

**ЕВТЕЕВА НАДЕЖДА ИВАНОВНА**

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В ПРИРОДНЫХ  
МЕСТООБИТАНИЯХ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ**

**03.00.16 - экология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» Федерального агентства по образованию  
(ГОУ ВПО ННГУ им. Н.И. Лобачевского)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент  
Речкин Александр Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Смирнов Василий Филиппович

доктор биологических наук, профессор  
Гоготов Иван Николаевич

Ведущая организация: Институт экологии Волжского бассейна РАН  
(г. Тольятти)

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 года в «\_\_\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д.212.166.12 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина 23, корп. 1, биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

e-mail: [ecology@bio.unn.ru](mailto:ecology@bio.unn.ru)

факс: (831)465-85-92

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Г.А. Кравченко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* регулярно выделяются из почвы и воды, сохраняют жизнеспособность в широком диапазоне абиотических факторов среды, нередко обладают патогенностью для многих беспозвоночных и позвоночных животных, и человека. Способность утилизировать углеводы, спирты, аминокислоты, целый комплекс циклических органических соединений; участие в процессах нитрификации, денитрификации, аммонификации, азотфиксации позволяет энтеробактериям занимать различные местообитания (Ленгелер, 2005).

Полагают, что возбудители сапронозных инфекций, к которым относятся и бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, способны существовать в двух экологических фазах – сапрофитической (во внешней среде) и паразитической (в организме хозяина), и, следовательно, образовывать параллельно существующие части популяции – внеорганизменную и организменную (гостальную) (Сомов 1988; Литвин, 1991, 2003; Бухарин, 1997). Не исключено, что переход бактерий из одной среды существования в другую (внешняя среда—организм хозяина) представляет собой один из способов так называемой поведенческой адаптации микроорганизмов, позволяющей, в конечном счете, обеспечить их выживание как вида. При этом экология патогенных микроорганизмов в сапрофитической фазе существования изучена крайне недостаточно.

Этиологическая значимость и потенциальная патогенность энтеробактерий обуславливает необходимость более тщательного изучения биоразнообразия данной группы возбудителей, природных местообитаний, условий формирования симбиоценозов и длительности существования их резервуаров. Будучи весьма актуальной, с эпидемиологических позиций, проблема заслуживает целенаправленного популяционно-экологического анализа – как применительно к конкретным микроорганизмам, так и в сравнительно-экологическом аспекте. Не менее значимым представляется исследование физиолого-биохимических различий, определяющих внутривидовое разнообразие штаммов из разных местообитаний.

### **Цель исследования.**

Выявить распространение и биоразнообразие энтеробактерий в природных местообитаниях на территории Нижегородской области, а также некоторые физиолого-биохимические свойства, определяющие адаптационные возможности и потенциальную патогенность этиологически значимых представителей семейства *Enterobacteriaceae* (на примере *Klebsiella pneumoniae*).

### **Задачи исследования.**

1. Охарактеризовать биоразнообразие энтеробактерий в следующих природных объектах:

- микробоценозы общественных насекомых и субстратов, с которыми они активно контактируют;
- вегетативные и генеративные части некоторых медоносных растений, посещаемых пчелами;
- содержимое кишечника дождевых червей как основных аккумуляторов почвенной микрофлоры.

2. Сравнить физиолого-биохимические свойства штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из разных местообитаний.

**Научная новизна работы.** Показаны новые местообитания микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae* в природной среде: насекомые – растения – почва.

Впервые показано, что микробоценоз медоносных пчел включает не менее 18 видов, представителей 10 родов сем. *Enterobacteriaceae*; в составе микробоценозов вегетативной и генеративной частей медоносных растений обнаруживается не менее 14 видов, представителей 9 родов семейства *Enterobacteriaceae*; энтерофлора дождевых червей включает не менее 12 видов, представителей 9 родов сем. *Enterobacteriaceae*.

Впервые выявлена возможная резервуарная роль субстратов муравейников в отношении энтеробактерий.

Впервые показаны различия физиолого-биохимических свойств штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из резервуаров «почва-растения» и «насекомые-человек», которые отличались адаптационными свойствами и параметрами, определяющими их потенциальную патогенность.

### **Практическая значимость работы.**

Результаты исследований могут быть использованы экологами и микробиологами, зоологами, ботаниками и энтомологами, а также эпидемиологами для поиска бактерий с «непрофессиональным» паразитизмом, при разработке эффективных противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Характеристика пейзажа общей энтерофлоры пчел может способствовать рациональному подбору оптимальных антимикробных препаратов для лечения болезней этих насекомых.

