

На правах рукописи

Сидоренко Марина Леонидовна

**ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
ПОЧВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ НА РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ  
ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ**

03.00.27 - Почвоведение  
03.00.07 - Микробиология

**А в т о р е ф е р а т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток - 2003

Работа выполнена в лаборатории почвоведения и экологии почв Биолого-почвенного института ДВО РАН и в лаборатории экологии патогенных бактерий НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН.

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор  
Костенков Николай Максимович;

доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Бузолева Любовь Степановна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,  
старший научный сотрудник  
Шубин Феликс Николаевич;

кандидат биологических наук, доцент  
Тихонова Татьяна Ивановна

Ведущая организация: Институт общей и экспериментальной биологии  
СО РАН

Защита диссертации состоится 17 февраля 2004г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.003.01 при Биолого-почвенном институте ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, тел/факс: (4232)310-193.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН.

Автореферат разослан " 12" января 2004г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Л. Н. Пуртова

**Актуальность.** В настоящее время накоплено большое количество фактов, свидетельствующих о принципиальной возможности сапрофитного существования патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды (Ганнушкин, 1952; Терских, 1958; Беляков, 1964; Головачева, 1978; Сомов, 1974, 1978, 1985; Литвин, 1976, 1986а, 1986б; Weiss J., Seeliger H., 1975; DeFlaun M. F., Paul J. H., 1989; Froun A., 1989). Особенный интерес в этом плане вызывают возбудители инфекционных болезней, которые длительно выживают в почве, воде, растительных субстратах и для которых утвердился термин сапрозоонозы (Сомов, Литвин, 1988).

К таким микроорганизмам относят *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis*, одной из сред обитания которых являются почвы. Возможность существования патогенных бактерий в различных почвах доказана и подробно изучена многими исследователями (Красильников, 1958б; Крисс, 1959; Аристовская, 1965, 1980; Мишустин, 1975; Звягинцев, 1978; Мишустин и др., 1979; Ген Хак Мун, 1983; Smyk et al., 1986). Но, факторы, влияющие на рост и размножение таких бактерий в различных типах почв с постоянно меняющимися параметрами среды только сейчас становятся объектом исследования.

Патогенные микроорганизмы, попадая в почву, становятся полноправными членами сложных почвенных экосистем, вступая в различные взаимодействия с другими компонентами почвенной биоты (Литвин, 1991; Литвин, 1992). Безусловно, в такой сложной биокосной системе как почва процессы размножения бактерий не могут зависеть от действия только одного фактора. Динамика численности микроорганизмов представляет собой процесс, обусловленный с одной стороны, микробными взаимоотношениями, имеющими место в почве (регулирующие факторы), с другой стороны свойствами самой почвы и влиянием таких динамичных факторов, как температура, влажность, наличие питательных веществ. Суммарное действие динамичных и регулирующих факторов определяет происходящие в почве изменения численности микроорганизмов. Но, тем не менее, изучение влияния отдельных факторов на размножение бактерий в почве является немаловажным, так как способствует раскрытию механизмов этого явления. Исследования в данном направлении позволяют выявить закономерности распространения возбудителей сапрозоонозных инфекций в почвах различного вещественного состава и обладающих разными физико-химическими свойствами.

**Цель и задачи исследований.** Целью работы являлось изучение влияния абиотических и биотических почвенных факторов на размножение *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* в генетически различных типах почв.

В задачи исследований входило:

- Изучить физико-химические, химические характеристики и гумусовый состав различных типов почв автоморфного и гидроморфного ряда, и их влияние на размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*;
- определить зависимость роста и размножения листериозного и псевдотуберкулезного микробов от внесения минеральных удобрений в почву;
- выявить влияние летучих метаболитов сапрофитной микрофлоры почв на размножение различных штаммов *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*;

- показать влияние летучих метаболитов прорастающих семян растений на динамику роста различных штаммов *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*.

**Научная новизна.** Впервые показано, что жизнеспособность возбудителей сапрозоонозных инфекций в почвенных биоценозах зависит от типа почв и их свойств.

В результате проведенных исследований выявлены особенности различных типов почв автоморфного (бурые лесные и буро-подзолистые) и гидроморфного (маршевые и маритимные луговые) ряда, а также почвогрунтов городских газонов, определяющие сохранение и размножение патогенных бактерий, в частности, *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*. Впервые показана возможность сохранения и размножения *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* в почвах морского побережья (зона пляжей и отдыха). Установлено, что свойства почвы, ее физико-химические характеристики, гумусовый состав, минеральные удобрения вносимые в почву влияют на выживаемость и размножение возбудителей сапрозоонозных инфекций в различных типах почв.

Впервые показано, что летучие вещества, выделяемые сапрофитной микрофлорой, оказывают влияние на рост и размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* в почвенных экосистемах. Экспериментально доказано, что летучие метаболиты прорастающих семян стимулируют рост и размножение патогенных бактерий, обитающих в почвах. При этом выявлено, что фракция метанола в составе летучих метаболитов сапрофитной микрофлоры, а также прорастающих семян растений наиболее активно стимулирует размножение листерий и иерсиний.

**Практическая значимость.** Полученные данные могут быть использованы для проведения профилактических противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения вспышек листериоза и псевдотуберкулеза, возбудителями, которых являются *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*, соответственно.

С целью более полного выявления и учета внеорганизменных популяций листерий, обитающих в почве и растениях, предложен способ приготовления питательной среды для культивирования и количественного учета листерий (*Listeria monocytogenes*) в объектах внешней среды. Заявка на изобретение № 2003100580 от 08.01.2003 г.

Сконструирована установка для изучения влияния летучих метаболитов растений на размножение бактерий (удостоверение на рационализаторское предложение № 15, НИИ ЭМ СО РАМН, от 21.05.1999г), которая применяется в научных целях при проведении исследований в лаборатории экологии патогенных микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН.

**Защищаемые положения:**

1. *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* способны к активному размножению в природных и антропогенно измененных почвенных экосистемах в зависимости от параметров внешней среды, физико-химических свойств почв и штаммовых характеристик бактерий.
2. Летучие вещества, выделяемые в окружающую среду сапрофитной микрофлорой почв, оказывают влияние на рост и размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* в почвенных экосистемах.

