

УДК 573.63

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛ, ШИГЕЛЛ, ЭШЕРИХИЙ, ЭНТЕРОКОККОВ В ПОЧВЕ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПЕСТИЦИДАМИ

Михеев П.В., Громова И.П.

*Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Роспотребнадзора, Мытищи,
e-mail: pvm-fscg@yandex.ru*

В экспериментальном исследовании изучено влияние пестицидов из разных классов на свойства интродуцированных в почву кишечных бактерий. Изучена динамика общей численности микроорганизмов, связанная с дегидрогеназной активностью почвы, и отличающаяся в почве с 10-кратной нормой пестицидов и контроле. Впервые для оценки влияния химических веществ дополнительно были использованы тест штаммы патогенных бактерий из рода шигелла и сальмонелла. Приведены результаты учета численности бактерий через 5, 11, 20, 30, и 60 сутки эксперимента. Шигеллы можно использовать для выявления пороговой концентрации пестицидов, влияющей на микробное сообщество. Однако целесообразнее использовать санитарно показательные энтерококки. Установлено негативное токсическое действие 10-кратной концентрации химических веществ на численность всех штаммов патогенных и условно-патогенных бактерий. Шигеллы и энтерококки были наиболее чувствительны к пестицидам при выявлении прямым посевом на агаризованных средах. Сальмонеллы и кишечная палочка длительно сохранялись в почве, загрязненной 10-кратной нормой пестицидов. Физиолого-морфологические свойства тест штаммов бактерий через 11 суток не изменились, а спустя 30 суток нахождения в почве – изменялись незначительно.

Ключевые слова: пороговая концентрация пестицидов в почве, выживаемость патогенных бактерий в почве, изменение биохимических свойств бактерий

EXPERIMENTAL STUDY OF SALMONELLA, SHIGELLA, ESCHERICHIA, ENTEROCOCCI IN SOIL CONTAMINATED WITH PESTICIDES

Mikheev P.V., Gromova I.P.

F.F. Erisman Federal Scientific Centre of Hygiene, Mytishchi, e-mail: pvm-fscg@yandex.ru

In an experimental study, the effect of pesticides from different classes on the properties of intestinal bacteria introduced into the soil was studied. The dynamics of the total number of microorganisms associated with the dehydrogenase activity of the soil, and differing in the soil with a 10-fold norm of pesticides and control, was studied. For the first time, test strains of pathogenic bacteria from the genus *Shigella* and *Salmonella* were additionally used to assess the effect of chemicals. The results of accounting for the number of bacteria after 5, 11, 20, 30, and 60 days of the experiment are given. *Shigella* can be used to identify the threshold concentration of pesticides affecting the microbial community. However, it is more expedient to use sanitary indicative enterococci. A negative toxic effect of a 10-fold concentration of chemicals on the number of all strains of pathogenic and opportunistic bacteria was established. *Shigella* and enterococci were the most sensitive to pesticides when detected by direct inoculation on agar media. *Salmonella* and *E. coli* persisted for a long time in soil contaminated with 10 times the norm of pesticides. The physiological and morphological properties of the test strains of bacteria after 11 days did not change, and after 30 days of being in the soil, they changed slightly.

Keywords: threshold concentration of pesticides in the soil, survival of pathogenic bacteria in the soil, changes in the biochemical properties of bacteria

Современное сельское хозяйство невозможно без использования пестицидов, используемых для борьбы с вредителями, сорными растениями, и для повышения урожайности культур. Пестициды могут не оказывать влияние на почвенное микробное сообщество. Чаще отмечают снижение численности и разнообразия бактерий в почвах, подвергшихся обработке пестицидами [1]. Изменение равновесия в микробиоценозе связывают с внесением высоких доз пестицидов в почву, в десятки раз превышающих норму внесения [2].

