолитическая активность, способность образовывать споры с высокой термостойкостью, способность адаптироваться и прорасти в подкисленном до pH 5.0 субстрате (Brunt et al., 2020; Valero et al., 2020), что существенно увеличивает возможность выживания бактерий во внешней среде.

В ССН выявлено более высокое, чем в ЖФ-1 количество *Cl. bifermentans*. Для этого вида характерен широкий спектр метаболитов, включая вещества с выраженным запахом (масляная, уксусная и муравьиная кислоты, этанол, бутанол, ацетон) (Leja et al., 2013), формирующих специфический неприятный запах навоза.

Особого внимания заслуживает наличие в НС-1 и ССН такого вида, как *Clostridioides difficile*. Указанный вид является возбудителем псевдомембранозного колита (*C. difficile* – ассоциированных болезней) у человека. Данный вид вегетирует в кишечнике поросят раннего возраста. В 2011 г. *C. difficile* послужил причиной заболевания порядка 500000 человек в США и смерти около 29000 человек (Sandhu et al., 2018). Вид *Clostridium difficile* был перенесен во вновь созданный

род *Clostridioides* семейства *Peptostreptococcaceae* и ему присвоено наименование *Clostridioides difficile*.

Количество клостридий в ЖФ на начало эксперимента составляло $(6.1 \pm 0.3) \times 10^5$ КОЕ/мл, что не превышало 0.11% от общего микробного числа (ОМЧ) ЖФ-1. Однако к 14-м суткам в контрольных образцах этот показатель увеличился до $(8.0 \pm 0.6) \times 10^7$ КОЕ/мл (31.19% от ОМЧ). Согласно результатам исследований, на количество клостридий существенное влияние оказали способы обработки ЖФ. На рис. 1 приведены данные, характеризующие влияние условий аэрации на относительную численность клостридий (%) в биопленке и бактериопланктоне ЖФ по отношению к ОМЧ через 14 суток после начала эксперимента, а также относительная численность клостридий на начало эксперимента (0.11%).

Приведенные на рис. 1 данные показывают, что относительная численность клостридий в ЖФ с течением времени существенно возрастает. Максимальное количество этих МО выявлено в биопленке четвертого варианта эксперимента (анаэробные условия). Такие условия складываются при обезвреживании ЖФ в крытых лагунах. Высокая относительная численность клостридий выявлена и в варианте 3 (периодическая аэрация). Наименьшая численность клостридий была в биопленках, формирующихся при непрерывной подаче атмосферного воздуха. В соответствующих биопленках доминирующее положение занимали грибы (85.48%), а облигатные анаэробы, к которым относятся бактерии рода *Clostridium*, составляли 14.30%. Тем не менее, клостридии сохраняли жизнеспособность и в условиях аэрации, по всей видимости, за счет образования спор.

Условия эксперимента оказали влияние не только на численность, но и на видовое разнообразие бактерий рода *Clostridium* (табл. 2).

На 14-е сутки в бактеориопланктоне ЖФ контрольных образцов по-прежнему доминировали *Cl. septicum* (61.25%) и *Cl. perfringens* (35.00%), однако в сформировавшихся биопленках изменилось соотношение видов клостридий: стали преобладать *Cl. difficile* (68.30%). Причем данная тенденция отмечалась в биопленках всех вариантов эксперимента, доля *Cl. difficile* составила от 67.31 до 79.71%.

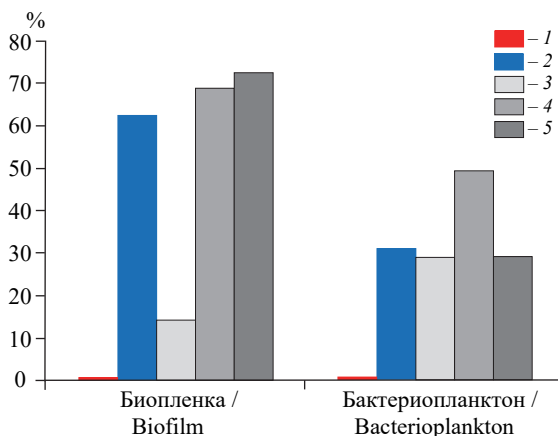


Рис. 1. Доля бактерий рода *Clostridium* в ОМЧ биопленок и бактериопланктона через 14 суток после начала и в начале эксперимента (ЖФ-1): 1 – начало эксперимента, 2 – контроль, 3 – вариант 1, 4 – вариант 2, 5 – вариант 3

