

УДК 631.8:574.2

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА РАЗМНОЖЕНИЕ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ПОЧВАХ

© 2008 г. М. Л. Сидоренко*, Л. С. Бузолева**

*Биолого-почвенный институт ДВО РАН
690031 Владивосток, просп. 100-лет Владивостоку, 159, Россия

E-mail: sidorenko@ibss.dvo.ru

**НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН

690031 Владивосток, ул. Сельская, 1, Россия

E-mail: buzoleva@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2007 г.

Изучена возможность влияния минеральных удобрений, вносимых в почву, на размножение *Listeria monocytogenes* в почвенных экосистемах в условиях разных температур (4–6°C и 20–22°C). Внесение минеральных удобрений способствовало сохранению и активному размножению листериозного микроба в бурой подзолистой и бурой лесной почвах. Преимущество имела бурая подзолистая почва и внесение азотных или фосфорных удобрений при температуре 20–22°C.

ВВЕДЕНИЕ

Listeria monocytogenes способны к сохранению и размножению в различных, абсолютно контрастных по своим характеристикам экологических нишах: теплокровных организмах животных и человека, растениях, морских и речных гидробионтах, воде [1–6]. Почвенная экосистема – одна из основных экологических ниш обитания этих бактерий [7, 8], что является известным фактом, и доказано как выделением этого микроба из почвенных субстратов [9–11], так и в модельных экспериментах [12]. В настоящее время установлено, что на жизнеобитание листерий в почвах оказывают влияние биотические [7, 13] и абиотические [10, 12] факторы среды. Присутствие микроорганизмов в той или иной природной зоне определяется не только наличием контроля со стороны других микроорганизмов, но и условиями внешней среды. Одним из факторов, влияющих на существование и размножение *L. monocytogenes* в наземных экосистемах, могут быть вносимые в почвы удобрения. При интенсивной химизации земледелия, когда с каждым годом применяются все большие объемы минеральных и органических удобрений, возрастает комплексная антропогенная нагрузка на почву. В настоящее время неизвестно, какое влияние оказывают средства химизации на сохранение и размножение *L. monocytogenes* в почвах.

Вопрос о влиянии минеральных удобрений на биологическую активность почв в литературе освещен достаточно широко. Считается [14], что интенсивное применение удобрений изменяет микробиологические ценозы в почве и определенным

образом влияет на размножение и деятельность почвенной микрофлоры.

Некоторые авторы отмечают существенное увеличение биогенности и интенсивности микробиологических процессов в почве при внесении навоза, основных видов минеральных удобрений (NPK), извести [15–18]. Данные литературы о влиянии удобрений на микрофлору почв носят противоречивый характер. Одни авторы считают, что внесение минеральных удобрений увеличивает биогенность почв [19]. Другие отмечают угнетающее их воздействие на почвенные бактерии [20, 21]. Есть мнение, что снижение численности микроорганизмов при длительном применении минеральных удобрений происходит за счет уменьшения численности неспорозоносных форм бактерий и актиномицетов [22].

Цель работы – определить степень влияния минеральных удобрений, вносимых в почву, на размножение *L. monocytogenes* в почвенных экосистемах в условиях контрастных температур (4–6°C и 20–22°C).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования были использованы образцы бурой лесной (лесной массив) и бурой подзолистой (пашня, капустное поле) почв, наиболее распространенных в предгорьях Сихотэ-Алиня и на Ханкайско-Раздольненской равнине, отобранные из верхнего (0–10 см) горизонта. Одним из решающих факторов в выборе именно этих почв явилось то, что максимальное количество *L. monocytogenes* выявлено в лесных почвах [7, 10]. Кроме того, наиболее часто эти бактерии выделяют из

