

СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ SALMONELLA ENTERITIDIS В ПОЧВЕ

Хрусталева Г.А.¹, Аллахвердиев С.Р.²

¹Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области, Тула, e-mail: hrustalevagalina@mail.ru;

²Московский педагогический государственный университет, Москва, e-mail: surhay@mail.ru

Проведен анализ воздействия микробиологического препарата «Байкал-ЭМ1» на патогенную культуру микроорганизма *Salmonella enteritidis*. Критериями активности того или иного препарата выступают минимальные подавляющие концентрации (МПК), тормозящие рост тест-культуры. Именно МПК позволяет наиболее точно охарактеризовать степень чувствительности микроорганизма к ингибитору. Чем ниже МПК препарата, тем выше чувствительность к нему микрофлоры. При определении минимальной подавляющей концентрации препарата «Байкал-ЭМ1», которая вызывает подавление заметного невооруженным глазом роста патогенной микрофлоры, использовался метод серийных (десятикратных) разведений. Приготовление рядов десятикратных разведений контрольного тестируемого штамма осуществлялось с применением стандартного образца мутности 5 МЕ. Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке до единичных клеток (примерно 5 КОЕ/мл). В ходе эксперимента были использованы следующие концентрации микробиологического препарата «Байкал - ЭМ1»: 1:10; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:2000. Установлено, что микробиологический препарат «Байкал-ЭМ1» в концентрациях 1:10, 1:100, 1:500 проявил антагонистический эффект по отношению к контрольному тест-штамму *S. enteritidis* в разной степени. Выявлена оптимальная концентрация препарата «Байкал-ЭМ1» – 1:10, полностью подавляющая рост индикаторных бактерий *Salmonella enteritidis*, в разведениях до 5×10^5 клеток.

Ключевые слова: почва, микроорганизмы, антагонизм, «Байкал-ЭМ1», минимальная подавляющая концентрация.

METHOD FOR INHIBITING THE ACTIVITY OF SALMONELLA ENTERITIDIS IN THE SOIL

Khrustaleva G.A.¹, Allakhverdiev S.R.²

¹ «The center of hygiene and epidemiology in the Tula region», Tula, e-mail: hrustalevagalina@mail.ru;

² Moscow pedagogical state university, Moscow, e-mail: surhay@mail.ru

The analysis of the influence of microbiological preparation "Baikal-ЭМ1" on the culture of the pathogenic microorganism *Salmonella enteritidis*. Criteria of activity of a drug are the minimum inhibitory concentrations (IPC), inhibiting the growth of test-cultures. It is the IPC is the most accurate method to characterize the degree of sensitivity of the microorganism to the inhibitor. The lower IPC of the drug, the higher the sensitivity to the hair. To determine the minimum inhibitory concentration of the drug "Baikal-ЭМ1", which suppresses visible to the naked eye growth of pathogenic organisms, the method of serial (tenfold) dilutions. Preparation of a series of tenfold dilutions of the control and the test strain was carried out using standard sample turbidity 5 IU. The final concentration of microorganism in each test-tube to single cells (approximately 5 CFU/ml). During the experiment, we used the following concentrations of microbiological preparation "Baikal-ЭМ1": 1:10; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:2000. As a result, it was found that the microbiological preparation "Baikal-ЭМ1" in concentrations 1:10, 1:100, 1:500 showed an antagonistic effect in relation to control test strain *S. enteritidis* in different degrees. Optimal concentration preparation «Baikal-EM1» – 1:10. Completely inhibit the growth of indicator bacteria *Salmonella enteritidis* up to 5×10^5 cells revealed.

Keywords: soil, microorganisms, antagonism, «Baikal -ЭМ1», minimum inhibitory concentration.

Почва является основным средством производства в сельском хозяйстве. Все растительные продукты сельского хозяйства состоят из органических веществ, синтез которых происходит в растениях под воздействием солнечной энергии. Разложение органических остатков и синтез новых соединений, входящих в состав перегноя, протекает при воздействии ферментов, выделяемых разными ассоциациями микроорганизмов. При

этом наблюдается непрерывная смена одних ассоциаций микробов другими.