Fig. 1. Proportion of *Clostridium* bacteria in the TMN (Total Microbial Number) of biofilms and bacterioplankton 14 days after the start and at the beginning of the experiment (LF-1): 1 – beginning of the experiment, 2 – control, 3 – option 1, 4 – option 2, 5 – option 3

Таблица 2. Видовое разнообразие бактерий рода *Clostridium* в зависимости от различных условий хранения НС (14-е сутки эксперимента)
Table 2. Species diversity of bacteria of the genus *Clostridium* depending on NC storage conditions (14th day of the experiment)

Вид бактерий рода <i>Clostridium</i> / Species of the genus <i>Clostridium</i>	Вариант эксперимента / Option of the experiment					
	Контроль / Control		Вариант 1 / Option 1		Вариант 2 / Option 2	
	Абсолютное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Относительное значение, % / Relative value, %	Абсолютное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Относительное значение, % / Relative value, %	Абсолютное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Относительное значение, % / Relative value, %
Биопленка / Biofilm						
<i>Cl. sporogenes</i>	(8.9±1.3)×10 ³	1.03	(4.3±0.8)×10 ³	0.61	(7.9±1.1)×10 ⁴	9.01
<i>Cl. bifementans</i>	(7.5±0.4)×10 ⁴	8.68	(3.9±0.9)×10²	0.06	(5.8±0.9)×10 ⁴	6.62
<i>Cl. putrificans</i>	(8.4±0.3)×10 ⁴	9.72	(5.8±1.1)×10 ⁴	8.25	(7.2±1.2)×10 ⁴	8.21
<i>Cl. septicum</i>	(4.8±0.3)×10 ⁴	5.56	(6.9±1.3)×10³	0.98	(6.7±1.1)×10³	0.76
<i>Cl. perfringens</i>	(5.8±0.3)×10 ⁴	6.71	(7.3±1.1)×10 ⁴	10.39	(7.1±0.9)×10 ⁴	8.09
<i>Cl. (Clostridioides) difficile</i>	(5.9±0.4)×10 ⁵	68.30	(5.6±0.3)×10 ⁵	79.71	(5.9±1.1)×10 ⁵	67.31
Общее число бактерий рода <i>Clostridium</i> / Total numbers of bacteria of the genus <i>Clostridium</i>	(8.6±0.4)×10 ⁵	100	(7.0±0.8)×10 ⁵	100	(8.8±0.6)×10 ⁵	100
Бактериопланктон / Bacterioplankton						
<i>Cl. sporogenes</i>	(8.9±1.3)×10 ⁴	0.11	(6.4±0.5)×10⁵	1.08	(8.9±0.8)×10 ⁴	0.11
<i>Cl. bifementans</i>	(1.5±0.4)×10 ⁶	1.88	(6.5±0.7)×10 ⁶	10.92	(7.0±0.4)×10 ⁶	8.48
<i>Cl. putrificans</i>	(1.4±0.3)×10 ⁶	1.75	(3.8±0.6)×10⁷	63.87	(8.4±0.3)×10 ⁶	10.18
<i>Cl. septicum</i>	(4.9±0.4)×10 ⁷	61.25	(6.9±1.5)×10⁶	12.44	(4.0±0.5)×10 ⁷	72.67
<i>Cl. perfringens</i>	(2.8±0.3)×10 ⁷	35.00	(6.4±0.6)×10⁶	12.44	(7.4±0.3)×10⁶	8.48
<i>Cl. (Clostridioides) difficile</i>	(9.8±0.3)×10 ⁵	0.01	(6.0±0.5)×10⁴	0.10	(6.8±0.3)×10⁴	0.08
Общее число бактерий рода <i>Clostridium</i> / Total numbers of bacteria of the genus <i>Clostridium</i>	(8.0±0.6)×10 ⁷	100	(5.9±0.9)×10 ⁷	100	(6.3±0.7)×10 ⁷	100

Примечание. Жирным шрифтом выделены варианты эксперимента, достоверно ($P > 0.95$) отличающиеся от контроля.
Note. Bold font shows options of the experiment, reliably ($P > 0.95$) different from the control.

Постоянная аэрация ЖФ снизила относительное количество *Cl. septicum* и *Cl. perfringens* в бakteориопланктоне до 12.44%, при этом количество *Cl. putrificum* увеличилось до 63.87%. В условиях периодической аэрации весьма устойчивым оказался вид *Cl. septicum* (72.67%). В анаэробных условиях доминировали *Cl. sporogenes* (77.72%).