Недостаточно изучено влияние пестицидов на патогенные бактерии фекального происхождения, которые определяют эпидемиологическую опасность почвы сельскохозяйственных угодий. Патогенные ки-

шечные бактерии не принимают какое-либо существенное участие в разложении пестицидов. Почва и ее микробное сообщество являются агрессивной средой в отношении этих бактерий, размножающихся в кишечном тракте теплокровных животных. Не ясны вопросы их выживаемости, устойчивости и натурализации в почве. Сложно предугадать характер воздействия на отдельные микроорганизмы самого пестицида и продуктов его деструкции, поскольку основные направления реакций окисления и образования метаболитов представляют собой сложный биохимический процесс [3].

В соответствии с нормативными требованиями при обосновании ПДК пестицидов собирают информацию и проводят исследования воздействия пестицидов на почвен-

ные микроорганизмы. Проведение экспериментальных лабораторных исследований подразумевает подбор тестовых микроорганизмов, наиболее чувствительных к химическим веществам. Для учета этих микроорганизмов должны быть разработаны методики их выделения из почвы и подсчета, подобраны селективные дифференциально-диагностические среды.

Цель исследования: изучить в эксперименте влияние десятикратной нормы внесения в почву двух химических веществ – инсектицида и гербицида, на численность, культуральные, морфологические и биохимические свойства тест штаммов кишечных патогенных и условно-патогенных бактерий. Оценить возможность использования этих бактерий как дополнительный к ОМЧ и дегидрогеназной активности показатель для определения пороговой концентрации пестицидов в почве.

Материалы и методы исследования

Для эксперимента использовали просеянный песок, прогретый при температуре 105° С в течение 1 часа для снижения численности вегетативных форм бактерий. Из-за низкого содержания органического вещества влияние иммобилизации и инактивации пестицидов на результаты эксперимента были минимальны. Для моделирования процесса в песок добавляли стерильную водопроводную воду (60% влажность), пестициды в концентрации в 10 раз выше нормы внесения, и тест штаммы бактерий. Пестицид 1 – действующее вещество химического класса пиретроидов, используемое в сельском хозяйстве для борьбы с вредными насекомыми и вредителями. Низкотоксично по отношению к птицам, не причиняет вреда дождевым червям. Токсично для пчел и других полезных насекомых. Высокотоксично для рыб. Вещество практически не растворяется в воде, поэтому навеска для 10-кратной концентрации подготовлена в 10 мл ацетона (из расчета на 5 кг). Внесено по 1 мл в 75 мл стерильной водопроводной воды до заражения бактериями (0,15 мг/0,5 кг).

Пестицид 2 – действующее вещество химического класса фенилпирозола, являющееся системным гербицидом – ингибитором ацетил-КоА-карбоксилазы. 10-кратная концентрация подготовлена в 10 мл (из расчета на 5 кг). Внесено по 1 мл в 75 мл стерильной водопроводной воды до заражения бактериями (0,15 мг/0,5 кг).

Бактерии: *Shigella dysenteriae* 1 № 1362, *Shigella flexneri* 1a №8516, *Salmonella enterica* susp. *enterica* serovar *Typhimurium* 79, *Salmonella enterica* susp. *enterica* serovar *Enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC

11229, *Enterococcus faecalis* ATCC 23655. Внесено по 0,5 мл суспензии бактерий каждого вида примерно 10⁹ кл/мл (по стандарту ОСО) на 0,5 кг почвы в стеклянных стаканах для создания концентрации бактерий около 10⁵ КОЕ/г почвы.