Микроорганизмов в почве очень большое количество. По данным М.С. Гилярова, в каждом грамме чернозема насчитывается 2–2,5 миллиарда бактерий. Микроорганизмы не только разлагают органические остатки на более простые минеральные и органические соединения, но и активно участвуют в синтезе высокомолекулярных соединений – перегнойных кислот, которые образуют запас питательных веществ в почве. Поэтому, заботясь о повышении почвенного плодородия (а, следовательно, и о повышении урожайности), необходимо создавать условия для активного развития микробиологических процессов, питания и увеличения популяции микроорганизмов, которые образуют в почве сложный биоценоз, а различные их группы находятся между собой в сложных отношениях [4]. Одни микробы успешно сосуществуют, а другие являются антагонистами (противниками). Антагонизм их обычно проявляется в том, что одни группы микроорганизмов выделяют неспецифические вещества, которые являются отходами в процессе обмена веществ. Они тормозят или делают невозможным развитие микробов.

К неспецифическим веществам относятся органические кислоты, спирты, перекиси, сероводород, аммиак и пр. Так, молочнокислые бактерии подавляют развитие гнилостных бактерий, образуя молочную кислоту. Дрожжи образуют спирт, который подавляет развитие других видов бактерий.

Таким образом, перед учеными встала однозначная задача создания устойчивого симбиоза микроорганизмов, способствующего не только обеспечению питанием растений, но и ограничению патогенной микрофлоры в почве, которая попадает в нее с различными органическими отбросами в виде фекалий, навоза, мусора и т.п. Через почву могут передаваться возбудители туберкулеза, чумы, дизентерии, брюшного тифа, холеры, газовой гангрены, ботулизма, сибирской язвы, а также патогенные грибы и актиномицеты [8]. Экспериментально было доказано, что ряд патогенных микроорганизмов может длительно выживать или даже размножаться в почве.

Изучение явлений антагонизма и симбиоза у микробов представляет обширную область исследований, как для выяснения его биологической сущности, так и с целью практического использования в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Антагонистами могут быть представители всех групп микроорганизмов. Проявление антагонизма зависит от условий культивирования. Так, деятельность микробов-антагонистов – одна из причин очищения почвы от патогенных микроорганизмов. Обильно развиваясь в почве, полезные микробы-антагонисты задерживают развитие многих фитопатогенных бактерий и грибов. Этим они оздоравливают почву и оказывают большое влияние на плодородие почв. Некоторые микробы угнетают рост других, с помощью вырабатываемых

ими веществ, называемых антибиотиками. Антибиотики проникают в ткани растений, что повышает устойчивость последних к возбудителям болезней.

Антагонистические взаимоотношения в мире микроорганизмов ученые наблюдали, начиная с XIX века. В конце XIX века были сделаны первые попытки применения микроорганизмов и продуктов их обмена для лечения болезней, вызванных бактериями – В.А. Манассеин (1871), А.Г. Полотебнов (1872) и др. Однако их попытки не имели успеха. Впервые научные основы теории антагонизма микробов и практического её использования для лечения инфекционных заболеваний и предотвращения старения создал русский учёный И.И. Мечников [4, 8, 9]. Он доказал, что молочнокислые бактерии подавляют развитие вредных для организма гнилостных бактерий, попадающих в кишечник человека и животных. Впервые в истории науки была сделана успешная попытка применения продуктов жизнедеятельности микробов-антагонистов для лечения и профилактики болезней, вызванных другими микробами, за что совместно с немецким врачом и бактериологом П. Эрлихом был удостоен Нобелевской премии.

Со временем, проникнув в мир вездесущих обитателей планеты, люди научились использовать разнообразные ценные качества микроорганизмов. В природе существуют микроорганизмы, способные получать энергию, в отличие от млекопитающих, не поглощая кислород воздуха, а путём брожения. Например, дрожжи преобразуют глюкозу в этиловый спирт и кислоту без доступа кислорода. Такие анаэробные микроорганизмы даже гибнут в кислородной атмосфере.