На численность клостридий определенное влияние оказал приём подкисления и добавки ПАВ. На рис. 2 представлены результаты, характеризующие влияние серной кислоты и различных типов ПАВ на долю клостридий в ОМЧ биопленок и бактериопланктона.

Наиболее значительное снижение абсолютной и относительной численности клостридий было установлено в варианте 5 (добавка H_2SO_4 до pH 5.5 ± 0.1). Обработка ЖФ растворами ПАВ оказала менее выраженное воздействие на эти бактерии. Даже катионактивный хлорид бензалкония, широко используемый в качестве надежного антисептического средства, не привел к существенному снижению МО этого рода. Статистически значимых различий в воздействии различных типов ПАВ на долю клостридий в ОМЧ выявить не удалось. Незначительный эффект воздействия ПАВ на жизнедеятельность клостридий был установлен и в работах других исследователей (Reddy et al., 1999). Кроме того, в ряде публикаций отмечено, что катионактивные ПАВ могут стимулировать прорастание спор этих МО в питательной среде (Paredes-Sabja et al., 2009).

В табл. 3 приведены данные о влиянии подкисления и добавок ПАВ на видовое разнообразие бактерий рода *Clostridium*.

Использование приема подкисления привело к доминированию в биопленках НС *Cl. difficile* (32.52%), *Cl. putrificum* (31.62%) и *Cl. septicum* (30.72%). В вариантах с добавкой ПАВ в биопленках доминировали *Cl. difficile* (69.98 – 95.26%). Наибольшая относительная численность патогенных *Cl. difficile* (95.26%) наблюдалась в варианте с добавкой катионактивного ПАВ.

В бakteориопланктоне НС при подкислении и добавке неионногенного ПАВ преобладали *Cl. perfringens* (88.82 и 88.01% соответственно), *Cl. septicum* доминировали при применении катионактивного и неионактивного ПАВ (77.36 и 89.23% соответственно).

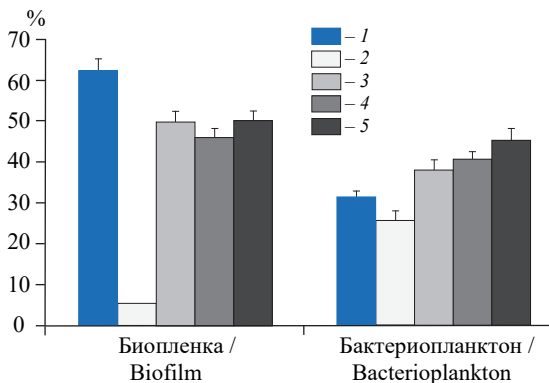


Рис. 2. Влияние добавок H_2SO_4 и ПАВ на долю бактерий рода *Clostridium* в биопленке и бактериопланктоне ЖФ: 1 – контроль, 2 – вариант 4, 3 – вариант 5, 4 – вариант 6, 5 – вариант 7

Fig. 2. Effect of H_2SO_4 and surfactant additives on the proportion of *Clostridium* bacteria in biofilms and bacterioplankton of the liquid fraction: 1 – control, 2 – option 4, 3 – option 5, 4 – option 6, 5 – option 7

Таблица 3. Влияние добавок H_2SO_4 и ПАВ на видовое разнообразие бактерий рода *Clostridium*
Table 3. Effect of H_2SO_4 and surfactant additives on the bacterial species diversity of the genus *Clostridium*

