

КРУГОВОРОТ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭКОСИСТЕМАХ ИЛИ МИКРОБНЫЙ ЦИКЛ.

А.М. Семёнов, доктор биологических наук

Е.В. Семёнова, кандидат биологических наук

кафедра микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Тел.: (495)9394223. E-mail: amsemenov@list.ru

Ключевые слова: круговорот микроорганизмов, цикл микроорганизмов, сапротрофы, энтеропатогены, экология, эпидемиология.

Экспериментально обосновывается круговорот или цикл микроорганизмов при исследовании перемещения популяций сапротрофных – *Pseudomonas fluorescens* gfp 32 и энтеропатогенных бактерий gfp-меченых *Escherichia coli* O157:H7 и *Salmonella enterica* Var. Typhimurium через основные экологические ниши: корм животных -> желудочно-кишечный тракт -> экскременты животных -> почва (вода) -> растения и опять желудочно-кишечный тракт животных.

Введение. Цикличность процессов в природе вполне обычное явление. Более того, о трансформации основных биогенных (биофильных) элементов в природе, таких как углерод, азот, сера, железо, кислород и др. говорят не иначе как о циклах этих элементов. При этом хорошо известно, что основной движущей силой круговорота в природе биофильных элементов являются микроорганизмы. Известны и циклы веществ, например, гидрологический цикл.

Микроорганизмы в природе тоже перемещаются, мигрируют. Миграция – это процесс активного или пассивного перемещения клеток микроорганизмов из одного местообитания в другое. Перемещение микроорганизма из одной экониши в другую и быстрая колонизация экониш – явление достаточно распространенное в природе и в последнем случае нередко говорят об инвазии того или иного микроорганизма. Перемещения микроорганизмов можно разделить не только на пассивные и активные, но и на ненаправленные (скалярные) и направленные (векторные). Такое деление несколько условно, т.к. в ряде случаев трудно классифицировать ту или иную форму перемещения. Считается, что главным способом распространения микроорганизмов в природе является рассеяние с воздушными массами и водными потоками, т.е. диссипативное распространение. Безусловно, ненаправленное, диссипативное распространение микроорганизмов с воздушными массами и водными потоками играет существенную роль в природе. Однако микроорганизмы перемещаются и в других фазах биосферы - почве, воде и населяющих их растительном и животном мире.

С точки зрения распространения микроорганизмов и их приуроченности к конкретным местообитаниям, помимо деления на эндемиков и космополитов микроорганизмы, с определенными допущениями, можно также разделить на обитателей и проходящих или “транзитных” представителей.

Для некоторых организмов известны жизненные циклы (ЖЦ) - процесс существования организма в виде последовательных переходов от одной жизненной формы (стадии) к другой, с изменениями морфологических и физиологических состояний, изменением сексуальных процессов и пloidности клеток и функционированием в одной или нескольких взаимосвязанных эконишах. Такие ЖЦ особенно характерны и хорошо известны для некоторых фито- и зоопатогенных микроорганизмов, как прокариотных, так и эвкариотных. ЖЦ осуществляются посредством диссипативных и векторных механизмов.

Основным векторным механизмом перемещения микроорганизмов является трофическая цепь, где микроорганизмы перемещаются и распространяются в виде субстрата и с субстратом. Однако, как «пастбищный», так и «детритный» варианты пищевой цепи однонаправлены и не могут охватить и объяснить всего многообразия перемещения микроорганизмов в экосистемах (Одум, 1986). Всесторонний охват и объяснение перемещения микроорганизмов дает представление об экологиче-



Рис. 1. Схема круговорота микроорганизмов в природе или цикл микроорганизмов.