Известны бактерии, использующие для биосинтеза энергию солнечного света, как растения. Их называют фотосинтетическими или фототрофными. Местом их обитания являются серные источники, озёра, морские заливы и лиманы. Красные и зелёные плёнки на подводных камнях, кровавая окраска воды являются признаками скопления пурпурных и зелёных серных бактерий. Некоторые из них способны усваивать молекулярный азот или выделять молекулярный водород, а также окислять сероводород до серы и сульфатов.

В живой природе сосуществование – симбиоз – весьма распространённое явление. Один организм поселяется в другом, иного вида, и оба приносят друг другу пользу. Некоторые учёные считают, что именно симбиоз лежит в основе скачков в эволюционном преобразовании живой материи. [1, 4-7, 10].

Так, основываясь на явлении симбиоза, в 1997 г. в России, под руководством П.А. Шаблина был создан препарат «Байкал-ЭМ1», на основе анабиотических микроорганизмов Байкальской экосистемы. Микробиологическое удобрение «Байкал-ЭМ1» представляет собой устойчивое сообщество полезных (непатогенных) микроорганизмов, разлагающих органику в легкодоступные для растений формы, обогащающие почву элементами

минерального питания растений и продуктами своей жизнедеятельности. По данным Блинова В.А. (2008), «Байкал-ЭМ1» не обладает мутагенным, тератогенным, канцерогенным, аллергогенным и пирогенным действием, и эти особенности препарата очень важны с точки зрения его влияния на здоровье человека и окружающую среду [2, 3].

Нами была проведена исследовательская работа и предложена модификация метода по изучению антагонистического воздействия препарата «Байкал-ЭМ1» на патогенные микроорганизмы для ускорения ингибирования их активности в почве. Данный эксперимент проводился в рамках изучения воздействия препарата «Байкал-ЭМ1» на отдельную культуру бактерий рода *Salmonella* – *serovar enteritidis*.

Бактерии рода *Salmonella* представляют собой мелкие палочки с закругленными концами, изредка овальной формы, длиной 2—4 мкм и шириной 0,5 мкм. Иногда они образуют нити. Спор и капсул не образуют, грамтрицательны. Сальмонелла – это микроорганизм, который является возбудителем такого заболевания как сальмонеллез, может вызывать пищевые вспышки, отличающиеся массовостью и «остротой» возникновения. За последние 20 лет во всем мире и в нашей стране широко распространилась *Salmonella enteritidis*. Представители этого серовара вызывают пищевые вспышки сальмонеллеза при низкой дозе указанных микроорганизмов в продукте и характеризуются высокой устойчивостью во внешней среде, в том числе и в почве.

Известны способы обеззараживания почвы от патогенных микроорганизмов с использованием различных физических и химических агентов:

1. Способ обеззараживания фасованных компостов и почвогрунтов от патогенных микроорганизмов в камере со стандартной стерилизационной газовой смесью, состоящей из окиси этилена (10–20 %) и двуокиси углерода (90–80 %) при давлении от 1,5 до 2,0 бар, температуре 50 °С и влажности не более 50 %. Компост и почвогрунт выдерживаются в течение 180–240 мин.

2. Способ обеззараживания почвы в защищенном грунте, который заключается в том, что на поверхности почвы располагают парораспределитель с перфорированным шлангом, поверх него насыпается слой цеолита 10–12 см, все плотно накрывается термостойкой планкой и подается пар давлением 30–50 кПа в течение 5–3 мин с последующим снижением давлением пара.

Данные способы обладают следующими недостатками:

- технологическая и техническая сложность;
- малый объем обрабатываемой почвы, обусловленный размерами грузочной камеры;
- значительные энергозатраты;
- изменение состава почвы;

- невозможность установления равновесия микробиологического состава почвы.

Целью нашего исследования явилось создание оптимальных условий ингибирования активности бактерий *Salmonella enteritidis* и развития полезной микрофлоры, приводящей к оздоровлению почвы, а также к повышению плодородия почвы и урожайности возделываемых культур.

Поставленная цель достигается путем определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) микробиологического препарата «Байкал-ЭМ1», оказывающей антагонистическое действие по отношению к патогенным бактериям.

Материал и методы исследования

Материал исследования – микробиологическое удобрение «Байкал-ЭМ1». Определение антагонистического воздействия препарата «Байкал-ЭМ1» на патогенную культуру микроорганизма *Salmonella enteritidis*, с целью ускорения ингибирования их активности в почве, проводилось классическим бактериологическим методом.