После одновременного внесения пестицидов и бактерий проведено ручное перемешивание почвы. В течение всего эксперимента поддерживали стабильные температурные условия и влажность. Пробы отбирали на 5, 11, 20, 31 и 60, 90 сутки эксперимента. Для исследования асептически отбирали 10 г навески почвы, из которых после роторного размешивания при 150 об./мин. в течение 15 минут, готовили разведения для количественного посева. Численность типичных по культуральным признакам кишечных бактерий учитывали методом посева на поверхность агаризованных диагностических питательных сред: питательный агар, сальмонелле-шигелла агар (SS – агар), висмут сульфит агар (BSA – агар), агар с канамицином, эскулином и азидом натрия Мерк, Эндо агар, хромогенный агар Мерк для *E. coli* и колиформных бактерий. После учета презумптивных колоний проверяли их некоторые биохимические свойства. Общее микробное число (ОМЧ) – методом посева на чашки Петри с ГРМ агаром из десятикратных разведений почвы в водопроводной воде. При этом изучали динамику ОМЧ по отдельности в почве с разными внесенными бактериями. На 20, 30 и 60, 90 сутки дополнительные навески почвы для предварительного обогащения помещали на 4 часа в забуференную пептонную воду, затем на 20 часов на жидкие селенитовый бульон, Раппапорта – Василядиса бульон, лактозо – пептонный бульон. Из них делали высев петлей на агаризованные среды. Дегидрогеназную активность почвы определяли спектрофотометрическим методом.

Результаты исследования и их обсуждение

Прямым методом посева без предварительного обогащения оценили реальную численность жизнеспособных кишечных бактерий спустя 11 суток после инокуляции в почву (табл. 1).

Морфологические характеристики колоний на питательных средах, выделенных после 11 суток пребывания в почве с пестицидами, в сравнении этими же суточными культурами из коллекции были характерными для данных видов бактерий. Микроскопирование препаратов бактерий также не показало визуальных отличий от суточной коллекционной культуры.

Таблица 1

Морфологическая характеристика колоний бактерий и их численность в почве с пестицидами через 11 суток после заражения

Микроорганизм	Численность, КОЕ/г		Морфология колоний (прямой метод выделения из почвы)
	Гербицид	Инсектицид	
<i>Shigella dysenteriae</i>	$4,0 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	На среде Эндо – колонии бледные с розовым центром 2 мм, блестящие, круглые. На SS агаре – очень мелкие менее 1 мм, прозрачные
<i>Shigella flexneri</i>	$3,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$	
<i>Salmonella typhimurium</i>	$3,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	На среде Эндо – бледно-розовые 1-2 мм с выпуклым розовым центром, блестящие круглые 1-2 мм. На ВСА колонии мелкие 1 мм, черные, блестящие, с отпечатком на агаре.
<i>Salmonella enteritidis</i>	$3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	На среде Эндо колонии 2 мм, круглые, бледные с розовым центром. ВСА колонии мелкие, темно – зеленые, без отпечатка.
<i>Escherichia coli</i>	$1,7 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	На среде Эндо – темно красные колонии с неровным волнистым краем и металлическим блеском 1-2 мм. На хромогенном агаре – бета-глюкуронидаза-положительные синие колонии с неровным краем, плоские, круглые – до 2 мм.
<i>Enterococcus faecalis</i>	$3,3 \times 10$	$1,0 \times 10$	На среде с канамицином – мелкие колонии черного цвета, окруженные темной зоной.