ском цикле микроорганизмов или, другими словами, цикле микроорганизмов (ЦМ). Циклические перемещения микроорганизмов в экотопах и экосистемах в виде отдельных клеток, популяций и сообществ через основные природные местообитания: почву и воду → растения → животных → экскременты и экскреты животных и растений и опять почву, и воду является непрерывно действующим источником инокуляции постоянно возникающих новых экониш и местообитаний, к которым, в первую очередь относятся желудочно-кишечные тракты новорожденных животных, а также эндосфера растений (Рис.1). В отличие от пищевых цепей, которые односторонне направлены и не замкнуты, круговорот микроорганизмов в виде цикла - микробный цикл (МЦ) может быть обратимым, но является замкнутым. Почва и вода выполняют

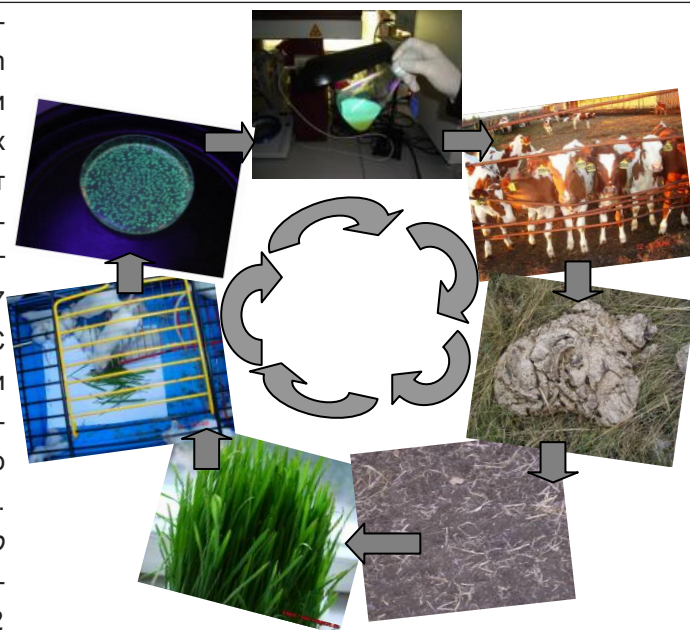
роль источника (резервуара, «узла», «хранилища»). Животные, их пищеварительные тракты – роль интенсивных инкубаторов (ферментеров). Кроме этого, почва, вода, растения, поверхности животных играют роль экстенсивных инкубаторов. Вода и растения - пассивные векторы, а животные - активные векторы, они же «ребра», соединяющие «узлы». Имеется и сток микроорганизмов, которым опять же является почва и вода. В «узлах» происходит селекция и размножение наиболее приспособленных к каждому конкретному месту обитанию микроорганизмов, потребление веществ и энергии, создание новых веществ, содержащих энергию. Следствием этого является формирование новых устойчивых к определенным условиям микробных популяций и сообществ. Наряду с таким глобальным МЦ, который сформировался вследствие филогенеза всего живого мира, имеют место микроциклы и/или укороченные циклы (петли), которые отражают эволюционное развитие каждого отдельного узла, например, короткий цикл почва - растение - почва, почва - животное - экскременты - почва и т.д. Циклическая природа перемещения микроорганизмов отмечена эпидемиологами (Черкасский, 1994).

Целью настоящей работы было экспериментальное подтверждение существования ЦМ в природе.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований были популяции сапротрофных – *Pseudomonas fluorescens gfp* 32 и энтеропатогенных бактерий *gfp*-меченых *Escherichia coli* O157:H7 и *Salmonella enterica* Var Typhimurium (Semenov et al., 2010). Бактерии получены из Университета Вагенингена (Нидерланды). У энтеропатогенных бактерий были удалены гены вирулентности. Бактерии выращивали на соответствующих средах с антибиотиками, концентрировали центрифугированием, отмывали от сред и в соответствующих разведениях вносили в субстраты - фураж для скормливания коровам или курам или в свежесобранные экскременты крупного рогатого скота (ЭКРС). ЭКРС, с интродуцированными *gfp*-бактериями после выявления закономерностей динамики выживания интродуцентов и аборигенов ($t=22^{\circ}\text{C}$) смешивали в соотношении 1:6 с почвой (влажность смеси 15%), опять исследовали динамику выживания интродуцентов и аборигенов (состав среды см. Semenov et al., 2010). В смеси ЭКРС-почва выращивали растения кресс-салата или овса. После учета на поверхности корней и стеблей растений *gfp*-бактерий растения скормливали – кресс-салат улиткам виноградным, овес морским свинкам или белым мышам. В экскрементах улиток, морских свинок или мышей определяли численность *gfp*-бактерий. Учет *gfp*-меченых бактерий осуществляли посевом на агаризованные среды с соответствующими антибиотиками и/или под люминесцентным микроскопом из соответствующих разведений. Дополнительно был проведен эксперимент по скормливанию курам инокулированного *gfp*-бактериями фуража с последующим определением этих бактерий в экскрементах кур и динамики выживания в стерильной и не прудовой воде. Водорастворимый органический углерод (ВОУ) определяли бихроматным методом при калибровании по глюкозе. Эксперименты с каждой бактерией отдельно повторяли три раза с не менее чем тремя повторностями каждый раз.