3. Летучие метаболиты прорастающих семян растений, являющихся факторами передачи листериозного и псевдотуберкулезного микробов, стимулируют их рост и размножение.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены на региональной конференции по актуальным проблемам морской биологии и экологии (Владивосток, 1998), второй региональной конференции по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии (Владивосток, 1999), на III Съезде Докучаевского общества почвоведов (11-15 июля 2000 г., Суздаль), на конференции-конкурсе молодых ученых БПИ ДВО РАН (Владивосток, 2001), на Тихоокеанской медицинской конференции (Владивосток, 2001), на межрегиональной научно-практической конференции "Актуальные аспекты природно-очаговых болезней" (Омск, 2001), на I Международной школе "Микробиологическая индикация и ремедиация" (Морская биологическая станция "Восток", 2002), на международной научно-практической конференции "Геоэкологические проблемы почвоведения и оценки земель" (Томск, 2002), на международной научно-практической конференции "Приоритет России XXI века: от биосферы и техносферы к ноосфере" (Пенза, 2003), микробиологическом симпозиуме: Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии на Дальнем Востоке "Дальний Восток: ресурсный потенциал в начале III тысячелетия" (Владивосток, 2003), научной конференции "Генезис, классификация и экологическое состояние почв Дальнего Востока России" (Владивосток, 2003).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, отраженных в четырех главах, выводов, списка литературы. Работа изложена на 147 страницах, иллюстрирована 9 таблицами и 21 рисунком. Список литературы включает 269 источников, из которых 195 отечественных и 74 иностранных авторов.

## Содержание работы

### Глава 1. Обзор литературы

В данной главе освещены следующие вопросы: почва как среда обитания микроорганизмов, размножение патогенных бактерий в почвах, экологические особенности сапрозоонозов, размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* в почвах, сообщества бактерий в почвенных экосистемах.

### Глава 2. Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использованы образцы почв автоморфного ряда: почвы суббореального пояса наиболее распространенных на юге Дальнего Востока - бурые лесные (лесной массив в предгорьях Сихотэ-Алиня) и буропodzолистые (пашня, капустное поле); а также образцы почв гидроморфного ряда: почвы морских побережий - маршевая и маритимная луговая (побережье залива Петра Великого); и почвогрунт (городские газоны). Все образцы отбирали из верхнего (0-10 см) горизонта.

При проведении экспериментальных исследований использованы штаммы *Listeria monocytogenes* ("П", "А", "К", 10CN, 1А, 4В, 1В, 1С, 3А, 4А, 4С, 5, 6, 7, 74-Т, 88, 10527, 2755, 75936, 5105) и *Yersinia pseudotuberculosis* (158, 282, 512, 907, Н-

2781, Н-3515, Н-557, Н-4784, Н-4783, Н-4782, Н-4781, Н-4780, Н-4786, Н-4785, Н-4788, Н-4787, Н-4789), которые были типичны по своим культуральным, серологическим и биохимическим свойствам. Штаммы листерий получены из Всероссийского государственного контрольного института ветпрепаратов (г. Москва), штаммы иерсиний - из музея Всероссийского центра по иерсиниозам и псевдотуберкулезу (НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток).

В исследованиях использованы также штаммы сапрофитных бактерий, выделенные нами из естественно сложившейся микробной ассоциации буро-подзолистой и бурой лесной почв. Всего выделено 56 штаммов, 20 из которых отнесены к родам: *Acinetobacter* (2 штамма), *Aeromonas* (4 штамма), *Micrococcum* (2 штамма), *Pseudomonas* (7 штаммов), *Bacillus* (3 штамма), *Flavobacterium* (2 штамма). Для выявления наибольшего количества видового разнообразия бактерий выделение производили с помощью голодного, растительного и питательного агаров путем высева на них 1% почвенной суспензии. Идентификацию штаммов выделенных микроорганизмов проводили согласно Определителю бактерий Берджи (1997) с использованием совокупности классических методов: бактериоскопического, бактериологического, биохимического и серологического. Биохимическую активность бактерий определяли на средах Гисса и с помощью АРІ-тестов производства bioMerieux (Франция). Идентификацию некоторых полученных штаммов проводили в лаборатории микробиологии Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН.

В почвенных образцах проведены следующие определения: гумус по Тюрину, групповой состав гумуса по Тюрину в модификации Пономаревой и Плотниковой (Орлов, Гришина, 1981), актуальная кислотность, состав почвенного поглощающего комплекса, обменная кислотность, гидролитическая кислотность, обменные основания ( $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ), емкость катионного обмена (Аринушкина, 1971). Препараты гуминовых кислот получены по общепринятой методике (Практикум по почвоведению, 1980).

Изучение кинетики роста *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* при температурах 20-22<sup>0</sup>С и 4-6<sup>0</sup>С в различных средах (почвы различных типов, почвогрунт, почвы с удобрениями, гуминовые препараты, вытяжки гумусовых кислот, летучие выделения прорастающих семян) проводили при периодическом культивировании. Для построения кривой роста бактерий использовали чашечный метод Коха.

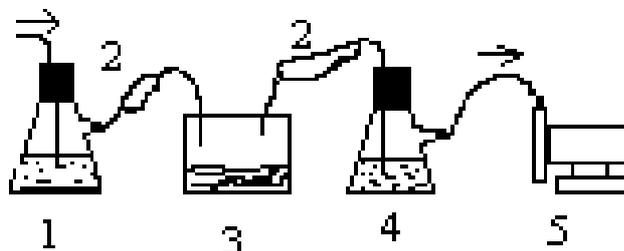
Для количественной оценки действия летучих биологически активных веществ, продуцируемых сапрофитной микрофлорой почв на рост патогенных бактерий использовали метод Л. С. Тирранен (1989).

Для изучения влияния летучих выделений прорастающих семян на рост и размножение патогенных бактерий за основу взят метод, предложенный О. А. Берестецким с сотрудниками (1981). В опыте использовали семена салата, укропа, капусты, кукурузы. Для проведения эксперимента сконструирована специальная установка ("Установка для изучения влияния летучих метаболитов бактерий на размножение растений" № 15 от 21.05. 1999г) (рис.1).

Газожидкостный хроматографический анализ (ГЖХ) летучих метаболитов сапрофитных бактерий и прорастающих семян проводили на газовом хроматографе "Shimadzu-16А" (ТИНРО - центр). Определение качественного состава летучих органических веществ производилось путем сравнения полученных хроматографиче-

ских пиков с пиками, полученными при хроматографическом анализе чистых летучих органических веществ (эталонов) без каких-либо примесей.

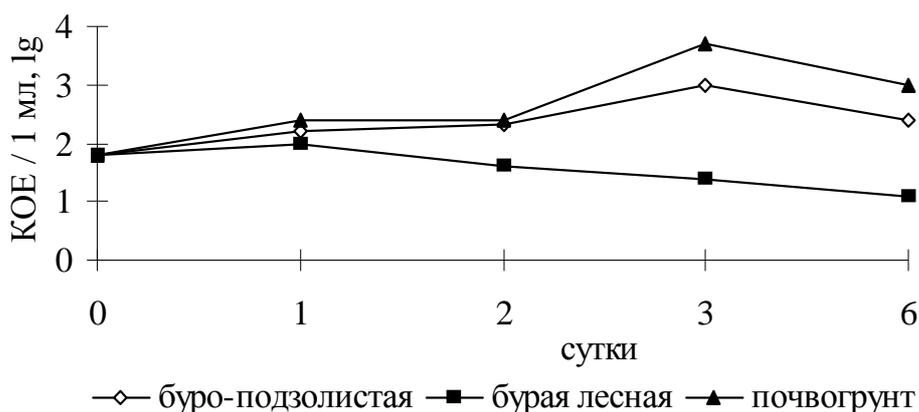
Все цифровые данные, полученные в результате исследований, подвергали статистической обработке с использованием компьютерных программ Statistic, Excel.