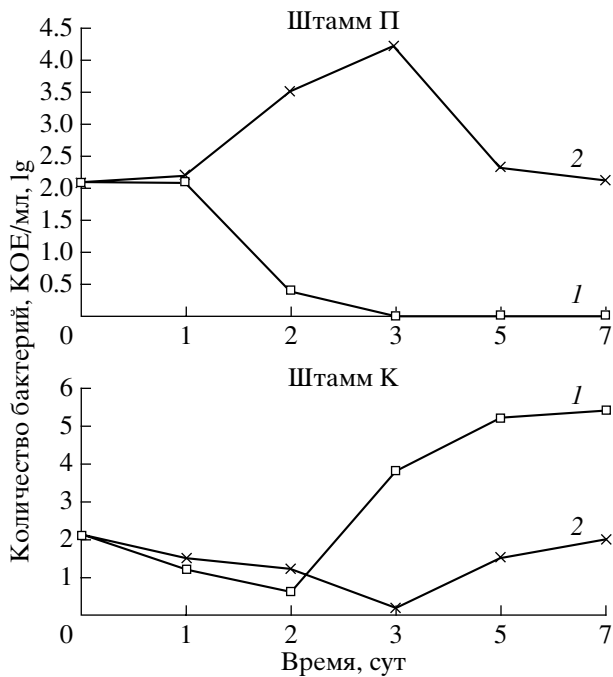


Рис. 1. Динамика размножения *L. monocytogenes* штамма П и штамма К в бурой лесной (1) и бурой подзолистой (2) почвах при 20–22°C.

сельскохозяйственных культур и пахотных почв [7], которые, как правило, удобряют.

В почвенных образцах определяли гумус по Тюрину, групповой состав гумуса по Тюрину в модификации Пономаревой и Плотниковой, актуальную кислотность, состав почвенного поглощающего комплекса, обменную кислотность, гидролитическую кислотность, обменные основания (Ca^{2+} и Mg^{2+}), емкость катионного обмена, степень насыщенности основаниями [23, 24].

При проведении экспериментальных исследований были использованы 6 штаммов *L. monocytogenes* (“П”, “А”, “К”, “10СN”, “4В”, “1/2А”), которые были получены из Всероссийского государственного контрольного института ветпрепаратов и НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (г. Москва), с типичными культурально-морфологическими, биохимическими и антигенными свойствами. Для проведения экспериментов использовали трижды отмытую в физиологическом растворе культуру этих штаммов, которую вносили в подготовленные заранее испытуемые почвенные суспензии дозированно из расчета 100 кл./0.1 мл суспензии. Количество бактериальных клеток в 1 мл суспензии определяли по оптическому стандарту мутности.

Для определения численности жизнеспособных клеток *L. monocytogenes* (всех шести штаммов) в почвенных экосистемах (контроль) из образцов почв были приготовлены суспензии, содержащие 1 г почвы/100 мл физиологического раствора, которые стерилизовали дробно, 3 сут

по 20 мин при температуре 100°C в автоклаве. Результаты этих опытов служили контролем.

Для постановки экспериментов с удобрениями предварительно готовили смесь из 1 кг почвы и 0.3 г одного из минеральных удобрений: азотного – $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, фосфорного – Na_2HPO_4 , калийного – K_2CO_3 . Подготовленную смесь в количестве 1 г вносили в колбу со 100 мл дистиллированной воды. Полученные суспензии стерилизовали дробно, как описано выше.

Исследования проводили при периодическом культивировании. Исходная доза при контрольном высеве из почвенной суспензии составила 100 КОЕ/0.1 мл. Для построения кривой роста определяли динамику численности бактерий путем периодических высевов по 0.1 мл инокулята (делая необходимые серийные разведения) на дифференциально-диагностическую среду для *L. monocytogenes*. Стадии кривой роста и максимальную концентрацию бактерий определяли по подсчету числа колоний, выросших на чашках Петри (колониобразующие единицы, КОЕ) [25].