Различия в литической активности клебсиеллезного бактериофага по отношению к штаммам из групп «почва-растения» и «насекомые-человек» показывают необходимость расширения пула фагов, входящих в состав препарата, за счет «природных» штаммов, с целью повышения его валентности и литической активности.

Выявленные особенности разнообразия «природных» штаммов энтеробактерий открывают новые направления исследования структуры популяций различных возбудителей сапронозов.

Полученные данные могут быть включены в программу спецкурсов и учебные пособия по экологии потенциально-патогенных микроорганизмов.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* являются естественными компонентами консорциев: насекомые – растения – почва.
2. Общая микрофлора медоносных пчел включает не менее 18 видов, представителей 10 родов сем. *Enterobacteriaceae*.
3. Вегетативная и генеративная части медоносных растений содержат не менее 14 видов, представителей девяти родов сем. *Enterobacteriaceae*.
4. Энтеробактерии девяти родов с доминированием р. *Klebsiella* и р. *Citrobacter* обнаруживаются в пищеварительной системе дождевых червей.
5. Штаммы клебсиелл, выделенные из различных природных источников, отличаются физиолого-биохимическими свойствами, что позволяет объединить их в группы по местообитанию.

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на VIII Всероссийском популяционном семинаре «Популяции в пространстве и во времени» (Н. Новгород, 2005), научной конференции «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний» (Н. Новгород, 2006), на 10-й Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пущино, 2006), Всероссийской научной конференции "Современные проблемы медицинской микробиологии" (Санкт-Петербург, 2007), XII Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучные дисциплины) (Н. Новгород, 2007), III Всероссийской научной конференции «Принципы и способы сохранения биоразнообразия» (Йошкар-Ола, 2008), XIII Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучные дисциплины) (Н. Новгород, 2008), IV международной научно-практической конференции «Научное пространство Европы - 2008» (София, 2008), I Всероссийском, с международным участием конгрессе студентов и аспирантов биологов «Симбиоз - Россия 2008» (Казань, 2008).

По материалам диссертации опубликовано 18 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа в объеме 144 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы и приложения (17 страниц). Диссертация иллюстрирована 30 рисунками и 15 таблицами. Библиографический указатель включает 175 источников литературы (112 отечественных и 63 иностранных).

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.б.н. Речкину А.И. за профессиональные советы, квалифицированную помощь и поддержку при написании диссертации, а также к.б.н. Г.Н. Ладыгиной, д.м.н. Н.А. Добротиной, д.м.н. И.В. Соловьевой, к.б.н. А. Мочеловой, Ю. Мацковой за участие и рекомендации; зав. кафедрой и директору НИИМБРЭ д.б.н. В.В. Новикову и декану биологического ф-та д.б.н. А.П. Веселову за предоставление базы для исследований; к.б.н. Г.А. Кравченко за помощь при подготовке к защите; зав. лабораторией Р.В. Власовой за поддержку и понимание; к.б.н. А. Бабаеву, к.б.н. О. Уткину, А. Нижегородцеву за советы; а также А. Игнатову и своей семье за моральную и материальную поддержку.

# СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Глава 1. Обзор литературы

В данной главе рассматриваются современные представления об экологии потенциально-патогенных микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*, возможные природные местообитания и участники циркуляции энтеробактерий в консорции: насекомые – растения – почва.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

### 2.1. Материалы исследования.

Материалы исследования были отобраны в периоды цветения медоносных растений на нескольких экспериментальных площадках в 8 районах Нижегородской области в радиусе 2 км от пасек. Материалами исследования служили:

1) пчела медоносная (*Apis mellifera*);

2) типичные для Нижегородской области медоносные растения: кипрей узколистный (*Chamaenerium angustifolium* (L) Scop; липа сердцевидная (*Tilia cordata* Mill.); клевер луговой (*Trifolium pratense* L.); одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.); малина обыкновенная (*Rubus idaeus* L.). У медоносных растений исследовали энтерофлору генеративной и вегетативной частей;

3) растительные компоненты куполов муравейников (*Formica* (s.str.) *aquilonia* Yarr., *Formica*(s.str.) *pratensis* Retz.), поверхность листьев растений вблизи муравейников;

4) содержимое кишечника дождевого червя (*Lumbricus terrestris* L.).