Вид бактерий рода <i>Clostridium</i> / Species of the genus <i>Clostridium</i>	Вариант 4 / Option 4		Вариант 5 / Option 5		Вариант 6 / Option 6		Вариант 7 / Option 7	
	Абсолютное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Относительное значение, % / Relative value, %	Абсолютное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Относительное значение, % / Relative value, %	Абсолютное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Относительное значение, % / Relative value, %	Абсолютное значение, КОЕ/мл / Absolute value, CFU/ml	Относительное значение, % / Relative value, %
Биопленка / Biofilm	<i>Cl. sporogenes</i>	0.26	$(6.3 \pm 0.9) \times 10^3$	0.87	$(5.4 \pm 0.8) \times 10^3$	0.66	$(6.4 \pm 0.3) \times 10^3$	0.96
	<i>Cl. bifidum</i>	2.76	$(6.9 \pm 1.1) \times 10^3$	0.95	$(7.1 \pm 1.2) \times 10^3$	0.87	$(8.2 \pm 1.1) \times 10^3$	1.23
	<i>Cl. putrificum</i>	31.62	$(7.4 \pm 1.1) \times 10^3$	1.02	$(7.2 \pm 0.9) \times 10^4$	8.84	$(7.2 \pm 0.9) \times 10^4$	10.84
	<i>Cl. septicum</i>	30.72	$(7.9 \pm 1.2) \times 10^3$	1.09	$(8.1 \pm 1.0) \times 10^4$	9.95	$(6.1 \pm 0.5) \times 10^4$	9.18
	<i>Cl. perfringens</i>	2.12	$(5.8 \pm 0.9) \times 10^3$	0.81	$(7.9 \pm 1.1) \times 10^4$	9.70	$(6.9 \pm 0.6) \times 10^3$	1.04
	<i>Cl. (Clostridioides) difficile</i>	32.52	$(6.9 \pm 1.1) \times 10^5$	95.26	$(5.7 \pm 1.1) \times 10^5$	69.98	$(5.1 \pm 0.8) \times 10^5$	76.75
Бактериопланктон / Bacterioplankton	Общее число бактерий рода <i>Clostridium</i> / Total numbers of bacteria of the genus <i>Clostridium</i>	100	$(7.2 \pm 0.6) \times 10^5$	100	$(8.2 \pm 0.3) \times 10^5$	100	$(6.7 \pm 0.3) \times 10^5$	100
	<i>Cl. sporogenes</i>	0.01	$(7.2 \pm 1.1) \times 10^4$	0.10	$(5.7 \pm 0.8) \times 10^4$	0.07	$(6.2 \pm 0.4) \times 10^4$	0.07
	<i>Cl. bifidum</i>	1.03	$(5.1 \pm 1.2) \times 10^6$	6.80	$(6.6 \pm 1.1) \times 10^5$	0.82	$(7.2 \pm 0.8) \times 10^5$	0.81
	<i>Cl. putrificum</i>	0.86	$(5.9 \pm 0.8) \times 10^6$	7.87	$(8.5 \pm 0.8) \times 10^5$	1.05	$(6.5 \pm 0.8) \times 10^5$	0.73
	<i>Cl. septicum</i>	9.27	$(5.8 \pm 1.1) \times 10^7$	77.36	$(8.1 \pm 0.9) \times 10^6$	10.04	$(7.9 \pm 0.4) \times 10^7$	89.23
	<i>Cl. perfringens</i>	88.82	$(5.9 \pm 1.0) \times 10^6$	7.87	$(7.1 \pm 1.1) \times 10^7$	88.01	$(8.1 \pm 0.8) \times 10^6$	9.15
Общее число бактерий рода <i>Clostridium</i> / Total numbers of bacteria of the genus <i>Clostridium</i>		0.01	$(4.8 \pm 0.7) \times 10^3$	0.01	$(7.8 \pm 1.2) \times 10^3$	0.01	$(6.6 \pm 0.6) \times 10^3$	0.01
		100	$(7.5 \pm 0.6) \times 10^7$	100	$(8.1 \pm 0.3) \times 10^7$	100	$(8.9 \pm 0.3) \times 10^7$	100

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регулирование переноса бактерии рода *Clostridium* из навоза животных в окружающую среду представляет серьезную технологическую проблему. Благодаря способности к спорообразованию эти бактерии проявляют высокую устойчивость к воздействию таких методов обработки ППЖ, как аэрирование, подкисление, воздействие различных типов ПАВ, включая катионактивные. Соответствующие методы приводят к подавлению численности большинства МО, попадающих в ППЖ из кишечника животных, но относительное количество клостридий при этом существенно возрастает.

В навозных стоках навозонакопительных ванн, расположенных в подпольном пространстве свинарников, доминирующее положение занимают такие виды, как *Cl. septicum* и *Cl. perfringens*. Оба вида принимают активное участие в аммонификации органических соединений, выделяя в окружающую среду широкий спектр летучих веществ с неприятным запахом.

Наиболее высокая доля клостридий выявлена в биопленках, формирующихся на поверхности НС в анаэробных условиях. Такие условия складываются при хранении ЖФ в крытых лагунах, что повышает экологические риски переноса нежелательных МО в окружающую среду.

Самое низкое количество клостридий наблюдали в поверхностных биопленках ЖФ, формирующихся в условиях круглосуточной аэрации, а также в условиях подкисления до pH 5.5. Как аэрация, так и подкисление способствовали формированию консорциумов МО, в которых доминировали грибы.

Результаты работы могут найти применение при разработке технологий снижения рисков микробиологического загрязнения окружающей среды отходами животноводства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гагайц М. Устойчивые к холоду бактерии *Clostridium estertheticum* и порча говядины в вакуумных упаковках // Все о мясе. 2011. № 6. С. 7 – 9.