**Рис. 1.** Установка для изучения влияния летучих метаболитов. 1 - сосуд с 30% KOH, 2 - ватный фильтр, 3 - сосуд с почвой и прорастающими семенами, 4 - колба с физ. раствором, инокулированным бактериями, 5 - насос.

### Глава 3. Влияние абиотических факторов на размножение патогенной микрофлоры в автоморфных почвах

В результате экспериментов установлено, что сохранение и размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* в почвах зависит от типа исследуемых почв, биологических свойств штаммов и температуры культивирования (рис. 2). Более активное размножение большинства исследуемых штаммов бактерий наблюдали на субстрате почвогрунта и буро-подзолистой почве. Исключение составил штамм "К" *L. monocytogenes* и штамм 2781 *Y. pseudotuberculosis*. Как листерии, так и иерсинии размножались более интенсивно при температуре 20-22<sup>0</sup>С, тогда как при 4-6<sup>0</sup>С активность размножения была ниже в среднем на 0,5 lg.



**Рис. 2.** Динамика размножения *Y. pseudotuberculosis* шт. 282 при температуре 20-22С.

Судя по данным, представленным в таблице 1, можно предположить, что кислотность оказывает влияние на размножение исследуемых бактерий. Так, значения рН почвогрунта (6,6) и буро-подзолистой почвы (7,4) наиболее близки к оптимуму, который лежит в пределах рН 6,8-7,3 для иерсиний (Максименкова, Литвин, 1985) и

pH 7,0 - 7,4 для листерий (Гершун, 1988). Кислотность бурой лесной почвы (pH 5,8) наименее пригодна для данных бактерий, поэтому большинство штаммов практически не размножались в указанной почве.

**Таблица 1.** Физико-химические и химические свойства почв.

| Почвы            | pH                 |      | Обменная кислотность | Гидролитическая кислотность | Емкость катионного обмена | Обменные основания |                  | Степень насыщенности основаниями, % |
|------------------|--------------------|------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------|-------------------------------------|
|                  | H <sub>2</sub> O   | KCl  |                      |                             |                           | Ca <sup>2+</sup>   | Mg <sup>2+</sup> |                                     |
|                  | мг экв/ 100г почвы |      |                      |                             |                           |                    |                  |                                     |
| Бурая лесная     | 5,85               | 5,00 | 3,25                 | 7,20                        | 44,70                     | 30,3               | 7,5              | 83,9                                |
| Буро-подзолистая | 7,36               | 6,36 | 1,15                 | 1,74                        | 80,74                     | 65,1               | 14,2             | 97,8                                |
| Почвогрунт       | 6,60               | 5,58 | 1,53                 | 2,88                        | 45,88                     | 35,2               | 8,1              | 93,7                                |

Кроме того, бурая лесная почва имеет более высокие, по сравнению с почвогрунтом и буро-подзолистой почвой, значения обменной и гидролитической кислотности, что определяется степенью насыщенности основаниями, а также наименьшее значение обменных оснований (табл. 1), что также может угнетать рост листерий и иерсиний (Работнова, Позмогова, 1994).

Буро-подзолистая почва, где наблюдается размножение большинства исследуемых штаммов бактерий, на протяжении длительного времени использовалась в сельском хозяйстве и обрабатывалась как механически, так и химически. Вероятно, поэтому в почвенном поглощающем комплексе данной почвы обнаруживается больше обменных оснований, особенно ионов кальция и магния. Установлено, что емкость катионного обмена (ЕКО) буро-подзолистой почвы выше, чем в других исследуемых почвах, что связано с более высокими концентрациями ионов кальция и магния, которые являются жизненно необходимыми для нормального роста и размножения иерсиний и листерий (Работнова, Позмогова, 1994).

Поскольку физико-химические и химические свойства не позволили объяснить размножение патогенных бактерий в почвогрунте, был исследован гумусовый состав почв. Как видно из данных, представленных в таблице 2, наибольшее содержание общего углерода приходится на почвогрунт, что, возможно, положительно сказывается на размножении исследуемых бактерий. Кроме того, здесь обнаружено наименьшее количество фульвокислот первой агрессивной фракции, что также влияет на размножение листерий и иерсиний, так как известно, что фульвокислоты указанной фракции могут тормозить рост бактерий (Комиссаров, Виленский, 1971; Бузолева, 1990).

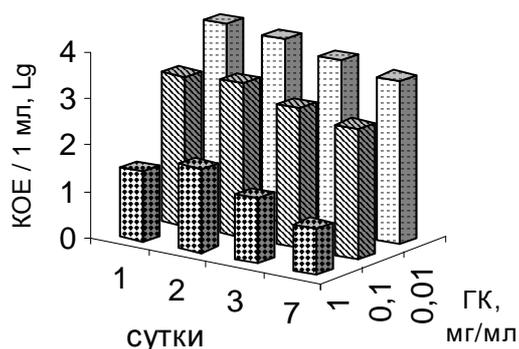
В почвогрунте обнаружено наименьшее, по сравнению с другими почвами, взятыми для эксперимента, суммарное количество фракций гумусовых кислот, чрезмерное количество которых, возможно, отрицательно сказывается на размножении листерий и иерсиний. В связи с этим был поставлен эксперимент по изучению влияния

**Таблица 2.** Групповой состав гумуса (в % от общего углерода почвы)

| Типы почв        | С, % | Фракции гуминовых кислот |       |       |       | Фракции фульвокислот |      |       |       |       | Сгк + Сфк | Сгк / Сфк | Гумин |
|------------------|------|--------------------------|-------|-------|-------|----------------------|------|-------|-------|-------|-----------|-----------|-------|
|                  |      | 1                        | 2     | 3     | Σ     | 1a                   | 1    | 2     | 3     | Σ     |           |           |       |
| Бурая лесная     | 1,1  | 12,73                    | 13,63 | 15,54 | 41,90 | 5,45                 | 1,82 | 24,54 | 8,90  | 40,71 | 82,61     | 1,1       | 17,39 |
| Буро-подзолистая | 2,6  | 6,11                     | 25,95 | 16,84 | 48,90 | 5,72                 | 5,35 | 3,05  | 14,84 | 28,96 | 77,86     | 1,7       | 22,14 |
| Почвогрунт       | 4,5  | 3,10                     | 9,73  | 16,37 | 29,20 | 2,21                 | 2,29 | 13,50 | 2,88  | 20,88 | 50,08     | 1,4       | 49,92 |