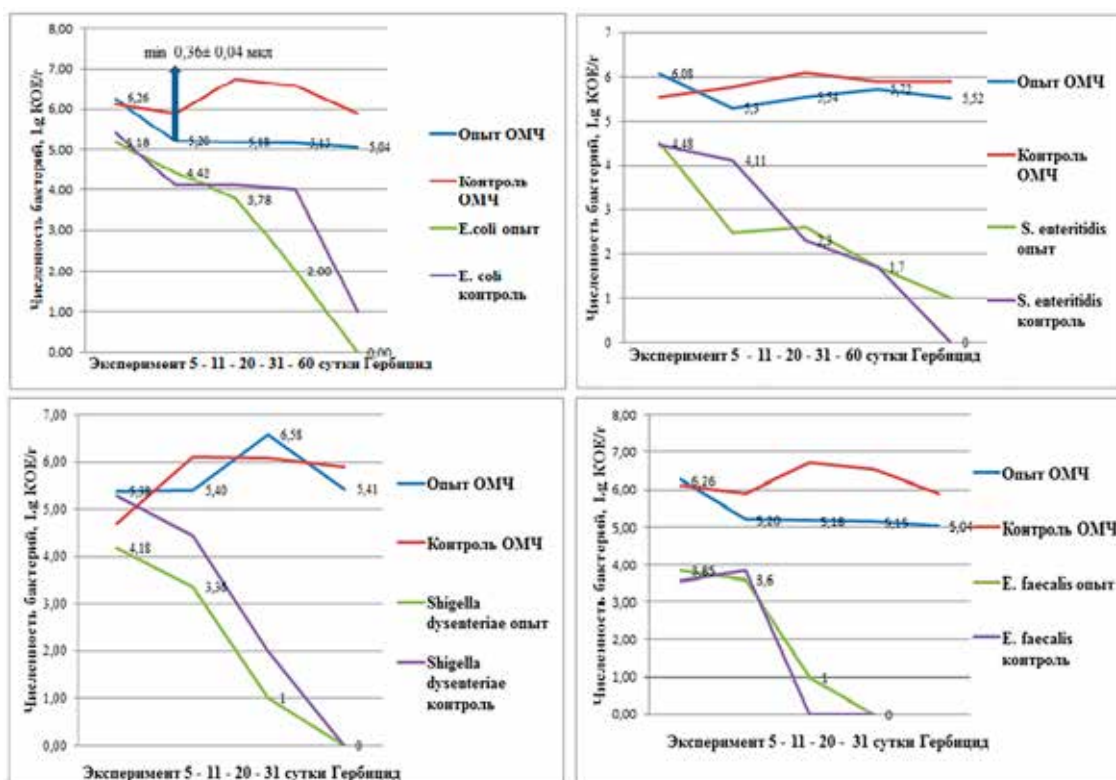


Рис. 1. Влияние гербицида из класса фенилтиразола на численность бактерий

Постановка некоторых основных дифференцирующих биохимических тестов показала соответствие свойств выделенных из почвы культур заявленным паспортным

данным: положительно маннит, мальтоза (шигеллы), цитрат Симмонса (сальмонеллы), индол и бета глюкуронидаза (эшерихия), подвижность (все кроме шигелл),

а также характерный рост на трехсахарном агаре с железом. Пребывание коллекционных типовых штаммов бактерий в течение 11 суток в почве с 10-кратной концентрацией пестицидов не привело к изменению физиологических показателей микроорганизмов. Численность бактерий сохранялась на высоком уровне.

Динамика ОМЧ и численности кишечных патогенных и условно – патогенных бактерий в эксперименте с гербицидом и представлены на рисунке в логарифмической шкале (рис. 1).

Помимо разной скорости элиминации кишечных бактерий из почвы, отмечали токсичное влияние 10-кратной концентрации гербицида на численность интродуцированных штаммов.

Для всех микроорганизмов 10-кратная концентрация гербицида изменяла их численность более чем на 50% в сравнении с контролем.

Отмечено достаточно продолжительное, до 60 дней, выявление и возможность учета бактерий кишечной палочки и сальмонелл, и быстрое снижение и элиминация из почвы шигелл и энтерококков.

Численность шигелл в течение первых двадцати суток упала до единичных клеток в контроле и опыте, вследствие чего их невозможно было выделить и идентифици-

ровать при прямом посеве среди бурного роста сапрофитной микрофлоры. Среда SS – агар была недостаточно селективной. На ней росли мелкие прозрачные колонии бактерий в количестве до 10^4 КОЕ/г, принадлежащие к родам *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, и другие, осуществляющие процесс самоочищения почвы. Шигеллы относятся к 3 классу опасности и являются патогенами, вызывающим заражение человека при попадании в организм от 10 до 100 клеток [4]. Шигеллы оказались «неудобными» для изучения оценки влияния гербицида, хотя различия между контролем и опытом позволяли обнаружить пороговую концентрацию. Численность энтерококков также быстро снижалась в почве, не показав различий между опытом и контролем. Вследствие не высокой чувствительности прямого метода (от 100 КОЕ/г), начальная доза заражения почвы должна быть увеличена с 10^3 до 10^5 КОЕ/г. Являясь санитарным показателем недавнего загрязнения почвы, энтерококки могли бы быть удобным микроорганизмом для оценки влияния разных концентраций гербицидов. Питательная среда – эскулин канамицин азидный агар для энтерококков, позволяла с высокой степенью селективности выявлять их присутствие.