Результаты и их обсуждение.

Популяционная динамика выживания *S. Typhimurium gfp* и *E. coli* O157:H7 *gfp* в ЭКРС и в смеси ЭКРС-почва в краткосрочных экспериментах была довольно сходной и мало зависела от исходной инокуляционной дозы. Как при самой высокой инокуляционной дозе $9,5 \cdot 10^8$ кл/г ЭКРС для *S. Typhimurium gfp* и *E. coli* O157:H7 *gfp*, так и при самой низкой $7,1 \cdot 10^4$ КОЕ/г ЭКРС и $6,8 \cdot 10^4$ КОЕ/г ЭКРС для *S. Typhimurium gfp* и *E. coli* O157:H7 *gfp* соответственно, их численность через 10 суток в ЭКРС осталась довольно стабильной ($5,5 \cdot 10^8$ кл/г и $5,8 \cdot 10^4$ КОЕ/г ЭКРС). Популяционная динамика *P. fluorescens* 32 *gfp* в целом была схожа с динамикой энтеробактерий. Однако при наивысшей концентрации *P. fluorescens* 32 *gfp* снижение численности этой бактерии за наблюдаемые 10 суток было более резким. В смеси ЭКРС-почва также происходило снижение численности интродуцентов, причем более заметно, хотя тренд для всех бактерий был примерно одинаковым. Наибольшее снижение численности для энтеробактерий имело место при наибольшей и наименьшей инокуляционных дозах.



Снижение численности интродуцентов в смеси ЭКРС-почва может быть объяснено в первую очередь, снижением концентрации доступных субстратов, о чем косвенно свидетельствует уменьшение концентрации ВОУ в этих субстратах. В ЭКРС было обнаружено $7,8 \cdot 10^4$ мкг ВОУ/г сухого вещества, а в смеси ЭКРС-почва только $1,2 \cdot 10^3$ мкг ВОУ/г сухого вещества. Средняя численность аборигенов соответствовала «промежуточным» начальным численностям интродуцентов (10^8 и 10^7 /мл) в наших экспериментах, именно такие концентрации оказались наиболее оптимальными для выживания интродуцентов в ЭКРС и смеси ЭКРС-почва. Т.о., оптимальной концентрацией бактерий для интродукции в природные субстраты и успешного прохождения по цепи разных субстратов является такая, которая более или менее совпадает с концентрацией, выявляемых на средах аборигенов.

Закономерности выживания популяций интродуцентов, по крайней мере, энтеробактерий, в филлосфере и ризосфере кресс-салата отличались от таковых в ЭКРС и смеси ЭКРС-почва. В ЭКРС и смеси ЭКРС-почва, хотя и медленно, но происходило снижение численности, на растениях, как в ризосфере, так и в филлосфере обнаружено увеличение численности всех исследованных бактерий. Растения кресс-салата как местообитание оказалось благоприятным и для энтеробактерий, и для псевдомонад, способствуя их росту или концентрированию.