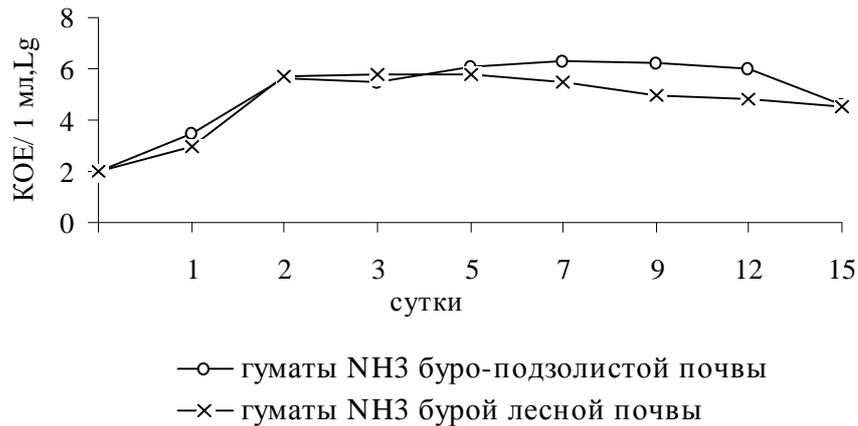
Примечание: Σ - сумма фракций

концентраций гумусовых кислот на размножение патогенных бактерий, который показал, что исследуемые штаммы бактерий наиболее активно размножались на низких концентрациях гумусовых кислот (0,01%). При этом прирост бактерий увеличивался на 3,5-4,0 lg по сравнению с исходным количеством. Более высокие концентрации тормозили их рост (рис. 3).



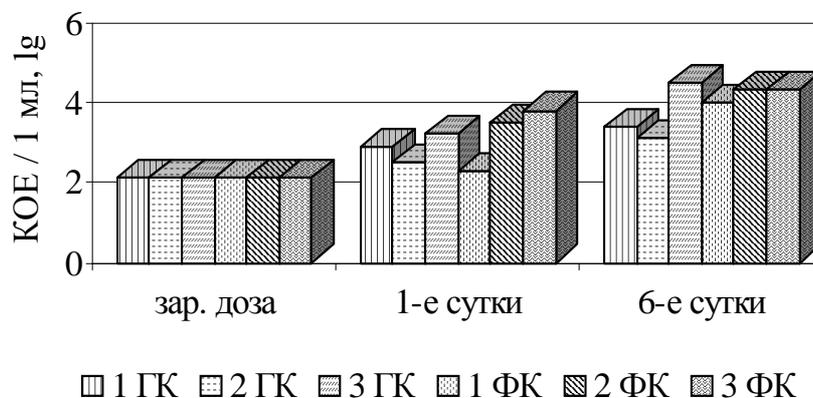
**Рис. 3.** Зависимость размножения *L. monocytogenes* (штамм "П") от концентрации гумусовых кислот. ГК - гуминовые кислоты.

Поскольку было выяснено, что размножение исследуемых бактерий зависит от количества гумусовых кислот, присутствующих в почвах, нас заинтересовала зависимость размножения листерий и иерсиний от качественного состава гумусовых кислот. В ходе дальнейших исследований были получены препараты гуминовых кислот в виде гуматов аммония и изучена их биологическая активность в отношении листерий и иерсиний. В результате проведенных экспериментов удалось установить, что гуминовые кислоты способствуют активному размножению патогенных бактерий, независимо от того из каких почв они выделены (рис. 4). Дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния фракций гуминовых кислот бурой лесной, буро-подзолистой почв и почвогрунта на размножение различных штаммов *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*. Для чего были использованы вытяжки гуминовых и фульвокислот, кроме первой "агрессивной" фракции фульвокислот, рН которой (2,5-2,8) губителен для роста листерий и иерсиний. Кислотность всех



**Рис. 4.** Динамика размножения *Y. pseudotuberculosis* шт. 512 на гуминовых препаратах почв.

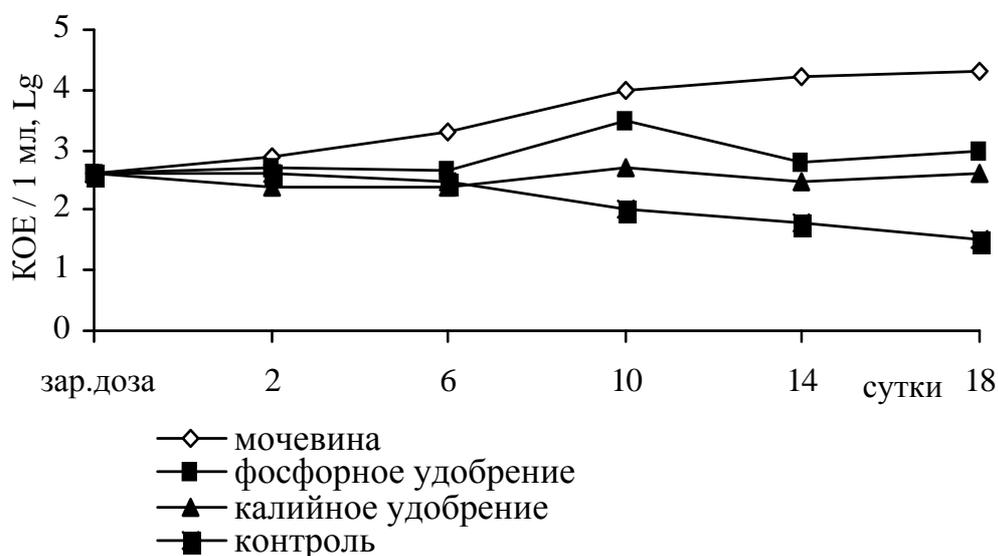
остальных вытяжек фракций гуминовых и фульвокислот находилась в пределах (рН 6-8) допустимых для роста и размножения исследуемых бактерий. По результатам опыта отмечено, что гуминовые и фульвокислоты обладают биологической активностью в отношении листерий и иерсиний. Показано, что характер процесса размножения исследуемых бактерий на различных фракциях гуминовых кислот всех почв, взятых в эксперимент, был одинаков, т.е. не зависел от типа почв. Но наблюдали различия в динамике размножения патогенных бактерий на фракциях гуминовых кислот выделенных из разных типов почв. Так, фракции фульвокислот более активно стимулировали рост листерий, чем фракции гуминовых кислот не зависимо от типа почв (рис. 5). Иерсинии размножались на всех фракциях гумусовых кислот практически одинаково. Размножение исследуемых бактерий зависело от вида бактерий, характеристик штаммов и температуры культивирования, но не зависело от типа почв, из которых были выделены фракции гуминовых и фульвокислот. Установлено, что наиболее активное положительное влияние на размножение листерий



**Рис. 5.** Рост *L. monocytogenes* шт. П на различных фракциях гумусовых кислот почвогрунта при 20-22С. ГК -гуминовые кислоты, ФК - фульвокислоты.