В качестве дифференциально-диагностической среды для культивирования листериозного микроба использовали дрожжевой агар с глюкозой, налидиксовой кислотой и трипофлавином (натрия хлорид – 5.5 г, гидролизат кормовых дрожжей – 12 г, агар сухой – 12.5 г, вода дистиллированная – до 1 л, глюкоза – 2 г, налидиксовая кислота – 20 мг, трипофлавин – 30 мг, рН 7.2–7.4).

Для выяснения значимости температурного фактора все эксперименты проводили при 20–22°C и 4–6°C.

Повторность опытов трехкратная, результаты обрабатывали статистически в компьютерной программе электронных таблиц Excel с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы была исследована динамика размножения листерий в разных типах почв на фоне без удобрений. В результате проведенных экспериментов было установлено, что сохранение и размножение *L. monocytogenes* в почвах зависело как от типа исследуемых почв и их свойств, так и от биологических свойств бактерий на уровне штамма. Активное размножение большинства исследуемых штаммов листерий (П, А, 10СN, 4В, 1/2А), наблюдали в бурой подзолистой почве (4.2 lg), тогда как в бурой лесной почве уже на 3-и сут отмечали гибель бактерий (рис. 1). Это связано с тем, что бурая подзолистая почва содержит в почвенном поглощающем комплексе более высокие концентрации ионов кальция и магния, которые, по данным Работновой и Позмоговой [26], являются жизненно необходимыми для нормального размножения листерий. Кроме того, дан-

Таблица 1. Физико-химические и химические свойства исследуемых почв

| Почвы | рН | | Обменная кислотность | H_T | Емкость катионного обмена | Обменные основания | | Степень насыщенности основаниями, % | $C_{общ}$, % |
|-------------------|--------------------|------|----------------------|-------|---------------------------|--------------------|------------------|-------------------------------------|---------------|
| | H ₂ O | KCl | | | | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | | |
| | мг-экв/100 г почвы | | | | | | | | |
| Бурая лесная | 5.85 | 5.00 | 3.25 | 7.20 | 44.7 | 30.3 | 7.5 | 84 | 1.1 |
| Бурая подзолистая | 7.36 | 6.36 | 1.15 | 1.74 | 80.7 | 65.1 | 14.2 | 98 | 2.6 |

ная почва имеет наиболее подходящие значения рН, так как доказано [7], что оптимальными для роста листерий являются рН 7.0–7.4 и достаточно большое количество органического углерода в среде (табл. 1). Исключение составил штамм К, который активно размножался в бурой лесной почве (5.4 lg).

На втором этапе изучали влияние внесенных в почвы минеральных удобрений на размножение листерий. Известно положительное влияние умеренных доз минеральных удобрений на питательный режим почвы, ее агрохимические свойства. При этом увеличивается численность различных групп почвенных микроорганизмов, повышается ферментативная активность почвы и интенсивность продуцирования почвенной углекислоты [14].

Установлено, что внесенные в почву удобрения (смесь азотного, фосфорного и калийного)

оказали положительное влияние на размножение *L. monocytogenes*. Внесение минеральных удобрений в бурую лесную почву, для большинства штаммов не благоприятную, способствовало активному размножению исследуемых бактерий и увеличению их концентрации на 3–4 lg по сравнению с почвой, не содержащей удобрений (рис. 2). Очевидно, что в данном случае значительную роль играла кислотность среды этого типа почв, которая имела низкие значения (рН 5.85), не способствующие размножению листерий (табл. 2). Дополнительное внесение удобрений в эту почву увеличивало рН среды до значений, оптимальных для размножения исследуемых бактерий. Отмечено интенсивное их размножение в бурой подзолистой почве как в опыте (с удобрениями), так и в контроле (без удобрения), однако в опыте на-