ГОСТ 31744-2012. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод подсчета колоний *Clostridium perfringens*. М.: Стандартинформ, 2014. 16 с.

ГОСТ Р 70152-2022. Качество воды. Методы внутреннего лабораторного контроля качества проведения микробиологических и паразитологических исследований. М.: Российский институт стандартизации, 2022. 58 с.

Джавадов Э. Д., Новикова О. Б., Женихова Н. И., Безбородова Н. А. Клостридиозы // БИО. 2020. № 6. С. 25 – 31.

Колеватых Е. П., Пилип Л. В., Сырчина Н. В., Козвонин В. А. Трансформация микробиоты отходов животноводства под влиянием химических реагентов для устранения запаха // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 4. С. 159 – 165. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-4-159-165>

Мионов В. В., Хмыров В. Д. Влияние активной аэрации на интенсивность протекания биотермических процессов в компостируемой смеси // Вестник Тамбовского государственного технического университета. 2002. Т. 8, № 4. С. 668 – 672.

Пилип Л. В., Сырчина Н. В. Оценка эффективности различных препаратов для снижения запахового загрязнения окружающей среды отходами свиноводства // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. 2022. № 25-2. С. 206 – 215.

Пилип Л. В., Сырчина Н. В. Роль аммонификаторов в эмиссии аммиака из свиных навозных стоков // Известия КГТУ. 2023. № 68. С. 46 – 54. <https://doi.org/10.46845/1997-3071-2023-68-46-54>

Пилип Л. В., Козвонин В. А., Сырчина Н. В., Колеватых Е. П., Ашихмина Т. Я. Влияние подкисления навозных стоков на их микробиологические характеристики // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 3. С. 161 – 167. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-3-161-167>

Пилип Л. В., Сырчина Н. В., Козвонин В. А., Колеватых Е. П., Ашихмина Т. Я., Саза-нов А. В. Биологическое загрязнение пахотных земель отходами свиноводства // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 3. С. 199 – 205. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-3-199-205>

Пилип Л. В., Сырчина Н. В., Колеватых Е. П. Оценка безопасности восстановленной подстилки, полученной на фильтрационно-сушильной установке // Российский журнал прикладной экологии. 2023. № 1(33). С. 45 – 51. <https://doi.org/10.24852/2411-7374.2023.1.45.51>

Сырчина Н. В., Пилип Л. В., Ашихмина Т. Я. Контроль запахового загрязнения атмосферного воздуха (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 2. С. 26 – 34. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-2-026-034>

Сырчина Н. В., Пилип Л. В., Колеватых Е. П., Ашихмина Т. Я., Кузнецов Д. А. Влияние гипохлорита натрия на микробиоту и запах навозных стоков // Поволжский экологический журнал. 2023. № 1. С. 107 – 116. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-1-107-116>

Шельгин Ю. А., Алёшкин В. А., Сухина М. А., Миронов А. Ю., Брико Н. И., Козлов Р. С., Зверев В. В., Ачкасов С. И., Ковалишина О. В., Селькова Е. П., Сафин А. Л., Гренкова Т. А., Халиф И. Л., Фролов С. А., Кашиников В. Н., Сушков О. И. Клинические рекомендации национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и общероссийской общественной некоммерческой организации «Ассоциация колопроктологов России» по диагностике, лечению и профилактике *Clostridium difficile* – ассоциированной диареи (CDI) // Колопроктология. 2018. № 3. С. 7 – 23. <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2018-0-3-7-23>

Bagge E., Persson M., Johansson K. E. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants // Journal of Applied Microbiology. 2010. Vol. 109, № 5. P. 1549 – 1565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04790.x>

Blau K. Manure and doxycycline affect the bacterial community and its resistome in lettuce rhizosphere and bulk soil // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10. Article number 725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00725>

Brunt J., van Vliet A. H., Carter A. T., Stringer S. C., Amar C., Grant K. A., Godbole G., Peck M. W. Diversity of the genomes and neurotoxins of strains of *Clostridium botulinum* group I and *Clostridium sporogenes* associated with foodborne, infant and wound botulism // Toxins. 2020. Vol. 12, iss. 9. Article number 586. <https://doi.org/10.3390/toxins12090586>

Hailegebreal G. A review on *Clostridium perfringens* food poisoning // Global Research Journal of Public Health and Epidemiology. 2017. Vol. 4, № 3. P. 104 – 109.