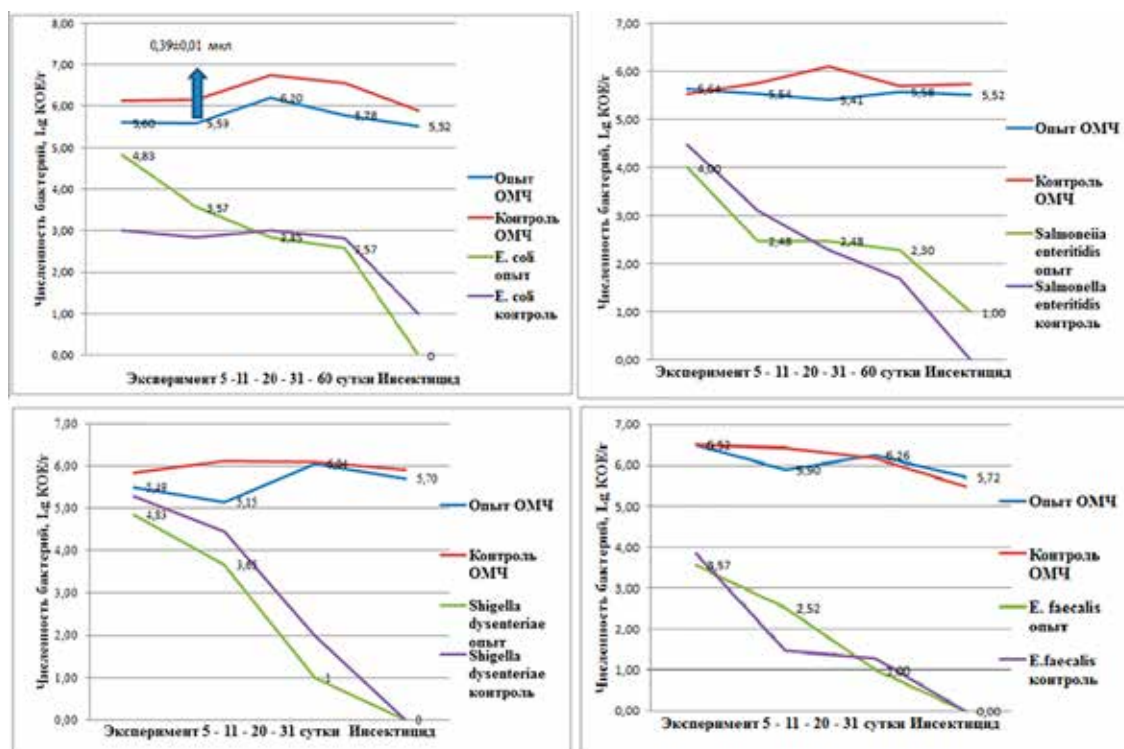


Рис. 2. Влияние инсектицида класса пиретроидов на численность бактерий

Сравнивая продолжительность выявления двух других микроорганизмов из почвы, обнаружена большая устойчивость сальмонелл к 10-кратной концентрации гербицида по сравнению с кишечной палочкой. Крайние обнаружения сальмонелл и кишечной палочки были через 60 дней. При следующем отборе проб почвы через 90 дней – микроорганизмы не найдены.

В районе 14 суток от начала эксперимента была зафиксирована минимальная дегидрогеназная активность в опытной почве с гербицидом, достоверно отличавшаяся более чем на 25% от контроля. Дегидрогеназы бактерий участвуют в окислительно-восстановительных процессах. Их ингибирование в этот период отразилось

на ОМЧ и численности кишечных бактерий (кроме энтерококков).