Пробы представляли собой суспензии микроорганизмов, полученные в результате смыва с поверхности листьев медоносных растений, компонентов муравейников; разведения содержимого кишечника дождевых червей в физиологическом растворе; дезинтеграции пчел (5—6 особей), тканей листьев, стеблей и цветов медоносных растений. Все манипуляции проводились с соблюдением правил асептики.

5) 19 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, изолированных из различных природных местообитаний.

## 2.2 Методы исследования.

2.2.1. Выделение бактерий сем. *Enterobacteriaceae* проводили на питательных средах: Эндо, Плоскирева, Висмут-сульфит агар, Олькеницкого. Идентификация микроорганизмов проводилась с использованием пластин биохимических, дифференцирующих энтеробактерии (ПБДЭ). Результаты интерпретировали по схемам и таблицам Определителя бактерий Берджи (1998).

2.2.2. Изучение физиологических свойств штаммов клебсиелл, характеризующих их адаптационные возможности:

2.2.2.1. Анализ азотфиксирующей активности – по способности к росту на элективной безазотной среде Эшби (Блохина, 1986).

2.2.2.2. Установление чувствительности штаммов к различным концентрациям хлористого натрия в среде (2,5% и 6,5%) на селективном питательном бульоне (Блохина, 1986).

2.2.2.3. Оценка чувствительности штаммов к действию эфирных масел (мятное, гвоздичное, кориандровое, скипидар, цитраль, эвкалиптовое, лавандовое) — методом репликаций (для водонерастворимых лекарственных средств) (Фармацевтические методы..., 1997).

2.2.2.4. Изучение антагонистических или синергетических взаимодействий исследуемых штаммов со стандартным штаммом *E. coli M17*, продуцирующим бактериоцины (Блохина, 1986).

2.2.3. Исследование факторов патогенности штаммов.

2.2.3.1. Лецитиназную (Бергер, 1982) и гемолитическую (Бухарин, 2005), ДНК-азную и фосфатазную активность оценивали методом посева на специальные питательные среды: желточный, кровяной агар, среды с добавлением ДНК и фосфатов (Приказ №535).

2.2.3.2. Определяли способность к адгезии на эритроцитах человека по методу Брилиса (Брилис, 1986).

2.2.3.3. Для поиска генов термостабильного и термолабильного токсинов энтеробактерий проводили ПЦР с использованием тест-системы "E.coli tox (LT, ST)"; для обнаружения шигаподобных токсинов 1-го и 2-го типов, определяющих



патогенность энтеробактерий — ПЦР с использованием тест-системы "E.coli tox (VT-1, VT-2)" (Жеребцова, 2007).

2.2.3.4. Тестировали исследуемые культуры на чувствительность к 18 антибиотикам различных классов (НИЦФ, Санкт-Петербург) стандартным диско-диффузионным методом (Маркова, 2005).

2.2.3.5. Оценка возможности применения поливалентных бактериофагов («ИмБио», Н.Новгород) против потенциально-патогенных штаммов клебсиелл по методу Аппельмана (Габрилович, 1968).

2.2.4. Статистическая обработка результатов с помощью программ *Microsoft Excel, Statistica 5.11*.

### **Глава 3. Результаты и их обсуждение**

#### **3.1. Поиск местообитаний энтеробактерий в природной среде**

В настоящей работе представлены результаты поиска природных местообитаний энтеробактерий в системе: насекомые—растения—почва. Проанализировано более 480 проб природных субстратов. Всего идентифицировано 1154 штамма бактерий сем. *Enterobacteriaceae*, представителей 10 родов.

Представители семейства *Enterobacteriaceae* обнаружены во всех исследуемых субстратах. Изолированные культуры идентифицировали как представители родов *Serratia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Escherichia*, *Erwinia*. Наиболее часто во всех субстратах обнаруживали бактерии родов *Erwinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*.

Выявлено разнообразие природных местообитаний энтеробактерий, в качестве которых могут выступать: кишечник дождевых червей, субстраты муравейников, медоносные растения, пчелы.

#### **3.2. Спектр энтеробактерий в составе микробоценоза медоносных пчел**

Впервые проведен целенаправленный анализ микробоценоза медоносных пчел с целью характеристики пейзажа энтеробактерий. Спектр энтеробактерий в составе микробоценоза пчёл оказался более разнообразным, чем описывалось ранее, и включал 18 видов, представителей 10 родов семейства *Enterobacteriaceae* (рис. 1).