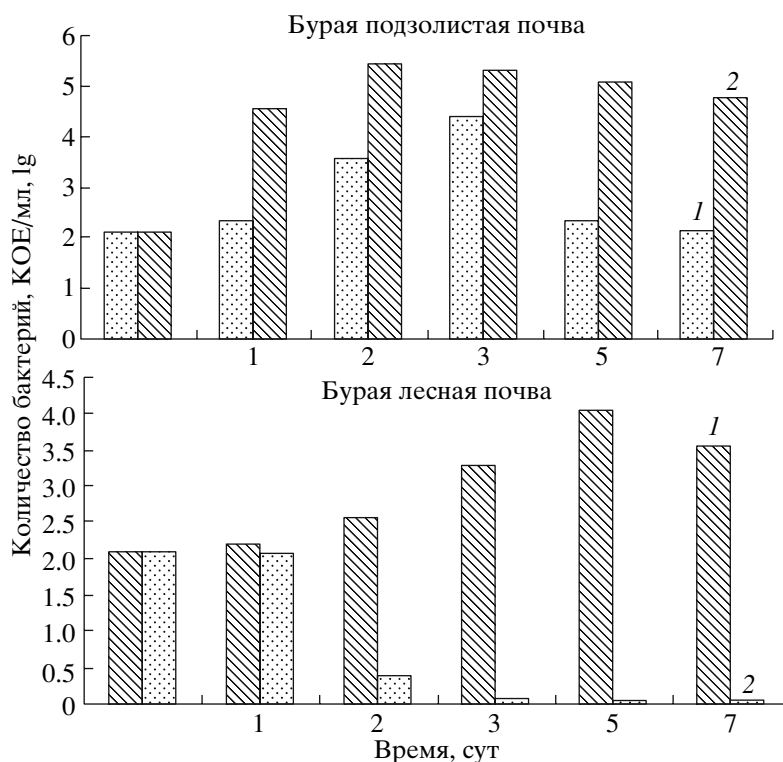


Рис. 2. Динамика размножения *L. monocytogenes* штамма П в бурой подзолистой и в бурой лесной почвах с удобрениями: 1 – смесь азотного, фосфорного и калийного, 2 – без удобрений при 20–22°C.

Таблица 2. Изменение кислотности почв при внесении минеральных удобрений

| Тип почвы | pH _{H₂O} | | | |
|------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | Без удобрения (контроль) | CO(NH ₂) ₂ | Na ₂ HPO ₄ | K ₂ CO ₃ |
| Бурая лесная | 5.85 | 8.01 | 7.56 | 8.31 |
| Бурая отбеленная | 7.36 | 7.8 | 7.49 | 8.08 |

блюдалась тенденция к увеличению роста популяции на 2–2.5 lg по сравнению с контролем.

Наиболее активное размножение листерий наблюдали в опытах с азотным удобрением, не зависимо от типа почвы (рис. 3). Все варианты опыта с удобрениями можно расположить по степени их положительного влияния на размножение листериозного микроба: почва с азотным удобрением > почва с фосфорным удобрением > почва с калийным удобрением, независимо от типа почв. Штамм *L. monocytogenes* преимущественно размножался в присутствии азотного и фосфорного удобрений (5.2 и 4.3 lg соответственно), а в присутствии калийного удобрения рост бактерий достигал максимального значения 3.8 lg, не зависимо от типа почвы. При этом следует отметить, что, в данном случае были получены одинаковые результаты при низких и высоких температурах инкубации почвы.

Кроме того, известно, что внесение минеральных удобрений усиливает минерализационную деятельность микроорганизмов и приводит к разложению органического вещества почвы [18, 26–28]. В результате увеличивается количество ионов кальция и магния, что является необходимым для нормального роста любых микроорганизмов.

Очевидно, что внесение в почву фосфорного и азотного удобрений положительно сказалось на сохранении и размножении листерий различных штаммов, поскольку (табл. 1) при этом почва имела оптимальные для них значения кислотности (pH 7.2–7.4). Менее благоприятно на размножение исследуемых бактерий влияло калийное удобрение, сильно подщелачивающее почву (pH до 10).