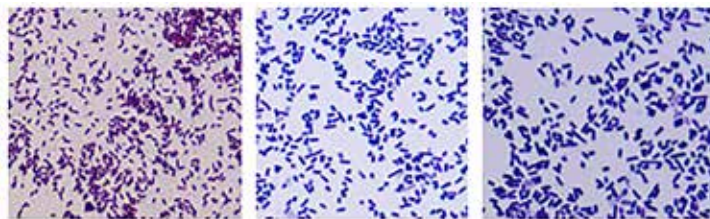
Сходная картина наблюдалась по влиянию инсектицида на динамику численности микроорганизмов в почве (рис. 2).

Численность сальмонелл и шигелл к концу второй недели была ниже в опытной почве под действием инсектицида. Снижение численности кишечной палочки по сравнению с контролем наблюдали после 20 суток эксперимента. Дегидрогеназная активность в опыте по сравнению с контролем была достоверно ниже на 14 и 20 сутки эксперимента, что больше было связано не с интродуцированными штаммами кишечных бактерий, а с ОМЧ. Наибольшую устойчивость к инсектициду показали сальмонеллы.

Таблица 2

Свойства сальмонелл и кишечной палочки, выделенных из почвы с пестицидами через 30 суток, в сравнении с коллекционной суточной культурой этих же бактерий

Название теста	S. enteritidis 30 сут. Гербицид	S. enteritidis 30 сут. Инсектицид	S. enteritidis 1 сут.	E. coli 30 сут. Гербицид	E. coli 30 сут. Инсектицид	E. coli 1 сут.
L-пролинАРИЛАМИДАЗА	нет	нет	нет	-	+	+
ПРОДУКЦИЯ H ₂ S	+	+	+	нет	нет	нет
L-ЛАКТАТ	+	+	+	-	-	+
УСТОЙЧИВОСТЬ К 0/129	-	+	+	+	-	+
D-МАЛЬТОЗА	+	+	+	+	+	+
ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	+	+	+	+	+	+
D-МАННИТ	+	+	+	+	+	+
D-ТРЕГАЛОЗА	+	+	+	+	+	+
СУКЦИНАТ	+	+	+	+	+	+
ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	+	+	+	нет	нет	нет
D-ГЛЮКОЗА	+	+	+	+	+	+
D-МАННОЗА	+	+	+	+	+	+
ТирозинАРИЛАМИДАЗА	+	+	+	+	+	+
ЦИТРАТ (НАТРИЯ)	+	+	+	нет	нет	нет
ЭЛЛМАН	нет	нет	нет	+	+	+
ГАММА-ГЛЮТАМИЛ-ТРАНСФЕРАЗА	-	-	+	нет	нет	нет
АЛЪФА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	+	+	+	+	+	+
КУМАРАТ	+	+	+	+	+	+
БЕТАЛАКТОЗИДАЗА	нет	нет	нет	+	+	+
СБРАЖИВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ	+	+	+	+	+	+
D-СОРБИТ	+	+	+	+	+	+
5-КЕТО-0-ГЛЮКОНАТ	+	+	+	нет	нет	нет
ФОСФАТАЗА	+	+	+	+	-	+
БЕТА-ГЛЮКУРОНИДАЗА	нет	нет	нет	+	+	+
ИНДОЛ	нет	нет	нет	+	+	+
Морфология колоний	типовая	типовая	типовая	типовая	типовая	типовая
Подвижность	-	-	+	-	-	+



1 сут. *S. enteritidis* 30 сут. Гербицид 30 сут. Инсектицид

Рис. 3. Морфология бактерий выделенных из почвы с пестицидами через 30 суток, в сравнении с коллекционной суточной культурой этих же бактерий

Несмотря на то, что изучаемые пестициды относились к разным классам химических веществ, полученные данные указали на существенное (более чем на 50%) влияние 10-кратной нормы внесения на микробное сообщество (ОМЧ) и отдельные виды кишечных бактерий для обеих веществ.