Keis S., Shaheen R., Jones D. T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001. Vol. 51, iss. 6. P. 2095 – 2103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2095>

Leggett M. J. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance // Journal of Applied Microbiology. 2012. Vol. 113, iss. 3. P. 485 – 498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x>

Leja K., Myszka K., Czaczyk K. The ability of *Clostridium bifermentans* strains to lactic acid biosynthesis in various environmental conditions // SpringerPlus. 2013. Vol. 2. Article number 44. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-44>

- Liu X., Zhu Y., Yang S. T. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants // Enzyme and Microbial Technology. 2006. Vol. 38, iss. 3–4. P. 521 – 528. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.008>
- Neuhaeus J., Schrödl W., Shehata A. A., Krüger M. Detection of *Clostridium botulinum* in liquid manure and biogas plant wastes // Folia Microbiologica. 2015. Vol. 60, iss. 5. P. 451 – 456. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0381-3>
- Paredes-Sabja D., Setlow P., Sarker M. R. Role of GerKB in germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores // Applied and Environmental Microbiology. 2009. Vol. 75, iss. 11. P. 3813 – 3817.
- Reddy R. M., Reddy P. G., Seenayya G. Enhanced production of thermostable β -amylase and pullulanase in the presence of surfactants by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 // Process Biochemistry. 1999. Vol. 34, iss. 1. P. 87 – 92. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00073-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00073-9)
- Sandhu B. K., McBride S. M. Clostridioides difficile // Trends in Microbiology. 2018. Vol. 26, iss. 12. P. 1049 – 1050. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.004>
- Scott A., Tien Y. C., Drury C. F., Reynolds W. D., Topp E. Enrichment of antibiotic resistance genes in soil receiving composts derived from swine manure, yard wastes, or food wastes, and evidence for multiyear persistence of swine *Clostridium* spp. // Canadian Journal of Microbiology. 2018. Vol. 64, iss. 3. P. 201 – 208. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0642>
- Valero A., Olague E., Medina-Pradas E., Garrido-Fernández A., Romero-Gil V., Cantalejo M. J., García-Gimeno R. M., Pérez-Rodríguez F., Posada-Izquierdo G. D., Arroyo-López F. N. Influence of acid adaptation on the probability of germination of *Clostridium sporogenes* spores against pH, NaCl and time // Foods. 2020. Vol. 9, iss. 2. Article number 127. <https://doi.org/10.3390/foods9020127>
- Whitehead T. R., Price N. P., Drake H. L., Cotta M. A. Catabolic pathway for the production of skatole and indoleacetic acid by the acetogen *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, and swine manure // Applied and Environmental Microbiology. 2008. Vol. 74, iss. 6. P. 1950 – 1953. <https://doi.org/10.1128/AEM.02458-07>

Effect of various processing methods on the numbers of *Clostridium* (Clostridia, Bacteria) in animal by-products

N. V. Syrchina ^{1✉}, L. V. Pilip ², E. P. Kolevatykh ³, T. Ya. Ashikhmina ^{1,4}

¹ Vyatka State University

36 Moskovskaya St., Kirov 610000, Russia

² Vyatka State Agrotechnological University

133 Oktyabrsky Pros., Kirov 610017, Russia

³ Kirov State Medical University

112 K. Marx St., Kirov 610998, Russia

⁴ Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of RAS

28 Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Republic of Komi 167982, Russia

Received: June 26, 2023 / revised: July 23, 2023 / accepted: July 23, 2023 / published: December 12, 2023

Abstract. *Clostridia* are one of the largest genera of eubacteria living in water, soil, the intestines of humans and animals. The genus *Clostridium* includes both pathogenic and non-pathogenic species. Representatives of this genus occupy a leading position among all types of bacteria in producing a variety of toxins. Due to their ability to form spores, these microorganisms can survive in the most unfavorable conditions. Antibiotic-resistant *Clostridia*, which are released to the environment as part of farm animal manure, are of particular environmental danger. We have studied the influence of various treatment methods (aeration, acidification, and surfactant application) of the liquid fraction of pig manure effluents (ME) on the species composition and the numbers of *Clostridia*. *Cl. septicum* and *Cl. perfringens* were found to occupy a dominant position in the ME of manure storage baths. Both species are actively involved in the ammonification of organic compounds, releasing a wide range of volatile substances with an unpleasant odor into the environment. Most of the *Clostridia* were detected in biofilms formed on the surface of ME under anaerobic conditions. Such conditions are formed during storage of the liquid fraction in closed lagoons, which increases the environmental risks of the release of undesirable microorganisms into the environment. Round-the-clock aeration and acidification of ME to pH 5.5 reduce the numbers of *Clostridia*. Such conditions contribute to the formation of microorganism consortia with fungi to occupy a dominant position. *Cl. difficile* (32.52%), *Cl. putrificum* (31.62%) and *Cl. septicum* (30.72%) predominated in biofilms of acidified ME, whilst only *Cl. difficile* (69.98–95.26%) did in options with surfactants added. The largest relative numbers of pathogenic *Cl. difficile* (95.26%) were observed in the option with the addition of a cationic surfactant (benzalkonium chloride).