Следует отметить, что температурный фактор оказывал существенное влияние на высеваемость исследуемых штаммов бактерий из экспериментально зараженных почв. Динамика размножения

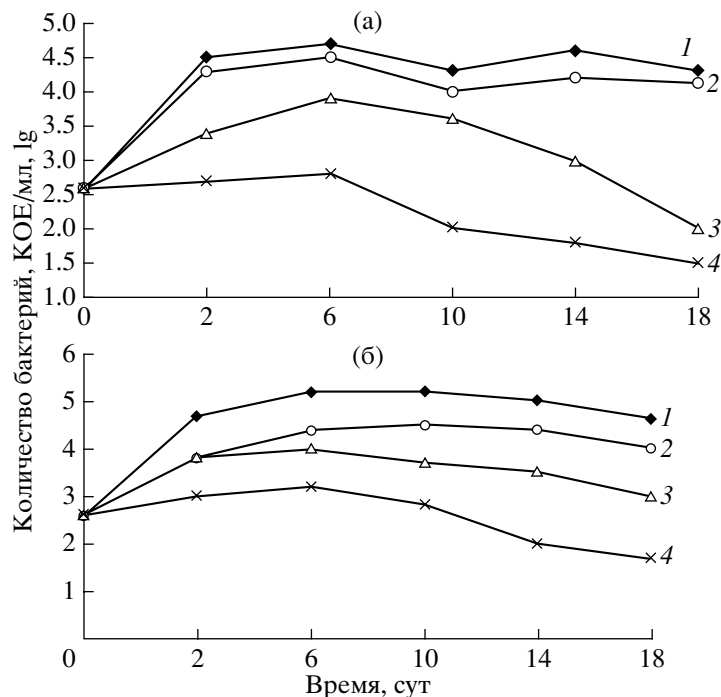


Рис. 3. Динамика размножения *L. monocytogenes* штамма П при 20–22°C в буро-подзолистой (а) и в бурой лесной (б) почвах с различными видами удобрений: 1 – азотное, 2 – фосфорное, 3 – калийное, 4 – без удобрений (контроль); n = 5.