всех исследуемых штаммов оказывала фракция 3 гуминовых кислот. Это можно объяснить наличием глинистых минералов, с которыми связана данная фракция что, согласуется с данными, полученными А. М. Комиссаровым с сотрудниками (1971).

Известно, что наиболее часто листерии и иерсинии выделяют из сельскохозяйственных культур и пахотных почв (Кузнецов, 1983; Гершун, 1988), которые, как правило, удобряются. Поэтому исследовали влияние минеральных удобрений (азотного -  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , фосфорного -  $\text{Ca}_2\text{HPO}_4$ , калийного -  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) на рост и размножение этих бактерий. В результате экспериментов установлено, что вносимые в почву удобрения оказывают положительное влияние на рост и размножение иерсиний и листерий (рис. 6). По степени активности размножения исследуемых бактерий на почвах с удобрениями независимо от типа почв можно построить следующий ряд: почва с азотным удобрением > почва с фосфорным удобрением > почва с калийным удобрением.



**Рис. 6.** Динамика размножения *L. monocytogenes* шт. "П" при 4-6<sup>0</sup>С в буро-подзолистой почве с разными видами удобрений

Так, внесение минеральных удобрений в бурую лесную почву способствовало увеличению максимальной концентрации исследуемых бактерий на 3-4 lg по сравнению с почвой без удобрений. Очевидно, что в данном случае значительную роль играет кислотность среды этого типа почв, которая имеет низкие значения для размножения листерий - 5,85. Дополнительное внесение удобрений в эту почву увеличивает рН среды до оптимальных значений для роста исследуемых бактерий. Можно предположить, что внесение в почву фосфорного и азотного удобрений положительно сказывается на росте и размножении иерсиний и листерий, поскольку при этом выдерживаются оптимальные значения рН для размножения этих бактерий (рН 7,4-7,8) (табл. 3). Менее благоприятно для роста листерий присутствие калийного удобрения, сильно подщелачивающего почву (рН до 10). Известно, и то, что азот и фосфор являются исключительно важными биогенными элементами для роста и развития микроорганизмов. Кроме того, внесение минеральных удобрений усиливает минерализационную деятельность микроорганизмов, что приводит к разложению органического вещества почвы (Михновская, 1981; Щапова, 1994) в результате чего

увеличивается количество ионов кальция и магния, которые являются необходимыми для нормального роста любых микроорганизмов (Работнова, Позмогова, 1994).

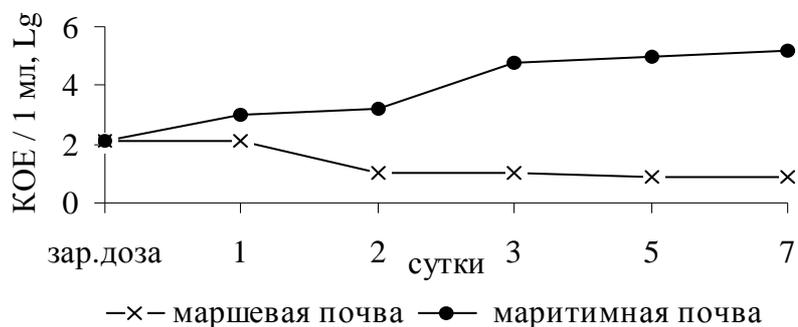
**Таблица 3.** Изменение кислотности почв при внесении минеральных удобрений.

| Тип почвы        | рН почв       |  |   |                                       |
|------------------|---------------|--|---|---------------------------------------|
|                  | Без удобрения | с добавлением $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ | с добавлением $\text{Ca}_2\text{HPO}_4$ | с добавлением $\text{K}_2\text{CO}_3$ |
| Бурая лесная     | 5,85          | 7,81                                     | 7,50                                    | 9,97                                  |
| Буро-подзолистая | 7,36          | 7,41                                     | 7,49                                    | 8,31                                  |

Обобщая полученные данные, следует отметить, что размножение листериозного и псевдотуберкулезного микробов в автоморфных почвах и почвогрунтах городских газонов зависит от степени насыщенности основаниями, емкости катионного обмена, количества и качества гумуса, а так же от штаммовых свойств бактерий и температуры среды. Исследуемые образцы почв можно расположить по степени положительного влияния на рост и размножение патогенных бактерий: почвогрунт > буро-подзолистая > бурая лесная

#### Глава 4. Размножение патогенных бактерий в почвах морского побережья.

По результатам исследования почв морского побережья установлено, что все взятые в эксперимент штаммы *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* наиболее активно размножались в маритимной почве, где их концентрация увеличивалась на 3,2 lg в сравнении с исходной (рис. 7). В маршевой почве наблюдалось менее интенсивное размножение бактерий, увеличение численности которых не превышало 1,6 lg в сравнении с исходной. При этом иерсинии во всех вариантах опыта размножались более интенсивно, чем листерии. Кроме того, размножение бактерий в почвах морского побережья зависело от индивидуальных особенностей штамма. Как листерии, так и иерсинии размножались более интенсивно при температуре 20-22<sup>0</sup>С, тогда как при 4-6<sup>0</sup>С активность размножения была ниже в среднем на 0,5 lg.



**Рис. 7.** Динамика размножения *Y. pseudotuberculosis* шт. 907 в почвах морского побережья.

Помимо индивидуальных особенностей штаммов бактерий и температуры культивирования на размножение листерий и иерсиний в почвах морского побережья оказывает влияние свойства самих почв. По величине рН водной вытяжки маршевая почва является слабокислой, а маритимная - нейтральной (табл. 4). Такие

щелочно-кислотные условия среды благоприятны для роста *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*. Поэтому в маритимной почве листерии и иерсинии размножаются более активно, чем в маршевой.