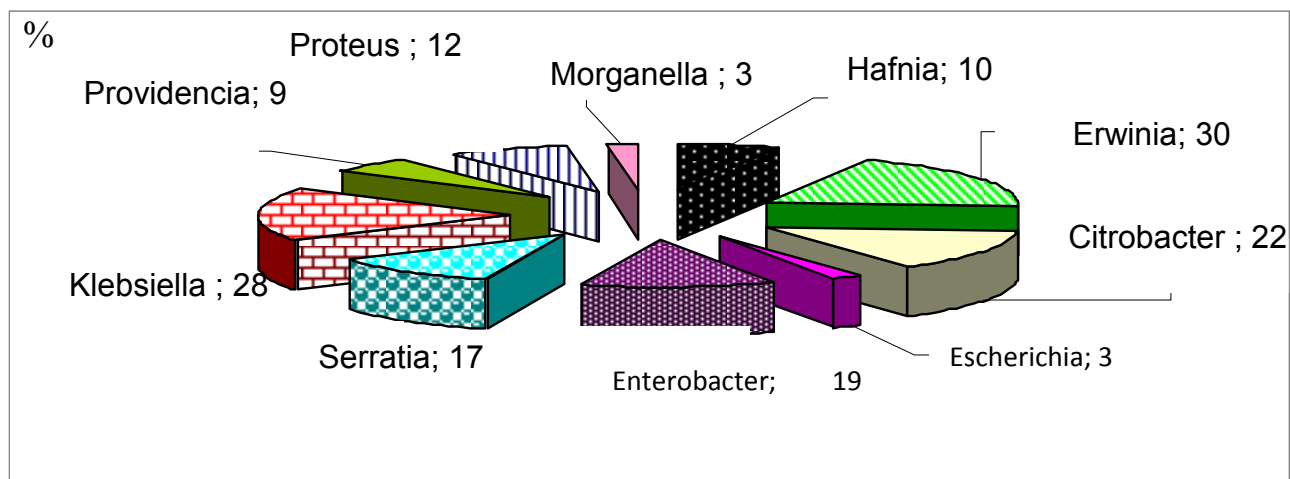


Рис. 1. Спектр родов энтеробактерий в составе общей микрофлоры пчел

Подобный феномен, на наш взгляд, объясняется способностью пчел в процессе медосбора посещать большие территории, контактируя с различными медоносными растениями, микрофлора которых также весьма разнообразна, что подтверждают наши дальнейшие исследования. Так, в составе микрофлоры пчел особенно часто присутствовали эрвинии (30%). Эти же бактерии преобладали в энтерофлоре цветов медоносных растений: одуванчик (78%), малина (57%), липа (46%). Впервые в микробоценозе пчел обнаружены бактерии родов *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*, что расширило теоретические представления об энтерофлоре этих насекомых.

При сравнении видового разнообразия энтеробактерий пчел и медоносных растений (критерий Манна-Уитни) показаны статистически значимые различия ( $p=0,02$ ), что может свидетельствовать о специфике данных местообитаний, но не исключает циркуляции энтеробактерий в трофической системе: пчелы – медоносные растения.

Обращает на себя внимание высокая встречаемость в природных местообитаниях микроорганизмов-«лидеров» инфекционной патологии человека, таких как *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*. Среди названных групп обнаружены следующие виды: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*.

### 3.3. Медоносные растения как резервуар энтеробактерий в природе

Микробоценозы медоносных растений, тем более возможность их быть резервуаром для энтеробактерий изучены крайне недостаточно. Согласно данным

настоящего исследования, в составе энтерофлоры медоносных растений обнаружены 14 видов, представителей девяти родов семейства *Enterobacteriaceae*.

При сравнении видового разнообразия энтеробактерий на вегетативной и генеративной частях медоносных растений статистически значимых различий не обнаружено. Микрофлора вегетативных частей медоносных растений представлена энтеробактериями р. *Erwinia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Enterobacter* (рис. 2).

Исследование внутритканевой микрофлоры показало присутствие в тканях листьев таких родов энтеробактерий, как *Erwinia*, *Escherichia* и *Citrobacter*. Описаны случаи выделения из филлосферы и тканей растений штаммов цитробактера, способных к азотфиксации, что обеспечивает их выживание в средах с недостатком азота (Andrews, 1991).

В составе микробоценоза генеративной части медоносных растений обнаружены энтеробактерии р. *Erwinia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, а также микроорганизмы р. *Klebsiella*, р. *Providencia* и р. *Proteus*. При этом у всех исследованных видов растений выявлены микроорганизмы родов *Klebsiella*, *Citrobacter* и *Enterobacter*, что, возможно, связано с химическим составом цветков, их сигнальными метаболитами: тритерпеновые соединения; витамины В, А, С; минералы (железо, магний, калий, бор, сера и др.), являющимися аттрактантами для определенных штаммов (Ленгелер, 2005).