Численность как патогенных, так и условно-патогенных бактерий, существенно (на несколько порядков) снижалась за первый месяц эксперимента, что позволяет использовать последние для оценки эпидемиологического статуса почвы, загрязненной пестицидами.

Эксперимент показал на возможность сохранения в прогретой почве спорных и других форм бактерий, ответственных за процесс самоочищения почвы, увеличивших в первые 60 дней свою численность до уровня $10^5 - 10^6$ КОЕ/г.

Прямой метод посева без предварительного обогащения не учитывает часть клеток микробной популяции, не выросших из-за повреждения химическим веществом. При этом прямой метод показывает реальное состояние и численность интродуцированной популяции бактерий в почве, искажаемое при восстановлении первоначальных свойств культуры в бульонной среде из небольшой части клеток, не подвергшихся токсическому воздействию химического вещества.

Тестирование свойств суточных культур, пересеянных на питательный агар со сред выделения ВСА и Эндо на 30 сутки эксперимента прямым методом, приведено в таблице (табл. 2).

Среди 26 биохимических признаков, положительных для типовых суточных культур, под воздействием пестицидов у *E. coli* – исчезла гидролазная активности (амидазы) -пролинАРИЛАМИДАЗА. (L-пролин – один из двадцати протеиногенных аминокислот), пропала устойчивость к O/129 – вибростатику (2,4-диамино-6,7-дизопропилптеридинфосфат), подвижность. У *S. enteritidis* – также устойчивость к вибростатику, подвижность, и фермент

обмена аминокислот Гамма-глутамил-трансфераза. Незначительные изменения произошли в морфологии клеток (рис. 3).

В первоначальной суточной культуре сальмонелл и эшерихий преобладали небольшие полиморфные палочки с закругленными концами. Спустя 30 суток пребывания в почве с пестицидами выделенные бактерии приобрели палочковидную форму, что согласуется с имеющимися данными [5, 6].

Выводы

Патогенные кишечные бактерии можно использовать для выявления пороговой концентрации пестицидов, влияющей на микробное сообщество. Шигеллы и энтерококки наиболее чувствительны к пестицидам при выявлении прямым посевом на агаризованных средах. Сальмонеллы и кишечная палочка сохраняется в почве с пестицидами свыше двух месяцев.

Пестициды в 10-кратной норме внесения в почву через 30 суток незначительно изменяют некоторые физиологические и морфологические характеристики тест штаммов *E. coli* и *S. enteritidis*.

Список литературы

1. Onwona-Kwakye M., Plants-Paris K., Keita K. et al. Pesticides decrease bacterial diversity and abundance of irrigated rice fields. *Journal List Microorganisms*. 2020. V. 8(3). P. 318. DOI: 10.3390/microorganisms8030318.
2. Анянueva Н.Д. Микробиологическая оценка почв в связи с самоочищением от пестицидов и устойчивостью к антропогенным воздействиям: дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2001. 294 с.
3. Feld L., Hjelmsø M.H., Nielsen M.S. et al. Pesticide Side Effects in an Agricultural Soil Ecosystem as Measured by amoA Expression Quantification and Bacterial Diversity Changes. *PLoS One*. 2015. V. 10(5). P. e0126080. DOI: 10.1371/journal.pone.0126080.
4. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. Изд. 3-е, испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 1008 с.
5. Gorovtsov A.V., Minkina T.M., Mandzhieva S.S. The mechanisms of biochar interactions with microorganisms in soil. *Environ Geochem Health*. 2020. V. 42(8). P. 2495-2518. DOI: 10.1007/s10653-019-00412-5.
6. Михеев П.В. Санитарно-микробиологическое состояние почв береговой полосы водоемов в местах рекреации // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2018. № 12-1. С. 93-97.