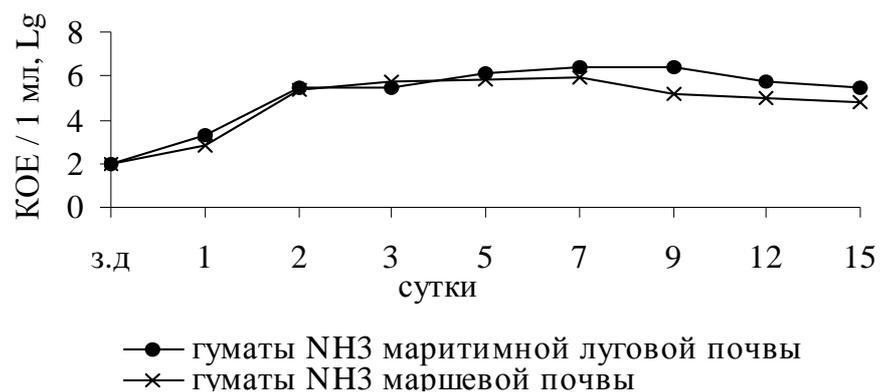
**Таблица 4.** Физико-химические и химические свойства почв морского побережья.

| Почвы      | рН                 |      | Обменная кислотность | Гидролитическая кислотность | Обменные основания, |                  | Емкость катионного обмена | Степень насыщенности основаниями, % | Гумус, % |
|------------|--------------------|------|----------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------|
|            | H <sub>2</sub> O   | KCl  |                      |                             | Ca <sup>2+</sup>    | Mg <sup>2+</sup> |                           |                                     |          |
|            | мг экв/ 100г почвы |      |                      |                             |                     |                  |                           |                                     |          |
| Маршевая   | 6,01               | 5,20 | 0,10                 | 0,95                        | 3,74                | 2,09             | 6,78                      | 85,99                               | 2,06     |
| Маритимная | 6,76               | 6,08 | 0,16                 | 5,83                        | 31,2                | 9,05             | 46,08                     | 87,35                               | 5,43     |

Кроме того, маритимная почва имеет более высокие показатели емкости катионного обмена, чем маршевая почва, а, следовательно, и более высокие концентрации ионов кальция и магния, которые являются необходимыми для нормального роста и размножения патогенных бактерий.

Количество гумуса является одним из лимитирующих факторов при размножении патогенных бактерий в исследуемых почвах. Так, содержание гумуса маршевой почвы составляет 2,1 %, маритимной - 5,4%.

В связи с этим было исследовано влияние качественного состава гумуса почв морского побережья на размножение патогенных бактерий, для чего из исследуемых почв были получены гуминовые препараты. Результаты опыта показали, что *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* достаточно хорошо размножились как на гуматах маритимной луговой почвы, так и на гуматах маршевой почвы (рис. 8).



**Рис. 8.** Динамика роста *Y. pseudotuberculosis* шт. 512 на гуминовых препаратах почв морского побережья.

Обобщая полученные данные, следует отметить, что жизнеспособность и размножение патогенной микрофлоры в почвах морского побережья зависит, также как и в автоморфных почвах, от таких характеристик как степень насыщенности основаниями, емкость катионного обмена, степень гумуссированности, а так же от штаммовых свойств самих бактерий и температуры среды. Преимущество имеют

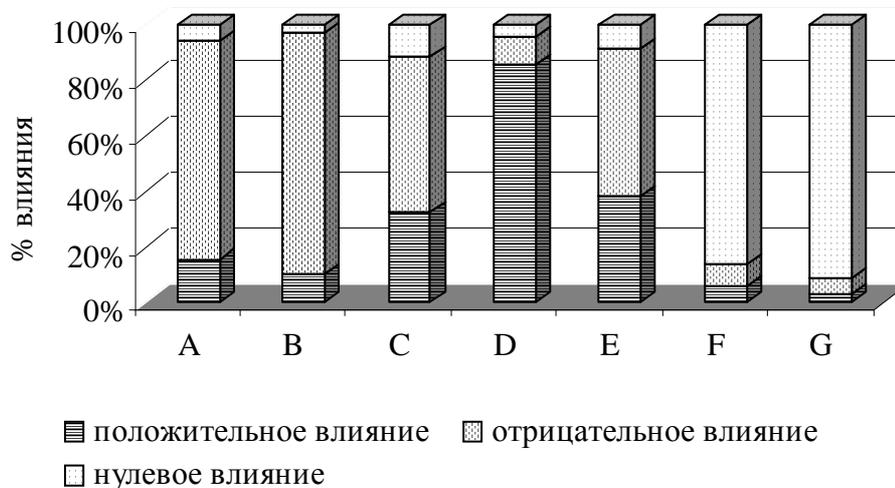
маритимные почвы с нейтральной реакцией среды, достаточным количеством гумуса и относительно высокой степенью насыщенности основаниями. При этом оптимальной для размножения исследуемых бактерий является температура 20-22<sup>0</sup>С. Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности существования и размножения патогенных бактерий в экосистемах морских побережий.

### Глава 5. Влияние биотических факторов почв на размножение патогенных бактерий.

В состав почвенной микрофлоры входит большое разнообразие видов микроорганизмов. Поэтому следовало изучить влияние почвенных бактерий на размножение листерий и иерсиний. С этой целью из естественно сложившихся микробных ассоциаций бурой лесной и буро-подзолистой почв были выделены сапрофитные бактерии, которые отнесены к родам: *Acinetobacter* (2 штамма), *Aeromonas* (4 штамма), *Micrococccus* (2 штамма), *Pseudomonas* (7 штаммов), *Bacillus* (3 штамма), *Flavobacterium* (2 штамма).

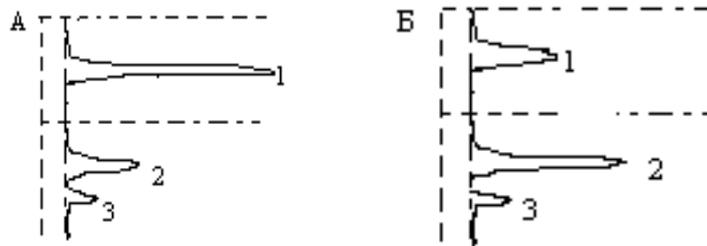
Взаимоотношения в микробном мире, кроме конкурентных трофических связей, проявляются и через метаболиты, выделяемые в окружающую среду микробами в процессе своей жизнедеятельности (Егоров, 1986; Slater, 1981). Известно, что среди метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, есть и летучие вещества (Звягинцев, 1979; Sprecher, Hanssen, 1983). В связи с этим необходимо было рассмотреть влияние летучих метаболитов сапрофитных бактерий на размножение патогенных бактерий.

Полученные данные показали, что летучие метаболиты почвенных бактерий оказывают влияние на размножение листерий и иерсиний через газообразные метаболиты. Из всех исследуемых штаммов сапрофитных бактерий наибольшую ингибирующую активность в отношении листерий и иерсиний проявили бактерии родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Наибольшую стимулирующую активность оказывали летучие метаболиты бактерий рода *Aeromonas* (Рис. 9).