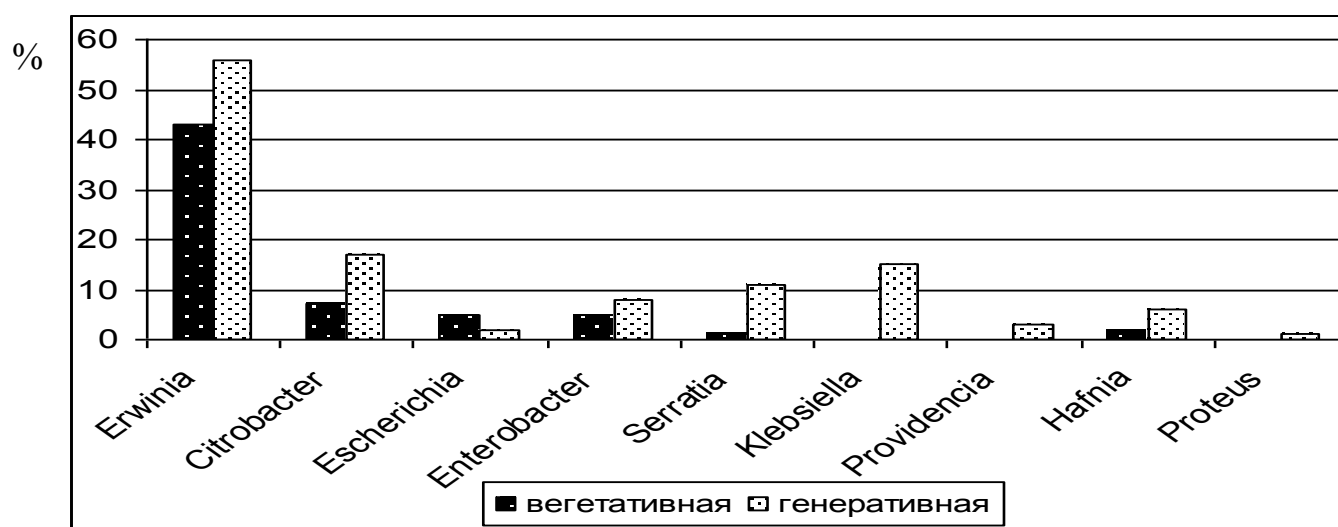


Рис. 2. Спектр родов энтеробактерий на вегетативной и генеративной частях медоносных растений

Среди обнаруженных микроорганизмов по частоте выделения доминировали бактерии рода *Erwinia*. *Erwinia herbicola* является типичным эпифитным патогенным галлообразующим микроорганизмом, широко распространенным среди растений (Покровский, 1999). Эрвинии изолированы нами со всех исследованных групп растений, что свидетельствует о способности эпифитных микроорганизмов жить на различных растениях, и не противоречит известным фактам о специфической приспособленности эпифитов-симбионтов или эпифитов-паразитов к определенным растительным организмам (Zinniel, 2002).

В составе микробоценоза медоносных растений обнаружены представители тех же родов энтеробактерий, что и в микрофлоре медоносных пчел. Вышесказанное позволяет рассматривать медоносные растения в качестве потенциальных резервуаров энтеробактерий в природной среде и возможных участников циркуляции диких штаммов в системе медоносные растения–пчелы.

#### **3.4. Исследование энтерофлоры содержимого кишечника дождевых червей**

Одним из постоянных местообитаний энтеробактерий является почва. Показана роль почвенных беспозвоночных, в частности, дождевых червей в аккумуляции микроорганизмов почвы (В.А. Бызов, 2005). В настоящей работе оценивали потенциальную возможность дождевых червей быть природным резервуаром энтеробактерий.

Выявлено, что микробоценоз пищеварительного тракта дождевых червей включает 12 видов, представителей девяти родов сем. *Enterobacteriaceae*, среди которых достоверно чаще обнаруживаются *Citrobacter* (40%) и *Klebsiella* (37%) (рис.3). Из содержимого кишечника дождевых червей изолированы *Hafnia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Erwinia spp.*, *Escherichia spp.*

При пассаже через пищеварительный тракт дождевых червей возможен не только рост численности бактериальных популяций, но и активизация покоящихся клеток, некультивируемых форм бактерий, персистирующих в почве и не обнаруживаемых классическими микробиологическими методами (Бызов, 2005), чем,

на наш взгляд, может объясняться разнообразие энтеробактерий, обнаруженных в кишечном содержимом дождевых червей.