Метод определения антагонистической активности основан на выявлении подавления роста чувствительных бактерий тест-культуры *S. enteritidis* микробиологическим препаратом «Байкал-ЭМ1» во время культивирования в условиях 37 °С, в течение 48 часов, на жидкой питательной среде и последующем определении количества колоний индикаторных бактерий при высеве смеси на плотную среду. Высев производят с таким расчетом, чтобы на чашке выросли изолированные колонии, доступные количественному учету. По числу выросших колоний индикаторных микроорганизмов определяют минимальную концентрацию препарата, подавляющую рост данных микроорганизмов в бульоне (МПК).

Принцип определения МПК:

1. Приготовление рабочего раствора препарата «Байкал -ЭМ1» заданной концентрации из основного раствора с использованием жидкой питательной среды. В ходе эксперимента были использованы следующие концентрации микробиологического препарата «Байкал ЭМ-1»: 1:10; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:2000.

2. Приготовление рядов десятикратных разведений контрольного тестируемого штамма (в нашем случае тест-культура *Salmonella enteritidis*) с применением стандартного образца мутности 5 МЕ. Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке до единичных клеток (примерно 5 КОЕ/мл).

3. Внесение концентраций препарата в ряды пробирок с десятикратными разведениями тест-культуры.

4. Термостатирование при температуре 37 °С в течение 48 час.

5. Дозированный посев на плотную питательную среду для последующего количественного учета. Термостатирование при t 37 °С в течение 24 часов.

6. Учет результатов.

Результаты исследования

Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты антагонистической активности микробиологического препарата «Байкал-ЭМ1»

Контроль микробной взвеси <i>Salmonella enteritidis</i>			Рабочие разведения препарата «Байкал-ЭМ1»						
			1:10		1:100		1:500		
Десятикратные разведения по стандарту мутности	Контрольный высев на МПА (37°C – 24ч)		Снижение количества клеток <i>S. enteritidis</i> после воздействия препарата ЭМ в МПБ (37°C – 48ч) по результатам посева на МПА (37°C – 24ч)						
	непосредственно после разведений	после культивирования взвеси (37°C–48ч)	КОЕ/см ³	%	КОЕ/см ³	%	КОЕ/см ³	%	t
5x10 ⁸	* спл/рост	спл/рост	спл/рост	-	спл/рост	-	спл/рост	-	-
5x10 ⁷	спл/рост	спл/рост	1232	-	спл/рост	-	спл/рост	-	-
5x10 ⁶	спл/рост	спл/рост	160	-	спл/рост	-	спл/рост	-	-
5x10 ⁵	спл/рост	спл/рост	4	-	2080	-	спл/рост	-	-
5x10 ⁴	спл/рост	спл/рост	1	-	304	-	2088	-	-
5x10 ³	4700	спл/рост	0	-	14	-	93	-	-
5x10 ²	570	4100	0	-	8	0,2+0,07	51	1,24+0,17	5,6
5x10 ¹	60	392	0	-	2	0,5+0,36	16	4,1+1,0	-
5	8	42	0	-	0	-	9	21,4+6,3	-

* сплошной рост (подсчет колоний невозможен)

МПБ – мясо-пептонный бульон

МПА – мясо-пептонный агар

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что микробиологический препарат «Байкал-ЭМ1» в концентрациях 1:10, 1:100, 1:500 проявил антагонистический эффект по отношению к контрольному тест-штамму *S. enteritidis* в разной степени. Наибольшую активность препарат проявил в концентрации 1:10, так как он практически полностью подавлял рост индикаторных бактерий в разведениях до 5x10⁵ клеток. В вариантах 1:100 и 1:500 подавляющая способность препарата «Байкал-ЭМ1» также хорошо выражена, однако слабее при более высоком содержании жизнеспособных клеток тест-культуры.