Keywords: *Clostridium*, surfactants, sulfuric acid, manure effluents, microbiota of manure effluents

Ethics approval and consent to participate: This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

✉ *Corresponding author.* Department of Fundamental Chemistry and Methods of Teaching Chemistry, Vyatka State University, Russia.

ORCID and e-mail addresses: Nadezhda V. Syrchina: <https://orcid.org/0000-0001-9695-7146>, nvms1956@mail.ru; Larisa V. Pilip: <https://orcid.org/0000-0001-8049-6760>, pilip_larisa@mail.ru; Ekaterina P. Kolevatykh: <https://orcid.org/0000-0001-6147-3555>, hibica@mail.ru; Tamara Ya. Ashikhmina: <https://orcid.org/0000-0003-4919-0047>, ecolab2@gmail.com.

For citation: Syrchina N. V., Pilip L. V., Kolevatykh E. P., Ashikhmina T. Ya. Effect of various processing methods on the numbers of *Clostridium* (Clostridia, Bacteria) in animal by-products. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2023, no. 4, pp. 466–480 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-4-466-480>

REFERENCES

- Garays M. Cold-tolerant bacteria *Clostridium estertheticum* and spoilage of beef in vacuum packaging. *Vsyo o myase*, 2011, no.6, pp. 7–9 (in Russian).
- GOST 31744-2012. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Clostridium perfringens Colony-count Technique*. Moscow, Standardinform, 2014. 16 p. (in Russian).
- GOST R 70152-2022. *Water Quality. Methods of Internal Laboratory Quality Control for Conducting Microbiological and Parasitological Studies*. Moscow, Russian Institute of Standardization, 2022. 58 p. (in Russian).
- Dzhavadov E. D., Novikova O. B., Zhenikhova N. I., Bezborodova N. A. Clostridium. *Bio*, 2020, no. 6, pp. 25–31 (in Russian).
- Kolevatykh E. P., Pilip L. V., Syrchina N. V., Kozvonin V. A. Transformation of the microbiota of animal husbandry waste under the influence of chemical reagents to eliminate odor. *Theoretical and Applied Ecology*, 2022, no. 4, pp. 159–165 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-4-159-165>
- Mironov V. V., Khmyrov V. D. Influence of active aeration on the intensity of biothermal processes in the composted mixture. *Bulletin of the Tambov State Technical University*, 2002, no. 4, pp. 668–672 (in Russian).
- Pilip L.V., Syrchina N. V. Evaluation of the effectiveness of various drugs to reduce odor pollution of the environment with pig waste. *Actual Problems of Intensive Development of Animal Husbandry*, 2022. no. 25-2, pp. 206–215 (in Russian).
- Pilip L. V., Syrchina N. V. The importance of microorganisms-ammonifiers of manure effluents in the emission of ammonia. *KSTU News*, 2023, no. 68, pp. 46–54 (in Russian). <https://doi.org/10.46845/1997-3071-2023-68-46-54>
- Pilip L. V., Kozvonin V. A., Syrchina N. V., Kolevatykh E. P., Ashikhmina T. Ya. Effects of acidifying manure effluent on its microbiological characteristics. *Theoretical and Applied Ecology*, 2020, no. 3, pp. 161–167 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-3-161-167>
- Pilip L. V., Syrchina N. V., Kozvonin V. A., Kolevatykh E. P., Ashikhmina T. Ya., Sazanov A. V. Biological contamination of arable land with pig waste. *Theoretical and Applied Ecology*, 2022, no. 3, pp. 199–205 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-3-199-205>
- Pilip L. V., Syrchina N. V., Kolevatykh E. P. Safety assessment of regenerated litter obtained at the filtration and drying plant. *Russian Journal of Applied Ecology*, 2023, no. 1(33), pp. 45–51 (in Russian). <https://doi.org/10.24852/2411-7374.2023.1.45.51>
- Syrchina N. V., Pilip L. V., Kolevatykh E. P., Ashikhmina T. Ya. Control of odor pollution of atmospheric air (review). *Theoretical and Applied Ecology*, 2022, no. 2, pp. 22–34 (in Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-2-026-034>
- Syrchina N. V., Pilip L. V., Kolevatykh E. P., Ashikhmina T. Ya., Kuznetsov D. A. Effect of sodium hypochlorite on the microbiota and odor of manure effluents. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2023, no. 1, pp. 107–116 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-1-107-116>
- Shelygin Yu. A., Aleshkin V. A., Sukhina M. A., Mironov A. Yu., Briko N. I., Kozlov R. S., Zverev V. V., Achkasov S. I., Kovalishena O. V., Selkova E. P., Safin A. L., Grenkova T. A., Khalif I. L., Frolov S. A., Kashnikov V. N., Sushkov O. I. Clinical recommendations of the National association of specialists for the healthcare-related infections control and the Russian association of coloproctology on diagnosis, treatment and prophylaxis of clostridium difficile – associated diarrhea (CDI). *Koloproktologia*, 2018, no. 3, pp. 7–23 (in Russian). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2018-0-3-7-23>