Схема эксперимента по исследованию способности бактерий перемещаться по цепи местообитаний: комбикорм - коровы - их экскременты - почва - растения - грызуны и их экскременты приведена на рис. 2, а результаты в таблице. Установлено, что, как и в случае с кресс салатом в ризосфере и филлосфере овса сапротрофы и энтеропатогены увеличивали свою численность. Увеличение численности имело место и в экскрементах мышей. Т.о., бактерии способны проходить через ряд местообитаний, в том числе два раза пройти через ЖКТ разных млекопитающих, фактически совершив полный цикл. Кроме этого, настоящими экспериментами еще раз было показана способность грызунов служить активными векторами распространения различных бактерий и инфицировать разные природные местообитания.

Так как птицы являются наиболее мобильными векторами в распространении микроорганизмов был проведен эксперимент по изучению выживания бактерий при прохождении через ЖКТ птиц и возможность выживания в водной среде после ее контаминирования. После скармливания курам комбикорма, содержащего 10^7 кл. меченых бактерий/г сух. комбикорма, в собранных через сутки экс-

крементах кур было обнаружено до $1,2 \cdot 10^4$ меченых клеток энтеробактерий и 10^4 клеток *P. fluorescens 32 gfp* в грамме сухого вещества. При наблюдении динамики численности меченых бактерий в экскрементах кур выявлено увеличение численности *S. Typhimurium gfp* почти на два порядка, несколько меньше для *E. coli* O157:H7 *gfp* и отсутствие прироста у *P. fluorescens 32 gfp*. После смешивания экскрементов со стерильной и нестерильной водой и определении численности исследуемых бактерий в

Таблица 1. Выживание исследуемых бактерий в серии природных субстратов после скармливания их крупному рогатому скоту.

Субстрат	Исследуемые бактерии, КОЕ/г сухого субстрата		
	<i>S. Typhimurium MAE 110 gfp</i>	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>gfp</i>	<i>P. fluorescens 32 gfp</i>
Инокулированный комбикорм перед скармливанием коровам	$2,0 \pm 0,8 \cdot 10^7$	$2,2 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$2,2 \pm 0,6 \cdot 10^7$
ЭКРС, через сутки после скармливания	$7,0 \pm 2,7 \cdot 10^3$	$7,1 \pm 2,4 \cdot 10^3$	$3,2 \pm 0,9 \cdot 10^2$
ЭКРС, перед смешиванием с почвой	$2,5 \pm 1,6 \cdot 10^4$	$1,1 \pm 0,4 \cdot 10^4$	$5,9 \pm 0,6 \cdot 10^3$
Смесь ЭКРС - почва	$2,2 \pm 1,0 \cdot 10^3$	$5,2 \pm 1,8 \cdot 10^3$	$6,4 \pm 1,3 \cdot 10^2$
Смесь ЭКРС - почва перед посевом овса	$3,8 \pm 1,1 \cdot 10^3$	$9,5 \pm 3,3 \cdot 10^3$	$8,0 \pm 1,2 \cdot 10^3$
Филосфера овса	$4,4 \pm 1,6 \cdot 10^3$	$1,5 \pm 0,4 \cdot 10^4$	$1,3 \pm 0,7 \cdot 10^4$
Ризосфера овса	$8,9 \pm 1,4 \cdot 10^3$	$6,2 \pm 1,1 \cdot 10^4$	$2,4 \pm 0,7 \cdot 10^4$
Экскременты мышей	$5,8 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$2,1 \pm 0,4 \cdot 10^4$	$2,5 \pm 0,2 \cdot 10^4$
Экскременты морских свинок	$1,6 \pm 0,8 \cdot 10^3$	$1,8 \pm 0,2 \cdot 10^4$	$1,9 \pm 0,1 \cdot 10^4$

нестерильной и в стерильной воде выявлена монотонно убывающая численность бактерий. В стерильной воде снижение было несколько медленнее, чем в нестерильной, что может быть связано с конкурентным давлением со стороны водных аборигенов.