**Рис. 9.** Влияние сапрофитной микрофлоры почв на размножение *Y.pseudotuberculosis*. А - *P. aeruginosa*, В - *P. Fluorescens*, С - *Micrococccus*, D - *Aeromonas*, Е - *Acinetobacter*, F - *Bacillus*, G - *Flavobacterium*

Для выяснения зависимости между размножением исследуемых патогенных бактерий и качественным составом летучих метаболитов сапрофитных бактерий был проведен газохроматографический анализ летучих проб. Определение летучих метаболитов бактерий осуществляли методом газожидкостной хроматографии, который показал, что летучие вещества, выделяемые бактериями родов *Pseudomonas* и *Aeromonas*, содержат в основном ацетальдегид, метанол, этанол (рис. 10). При этом в составе летучих метаболитов аэромонад наблюдалось большее количество метанола, по сравнению с составом летучих метаболитов псевдомонад, что, возможно, объясняет стимуляцию роста в отношении листерий и иерсиний.



**Рис.10.** Хроматограммы летучих метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* (А) и *Aeromonas* (Б). 1-ацетальдегид, 2-метанол, 3-этанол.

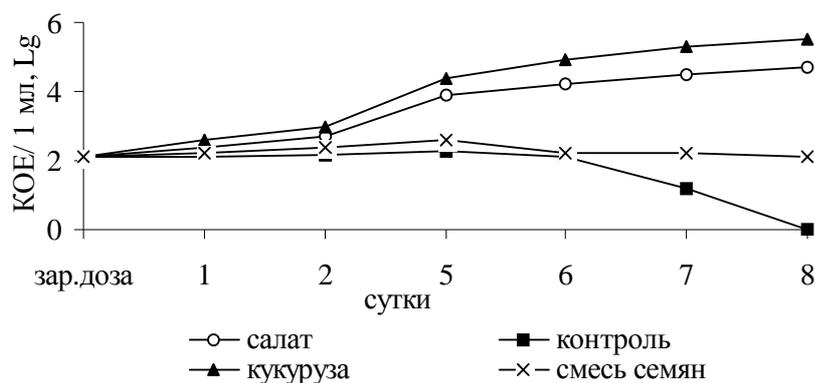
В связи с этим была рассмотрена способность размножения листерий и иерсиний на метаноле при разных температурах (4-6<sup>0</sup>С и 20-22<sup>0</sup>С). Скорость роста бактерий на метаноле зависела от особенностей штамма, концентрации субстрата и температуры. Оптимальными оказались концентрации метанола 0,1-1,0 %, так как более высокие концентрации тормозили рост бактерий. Из всех исследованных штаммов патогенных бактерий наибольшая скорость потребления метанола отмечена у шт. 512 и Н-2781 *Y. pseudotuberculosis* и шт. 10СN *L. monocytogenes*. Данные анализа, показывают, что повышение кривой роста исследуемых бактерий сопровождалось снижением концентрации метанола в культуральной среде, что свидетельствовало об утилизации этого субстрата растущей культурой как листерий, так и иерсиний. Однако удельная скорость роста псевдотуберкулезного микроба на метаноле превышала таковую у листерий в 1,5-2 раза. Оптимальной температурой культивирования исследуемых бактерий на метаноле и усвоения ими этого субстрата оказалась температура 20-22<sup>0</sup>С, тогда как при 4-6<sup>0</sup>С метанол усваивался медленнее, и удельная скорость роста бактерий в логарифмической фазе роста была в 2-3 раза меньше.

Полученные данные позволяют предположить, что на метаболическом уровне прослеживается разный характер межвидовых и родовых взаимоотношений между бактериями, оказывающий прямое влияние на их рост и размножение. В этой связи размножение патогенных бактерий, обитающих в почве, может стимулироваться или угнетаться продуктами метаболизма почвенных микроорганизмов. Большую роль в этом процессе играет метанол, выделяемый сапрофитными бактериями в окружающую среду.

Возможно, что по аналогии с сапрофитными микроорганизмами летучие метаболиты растений также могут оказывать влияние на размножение патогенных бак-

терий и служить им источником углерода и энергии. Поэтому были исследованы летучие метаболиты прорастающих семян культурных растений, являющихся факторами передачи иерсиний - капуста (*Brassica oleacia*), морковь (*Daukus carota*) и листерий - салат (*Zactuca sativa*), кукуруза (*Zea mays L.*).

В первой серии опытов в качестве источника летучих метаболитов брали смесь из семян всех выше приведенных растений. В результате поставленного эксперимента было установлено, что при культивировании патогенных бактерий в присутствии летучих метаболитов прорастающих семян наблюдалось усиление их роста на 1-2 lg по сравнению с контролем (рис.11). При этом, размножение иерсиний превышало размножение листерий в среднем на 2-2,5 lg в течение всех 8 суток эксперимента.

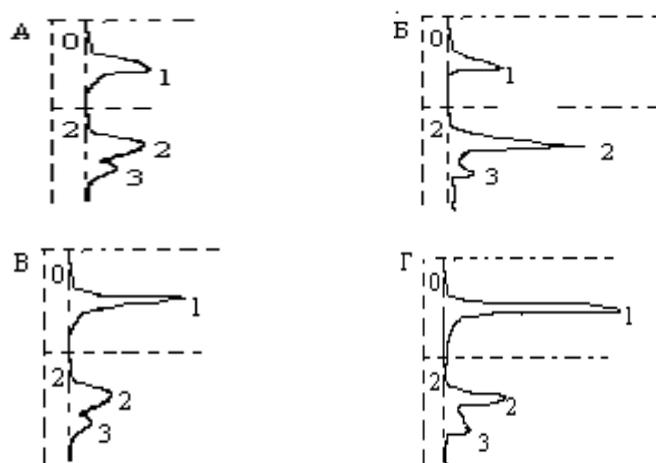


**Рис. 11.** Использование *L. monocytogenes* шт. 10CN летучих выделений прорастающих семян.

Известно, что не все бактерии способны усваивать летучие метаболиты прорастающих семян и специфичность действия летучих органических соединений зависит как от вида бактерий, так и от вида проращиваемых семян (Берестецкий и др., 1981). В связи с этим был поставлен эксперимент, показывающий зависимость роста листерий и иерсиний от вида проращиваемых семян. Листерии поочередно культивировались на летучих метаболитах прорастающих семян кукурузы и салата, а иерсинии - на метаболитах моркови и капусты. В результате был замечен избирательный рост изучаемых бактерий в зависимости от вида растений. Так, иерсинии практически одинаково размножались как на летучих метаболитах моркови, так и на летучих метаболитах капусты, листерии предпочтительно размножались на летучих метаболитах кукурузы.