Bagge E., Persson M., Johansson K. E. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, vol. 109, no. 5, pp. 1549–1565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04790.x>

Blau K. Manure and doxycycline affect the bacterial community and its resistome in lettuce rhizosphere and bulk soil. *Frontiers in Microbiology*, 2019, vol. 10, article number 725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00725>

Brunt J., van Vliet A. H., Carter A. T., Stringer S. C., Amar C., Grant K. A., Godbole G., Peck M. W. Diversity of the genomes and neurotoxins of strains of *Clostridium botulinum* group I and *Clostridium sporogenes* associated with foodborne, infant and wound botulism. *Toxins*, 2020, vol. 12, iss. 9, article number 586. <https://doi.org/10.3390/toxins12090586>

Hailegebreal G. A review on *Clostridium perfringens* food poisoning. *Global Research Journal of Public Health and Epidemiology*, 2017, vol. 4, no. 3, pp. 104–109.

Keis S., Shaheen R., Jones D. T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, vol. 51, iss. 6, pp. 2095–2103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2095>

Leggett M. J. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, vol. 113, iss. 3, pp. 485–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x>

Leja K., Myszyńska K., Czaczyk K. The ability of *Clostridium bifementans* strains to lactic acid biosynthesis in various environmental conditions. *SpringerPlus*, 2013, vol. 2, article number 44. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-44>

Liu X., Zhu Y., Yang S. T. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, vol. 38, iss. 3–4, pp. 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.008>

Neuhaus J., Schrödl W., Shehata A. A., Krüger M. Detection of *Clostridium botulinum* in liquid manure and biogas plant wastes. *Folia Microbiologica*, 2015, vol. 60, iss. 5, pp. 451–456. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0381-3>

Paredes-Sabja D., Setlow P., Sarker M. R. Role of GerKB in germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, vol. 75, iss. 11, pp. 3813–3817.

Reddy R. M., Reddy P. G., Seenayya G. Enhanced production of thermostable β -amylase and pullulanase in the presence of surfactants by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. *Process Biochemistry*, 1999, vol. 34, iss. 1, pp. 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00073-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00073-9)

Sandhu B. K., McBride S. M. *Clostridioides difficile*. *Trends in Microbiology*, 2018, vol. 26, iss. 12, pp. 1049–1050. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.004>

Scott A., Tien Y. C., Drury C. F., Reynolds W. D., Topp E. Enrichment of antibiotic resistance genes in soil receiving composts derived from swine manure, yard wastes, or food wastes, and evidence for multiyear persistence of swine *Clostridium* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, vol. 64, iss. 3, pp. 201–208. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0642>

Valero A., Olague E., Medina-Pradas E., Garrido-Fernández A., Romero-Gil V., Cantalejo M. J., García-Gimeno R. M., Pérez-Rodríguez F., Posada-Izquierdo G. D., Arroyo-López F. N. Influence of acid adaptation on the probability of germination of *Clostridium sporogenes* spores against pH, NaCl and time. *Foods*, 2020, vol. 9, iss. 2, article number 127. <https://doi.org/10.3390/foods9020127>

Whitehead T. R., Price N. P., Drake H. L., Cotta M. A. Catabolic pathway for the production of skatole and indoleacetic acid by the acetogen *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, and swine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, vol. 74, iss. 6, pp. 1950–1953. <https://doi.org/10.1128/AEM.02458-07>