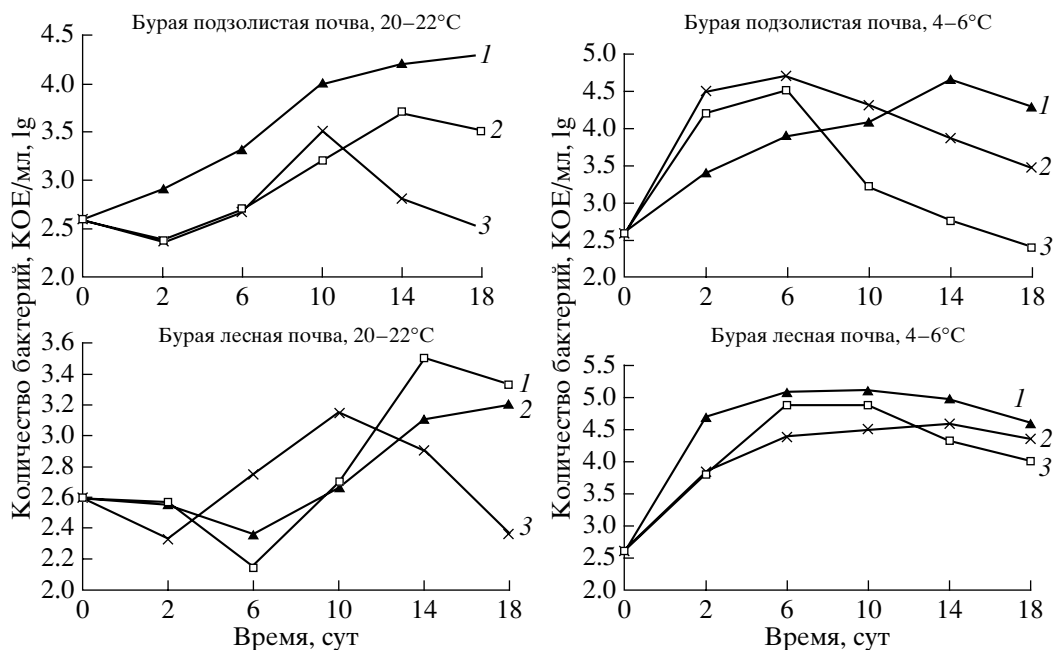


Рис. 4. Динамика размножения *L. monocytogenes* штамма П в бурой подзолистой и в бурой лесной почвах с удобрениями: 1 – азотным, 2 – фосфорным, 3 – калийным при 20–22°C и 4–6°C.

листерий штамма П в почвах с различными видами удобрений при температуре 4–6°C и 20–22°C показала, что при температуре 20–22°C максимум размножения листерий (5.2 lg, бурая подзолистая почва) регистрировался на 6-е и 10-е сут, тогда как при температуре 4–6°C – только на 18-е сут (срок наблюдения) и достигал значений 3.8 lg (для бурой подзолистой почвы).

Таким образом, активность размножения *L. monocytogenes* в почвах при внесении в них удобрений зависела, прежде всего, от вида удобрения, а также от температуры среды и характеристики самих штаммов бактерий. Преимущество в этом случае имела бурая подзолистая почва и внесение азотного или фосфорного удобрения при температуре 20–22°C. Результаты опыта свидетельствовали о возможности сохранения и размножения листериозного микроба в почвах при внесении минеральных удобрений.

ВЫВОДЫ

1. Применение минеральных удобрений в виде солей $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, Ca_2HPO_4 , K_2CO_3 как по отдельности, так и в комплексе из расчета 0.3 г на 1 кг почвы способствовало активному размножению *L. monocytogenes* в бурой подзолистой и бурой лесной почвах. При этом наиболее благоприятно влияло внесение азотного или фосфорного удобрений.

2. Листерии преимущественно размножались в удобренной бурой подзолистой почве по сравнению с бурой лесной.

3. Температурные условия инкубации почвы оказывали влияние на размножение листериозного микроба в почвах, содержащих минеральные удобрения. Более интенсивное размножение бактерий отмечено при температуре 20–22°C, по сравнению с 4–6°C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: экологические аспекты. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-е, 1988. 208 с.
2. Гершун В.И. Распространение и жизнеспособность листерии в объектах внешней среды и влияние температурного фактора на их морфологические свойства // Вопросы природной очаговости болезней. Алма-Ата, 1981. Вып. 12. С. 78–89.
3. Mc Lauchlin J., Gilbert R.J. The contamination of pate by *L. monocytogenes* in England and Wales // Listeria 1992: 11th Inter. Symp. Probl. Listeriosis, Copenhagen, 11–14 May, 1992: ISOPOL XI: Book Abstr. P. 313–314.
4. Shaegani M., De Forge J., McGlenn D. et al. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal and environmental sources // J. Clin. Microbiol. 1981. V. 14. № 3. P. 304–312.
5. Литвин В.Ю. Случайный паразитизм микроорганизмов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 1992. № 1. С. 52–55.