Очевидно, что после обработки препаратом «Байкал-ЭМ1» в почве происходит значительное снижение как суммарного содержания микроорганизмов, так и отдельных групп, представляющих опасность загрязнения почвы. Следовательно, биологическая активность почвы, а именно совокупность биологических и биохимических процессов в почве, связанных с жизнедеятельностью микрофлоры, напрямую может регулироваться современным биологическим препаратом «Байкал-ЭМ1», что на данный момент является актуальным в сохранении окружающей среды и получении экологически безопасной продукции.

В ходе практической работы нами было установлено положительное влияние препарата «Байкал-ЭМ1» на энергию прорастания, всхожесть семян томатов и моркови,

появление массовых всходов, настоящих листьев, фаз образования бутонов, цветения, формирования и созревания плодов. Выявлена оптимальная концентрация препарата – 0,2 %, способствующая повышению всхожести и энергии прорастания семян опытных растений. Например, обработка семян 0,2 % раствором препарата у семян томатов, по сравнению с контролем, повысила всхожесть на 9 %, а энергию прорастания – на 13,4 %. В аналогичных условиях обработки у семян моркови эти же показатели, по сравнению с контролем, увеличились соответственно на 10,4 % и 15 %. Под действием препарата «Байкал-ЭМ1» повысилась урожайность моркови. Так, урожайность моркови, обработанной препаратом «Байкал-ЭМ1», составила с 1 кв. м до 6,5 кг моркови, в сравнении с урожайностью необработанной моркови – 5,7 кг.

Так как для «поддержания в тонусе» иммунной системы растений необходимо, чтобы 2/3 почвенной микрофлоры состояло из полезных микроорганизмов, а примерно 1/3 из патогенных микроорганизмов, то из вышеизложенного следует, что для выбора практической минимальной подавляющей концентрации микробиологического препарата «Байкал-ЭМ1» необходимо учитывать степень загрязнения почвы.

При таком способе обработки почвы не происходит фитотоксичности почвогрунта, так как препарат «Байкал-ЭМ1» не обладает мутагенным, тератогенным, канцерогенным, аллергогенным и пирогенным действием и имеет эффект повышения всхожести семян овощных культур и стимуляции роста растений, что позволяет говорить о научной новизне и научно-прикладном значении использования экологически чистого микробиологического препарата.

Таким образом, реализация представленного нами способа позволит повысить надежность и эффективность обеззараживания и упростить процесс обработки почвы.

Выводы:

1. Микробиологический препарат «Байкал-ЭМ1» обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к бактериям *Salmonella enteritidis*, которые могут загрязнять почву.

2. Выявлена оптимальная концентрация микробиологического препарата «Байкал-ЭМ1» - 1:10, которая полностью подавляет рост индикаторных бактерий *Salmonella enteritidis*, в разведениях до 5×10^5 клеток.

3. Обработка семян томата и моркови 0,2 %-ным водным раствором препарата «Байкал-ЭМ1» способствует активации физиологических процессов на начальных этапах развития растений.

4. Разработанная методика может быть использована для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК), с целью создания равновесия между полезными и

патогенными микроорганизмами в почве.

5. Полученные результаты позволяют нам говорить о перспективности использования препарата «Байкал-ЭМ1» в биоконтроле за состоянием почвы и болезнями растений.

Список литературы

1. Авраменко И.Ф. Микробиология: учеб. пособие. – М.: Колос, 1972. – С. 190.
2. Блинов В.А. Биотехнология. – Саратов, 2003. – С. 34.
3. Блинов В.А., Буршина С.Н., Шапулина Е.А. Биологическое действие эффективных микроорганизмов // Биопрепараты: сельское хозяйство, экология, практика применения. ООО «ЭМ – Кооперация». – Москва, 2008. – С. 30-65.
4. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник для вузов по специальности «Ветеринария» / ред. Радчук Н.А. – 1991. – С.55.
5. Громов Б. В., Павленко Г. В. Экология бактерий. – Л.: ЛГУ, 1989. – С. 59.
6. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1978. – С. 164-167.
7. Кожевин П. А. Микробные популяции в природе. – М.: МГУ, 1985. – С. 39-56.
8. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. – Москва: Медицина для всех, 2005. – С. 196.
9. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: учебник. – М.: Академия, 2006. – С. 352.
10. Нетрусов А.И., Горленко В.М. «Экология микроорганизмов». – Москва: Академия, 1991. – С. 301.