Для выяснения влияния качественного состава летучих метаболитов прорастающих семян был проведен газохроматографический анализ этих веществ. В результате установлено, что летучие вещества, выделяемые прорастающими семенами кукурузы, моркови, салата, капусты содержат в большом количестве ацетальдегид, метанол, этанол. При этом наибольшее количество метанола выделяется проростками кукурузы, гораздо меньше его в летучих выделениях проростков моркови, капусты и салата (Рис. 12). Это позволило предположить, что метанол стимулирует размножение листерий и иерсиний. Также на это указывает и то обстоятельство, что *Y. pseudotuberculosis* наиболее активно размножались на летучих метаболитах, вы-

деляемых смесью семян, куда входили и семена кукурузы, по сравнению с летучими метаболитами отдельно взятых капусты и моркови.



**Рис.12.** Хроматограммы летучих метаболитов прорастающих семян моркови (А), кукурузы (Б), капусты (В), салата (Г). 1-ацетальдегид, 2-метанол, 3-этанол.

Таким образом, летучие метаболиты прорастающих семян и сапрофитных бактерий почв, как биотические факторы среды, могут оказывать непосредственное влияние на рост и размножение патогенных бактерий. Следовательно, обнаружена специфичность действия летучих органических соединений растений на размножение бактерий, которая зависела как от свойств самих бактерий, так и от вида растений.

### Выводы

1. Установлено, что *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* размножаются в почвах автоморфного ряда и почвогрунте городских газонов. При этом наиболее оптимальными условиями для размножения является почвогрунт, отличающийся от исследуемых почв низким содержанием суммарного количества гумусовых кислот. Размножение листерий и иерсиний в буро-подзолистой почве обусловлено наличием в почвенном поглощающем комплексе повышенного содержания ионов кальция и магния, необходимых для нормального роста и размножения патогенных бактерий.
2. *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* способны к сохранению и размножению в почвах морского побережья. При этом в маритимной луговой почве наблюдается более активное размножение этих бактерий, чем в маршевой почве.
3. Температура оказывает влияние на размножение листериозного и псевдотуберкулезного микробов в почве. Как листерии, так и иерсинии размножались более интенсивно при температуре 20-22<sup>0</sup>С, тогда как при 4-6<sup>0</sup>С активность размножения была несколько ниже.
4. Гуминовые и фульвокислоты исследуемых почв, независимо от их типа, являются биологически активными в отношении размножения *L. monocytogenes* и *Y.*

*pseudotuberculosis*, но отдельные вытяжки фракций гуминовых и фульвокислот каждого типа почв оказывают разное влияние на рост и размножение патогенных бактерий.

5. Размножение листерий и иерсиний на фракциях гумусовых кислот зависело от штамма исследуемых бактерий и температуры среды. При этом все штаммы листерий размножались более активно на фракциях фульвокислот, по сравнению с фракциями гуминовых кислот. Для иерсиний такой зависимости не наблюдали. Среди фракций гуминовых кислот наиболее активной в отношении роста исследуемых бактерий является 3-ая фракция, независимо от типа почв.
6. Применение минеральных удобрений способствует активному размножению иерсиний и листерий в исследуемых почвах. При этом наиболее благоприятно влияет внесение азотного или фосфорного удобрений.
7. Летучие вещества, выделяемые в окружающую среду сапрофитной микрофлорой почв, оказывают непосредственное влияние на размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* в почвенных экосистемах. При этом наибольшей ингибирующей способностью обладают летучие метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*, стимулирующей - *Aeromonas*.
8. Летучие метаболиты прорастающих семян растений стимулируют рост и размножение патогенных бактерий, находящихся в почвах. Отмечена специфичность действия летучих органических соединений растений на размножение изучаемых бактерий. Основной летучей фракцией, влияющей на рост и размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*, является метанол.

#### Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Сидоренко М. Л., Трегубова В. Г., Бузолева Л. С. Влияние летучих метаболитов бактерий на рост патогенных бактерий, обитающих в почве. / Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии и экологии. - Владивосток. - 1998. - С. 118-119.
2. Сидоренко М. Л., Трегубова В. Г., Бузолева Л. С. Размножение патогенных бактерий в почвах Приморского края. / Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии и экологии. - Владивосток. - 1998. - С. 119-120.
3. Сидоренко М. Л., Бузолева Л. С. Влияние летучих метаболитов растений на размножение патогенных бактерий в почвах Приморского края. / II Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии. - Владивосток. - 1999. - С. 137.
4. Сидоренко М. Л., Бузолева Л. С. Влияние фракций гуминовых кислот и фульвокислот на рост и размножение патогенных листерий и иерсиний. / Тезисы докладов III Съезда Докучаевского общества почвоведов (11-15 июля 2000 г., Суздаль), книга 2. М., 2000. С. 51-52.
5. Бузолева Л. С., Сидоренко М. Л. Влияние органических веществ гуминовых кислот на размножение энтеробактерий. // Журн. Микробиол., 2001, №2. - С. 89-91.
6. Сидоренко М. Л. Влияние летучих метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* на размножение патогенных бактерий. // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2001. - №2. - С. 131.

7. Сидоренко М. Л., Бузолева Л. С. Размножение *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* под влиянием летучих метаболитов растений, являющихся факторами передачи возбудителей. / Актуальные Аспекты природно-очаговых болезней. Межрегиональная научно-практическая конференция. - Омск. - 2001. - С. 220-221.
8. Сидоренко М. Л., Бузолева Л. С., Тюрина М. А. Почвы морского побережья как резервуар для сохранения и размножения патогенной микрофлоры. / Геоэкологические проблемы почвоведения и оценки земель. Материалы международной научно-практической конференции. - т. 1. - Томск. - 2002. - С. 106-107.
9. Сидоренко М. Л., Бузолева Л. С. Влияние минеральных удобрений на рост патогенной микрофлоры в почвах. // Оценка современного состояния микробиологических исследований в Восточно-Сибирском регионе. Материалы российской научно-практической конференции. Иркутск. - 2002. - С. 189-190.
10. Сидоренко М. Л., Терехова В. Е., Бузолева Л. С. Особенности биологии возбудителя листериоза при обитании в объектах окружающей среды. / Приоритет России XXI века: от биосферы и техносферы к ноосфере. Сборник материалов международной научно-практической конференции 21-22 января 2003 г. г. Пенза. С. 159-161.
11. Сидоренко М. Л., Бузолева Л. С. Почвы морских побережий как среда обитания внеорганизменных популяций возбудителей сапрозоонозов. / Микробиологический симпозиум: фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии на Дальнем Востоке. Региональная научно-практическая конференция "Дальний Восток: ресурсный потенциал в начале III тысячелетия". Часть 3. - Владивосток. - 2003. - С. 54-61.
12. Сидоренко М. Л., Бузолева Л. С. Влияние различных видов минеральных удобрений на размножение *Listeria monocytogenes* в почвах. / Актуальные проблемы медицины и биологии. Сб. науч. работ. - Вып. 2. - Томск. - 2003. - С. 187-190.