6. *Беляков В.Д., Литвин В.Ю. и др.* Патогенные бактерии, общие для человека и растений // Патогенные бактерии в сообществах. М., 1994. С. 13–14.
7. *Гершун В.И.* Экология листерий и пути их циркуляции в природном очаге // Экология возбудителей сапронозов. М., 1988. С. 80–85.
8. *Казаков А.В.* К вопросу об экологии возбудителя листериоза // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 1993. № 5. С. 113–114.
9. *Гершун В.И.* Влияние различных почв на выживаемость возбудителя листериоза // Ветеринария. 1971. № 1. С. 32–33.
10. *Гершун В.И.* Влияние абиотических факторов на жизнеспособность листерий в почве // Сиб. вестн. с.-х. науки. Новосибирск, 1980. № 3. С. 78–81.
11. *Кузнецов В.Г., Раковский В.В., Валекжанин Т.С., Сомов Г.П.* Изучение эпидемиологии дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки в Приморском крае. Сообщение III. Выделение псевдотуберкулезного микроба из почвы и роль почвы в распространении инфекции // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 1976. № 7. С. 138–139.
12. *Бузолева Л.С.* Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды: Дис. ... д-ра биол. наук. Владивосток, 2001. 316 с.
13. *Пушкарева В.И., Литвин В.Ю., Константинова Н.Д.* Анализ механизмов межпопуляционных взаимодействий иерсиний с инфузориями *Tetrahymena pyriformis* на клеточном и субклеточном уровнях // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 1990. № 1. С. 3–9.
14. *Минеев В.Г., Ремпе Е.Х.* Агрехимия, биология и экология почвы. М.: Росагропромиздат, 1990. С. 206.
15. *Миненко А.К.* Действие высоких доз минеральных удобрений на биологическую активность дерново-подзолистых почв // Агрехимия. 1981. № 3. С. 77–82.
16. *Джанаев Г.Г., Фарниев А.Т.* Влияние удобрений на интенсивность микробиологических процессов // Изв. АН СССР Сер. Биол. 1980. № 5. С. 754–761.
17. *Кузнецов Н.П., Халиглова В.С.* Действие удобрений на биологическую активность черноземов // Сб. научн. тр. Вост.-Казахст. гос. с.-х. опытной станции. 1981. № 9. С. 141–153.
18. *Шапова Л. Н.* Микрофлора почв юга ДВ России. Владивосток, 1994. 186 с.
19. *Стрельников В.Н., Бабаян Г.С., Соловьев П.П.* Действие извести и высоких доз минеральных удобрений на агрохимические свойства и биологическую активность дерново-подзолистой супесчаной кислой почвы // Агрехимия. 1981. № 9. С. 87–93.
20. *Кубарева Л.С.* Локальное внесение удобрений – один из путей повышения их эффективности // Бюл. ВИУА. 1980. № 53. С. 3–9.
21. *Ширская Г.М., Пивоваров Г.Е., Гомонова Н.Ф.* Применение минеральных удобрений как один из факторов токсикоза почв в агробиоценозах // Микроорганизм как компонент биогеоценоза. Алма-Ата, 1982. С. 135–136.
22. *Мишустин Е.М., Перцовская М.И., Горбов В.А.* Санитарная микробиология почвы. М.: Наука, 1979. 304 с.
23. *Аринушкина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во МГУ, 1970. 487 с.
24. *Орлов Д.С., Гришина Л.А.* Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во МГУ, 1981. 272 с.
25. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. 394 с.
26. *Работнова И.Л., Позмогова И.Н.* Некоторые вопросы общей физиологии микроорганизмов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 1994. № 4. С. 116–120.
27. *Мишустин Е.М., Перцовская М.И.* Микроорганизмы и самоочищение почвы. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 158 с.
28. *Михновская А.З.* Микробиологическая характеристика черноземов Украины и ее изменение под влиянием обработки и удобрений // Черноземы СССР (Украина). М., 1981. С. 125–229.

Effect of Different Mineral Fertilizers on the Reproduction of *Listeria monocytogenes* in Soils

M. L. Sidorenko and L. S. Buzoleva*

Institute of Biology and Soil Sciences, Far East Division, Russian Academy of Sciences, pr. Stoletiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690031 Russia
E-mail: sidorenko@ibss.dvo.ru

**Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Sel'skaya 1, Vladivostok, 690031 Russia*
E-mail: buzoleva@mail.ru

The effect of mineral fertilizers on the reproduction of *Listeria monocytogenes* in soil ecosystems at different temperatures (4–6 and 20–22°C) was studied. The application of mineral fertilizers favored the survival and active propagation of *L. monocytogenes* in brown podzolic and brown forest soils. The best results were observed at the application of nitrogen and phosphoric fertilizers to brown podzolic soil at 20–22°C.