Заключение. Показано, что три вида бактерий: сапротрофная *P. fluorescens 32 gfp* и две энтеропатогенные бактерии *Salmonella enterica* Var. *Typhimurium gfp* и *E. coli* O157:H7 *gfp* при разной исходной численности способны успешно и длительно выживать в различных природных субстратах. Даже при самой низкой исходной популяционной численности бактерии способны проходить сложную и длинную цепь местообитаний, указывая тем самым не конкретную эконишу существования в природе каждой конкретной популяции микроорганизмов, а на последовательное и многократное перемещение всей или части популяции в ряду субстратов, что можно, по-видимому, назвать многоступенчатой интродукцией или инокуляцией. В связи с тем, что у энтеропатогенов обнаружена высокая выживаемость в различных эконишах, современные представления эпидемиологии о резервуарах, источниках, «носителе» и др. нуждаются в соответствующей корректировке. Помимо практической значимости исследованиями обосновывается такой важный теоретически факт как существование круговорота микроорганизмов в виде перемещения отдельных популяций микроорганизмов или комплекса разных популяций через ряд взаимосвязанных природных субстратов в виде цикла (Семенов, 2005; Куприянов, 2009; Semenov et al., 2010). При «расщеплении» или «диссипации» таких популяций с перемещением сразу в несколько новых местообитаний, по-видимому, можно говорить не только о круговороте микроорганизмов в виде цепи, но и в виде сети. Полученные результаты показывают, что сохранение и поддержание популяции того или иного микроорганизма в природе зависит не только от того, как долго он

может выживать в том или ином субстрате, но и от того, как успешно он может выживать при перемещении из одного субстрата в другой, третий и т.д.

Литература.

1. Куприянов А.А. 2009. Динамика выживания бактерий в цепи взаимосвязанных природных субстратов. Автореф. дисс. на соиск. уч. степ. к.б.н. М. «СТ-ПРИНТ» 24 с.
2. Одум Ю. 1986. Экология. Том 2. М. Мир. 376 с.
3. Семёнов А.М. 2005. Трофическое группирование и динамика развития микробных сообществ в почве и ризосфере. Дис. на соиск. уч. степ. д.б.н. в виде научн. доклада. М. 2005. «МАКС Пресс». 66 с.
4. Черкасский Б.Л. 1994. Инфекционные и паразитарные болезни человека. М. Изд. Мед. Газета. 617 с.
5. Semenov A.M., Kuprianov A.A., Van Bruggen A.H.C. 2010. Transfer of enteric pathogens to successive habitats as part of microbial cycles. *Microb. Ecol.* 60:239-249.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ К ТЕСТ-СИСТЕМЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА МИКСОМЫ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Синдрякова И.П., аспирант, Моргунов С.Ю., аспирант, Сальников Н.И аспирант, Колбасов Д.В., доктор ветеринарных наук, профессор

ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Тел./факс: (49243) 6-21-25;

6-10-56 VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

Ключевые слова: вирус миксомы, нуклеиновые кислоты, ПЦР, рекомбинантная плаزمид.

Статья посвящена получению рекомбинантного положительного контроля к ПЦР тест-системе для обнаружения ДНК вируса миксомы.

Введение.

Миксоматоз — остро протекающая, высококонтагиозная болезнь кроликов, характеризующаяся воспалением слизистых оболочек и появлением студенистых отеков в области головы, ануса, гениталий и кожи [1]. В России эпизоотические вспышки миксоматоза регистрируются в кролиководческих хозяйствах, начиная с 1978 г.

Возбудитель миксоматоза – *Mxomatosis cuniculorum* – ДНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Leporipoxvirus* семейства *Poxviridae*. Вирус миксомы имеет большой 2-х цепочечный ДНК-геном длиной 163 тысячи пар оснований, который реплицируется в цитоплазме инфицированных клеток. Миксоматозом болеют кролики независимо от возраста. Распространение болезни в естественных условиях происходит через кровососущих насекомых — комаров, кроличьих блох, вшей и клещей, в организме которых вирус сохраняется до 7 месяцев, создавая резервуар возбудителя в природе [2].

Лабораторные диагностические исследования на наличие вируса миксомы проводят путем гистологического изучения инфильтратов, постановки биопробы на кроликах. Для обнаружения у кроликов антител к возбудителю применяют серологические методы, такие как: РИФ, РСК, РДП, РН, ИФА [1]. В ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии была разработана «Тест-система для выявления ДНК виру-