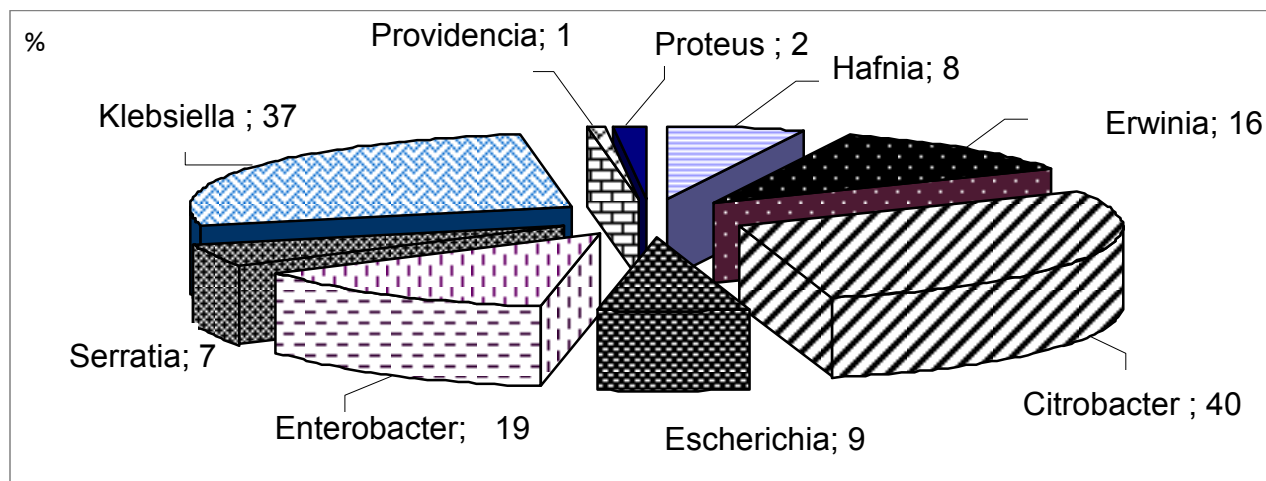


Рис. 3. Спектр родов энтеробактерий в содержимом кишечника дождевых червей

Обращает внимание значительная обсемененность червей представителями родов *Citrobacter* (40%), *Klebsiella* (37%), *Enterobacter* (19%), *Erwinia* (16%), также наиболее часто выделяющимися из растений и пчел. По-мнению ряда исследователей, именно почва является естественным резервуаром для многих возбудителей сапронозов. Растения служат источником инфицирования наземных животных и являются звеном, выносящим возбудителей из почвы, где они постоянно обитают, в наземные экосистемы (Бухарин, Литвин, 1997).

### 3.5. Исследование пейзажа энтеробактерий в компонентах муравейника и филлосфере соседствующих растений

Другим звеном выноса микроорганизмов из почвы могут быть муравейники. Муравейники – специфические биотопы, формирующиеся в почвенном и надпочвенном ярусах и достигающие в лесных экосистемах высокой плотности. Кроме того, растительные компоненты (хвоя и кора голосеменных растений), которые составляют основную массу субстратов купола исследуемых нами муравейников, содержат эндосимбионтов сем. *Enterobacteriaceae* (Duncan, 1972). Постройки муравьев как специфические местообитания отличаются от интактной почвы не только обогащением органикой, особым микроклиматом, но и

механическим составом материала гнезда, представляющего собой рыхлый, грубогумусированный субстрат (Корганова, Рахлеева, 2005).

Известно, что многие виды муравьев поддерживают высокоразвитые симбиотические отношения с другими насекомыми и растениями, что, на наш взгляд, может способствовать распространению микрофлоры, сосредоточенной в их гнездах.

Поиск энтеробактерий в микробоценозе муравейников проведен впервые. Показано, что субстраты муравейников содержат микроорганизмы 11 видов и семи родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Erwinia* spp., *Escherichia* spp. — и могут выступать в качестве природного местообитания энтеробактерий.

Следует отметить, что субстраты муравейников и филлосфера соседствующих растений весьма сходны по микробному пейзажу (*p. Enterobacter* выделен в 44 и 67% соответственно), что, вероятно, является следствием тесных трофических взаимоотношений в системе «муравейник—растения» (рис.4).

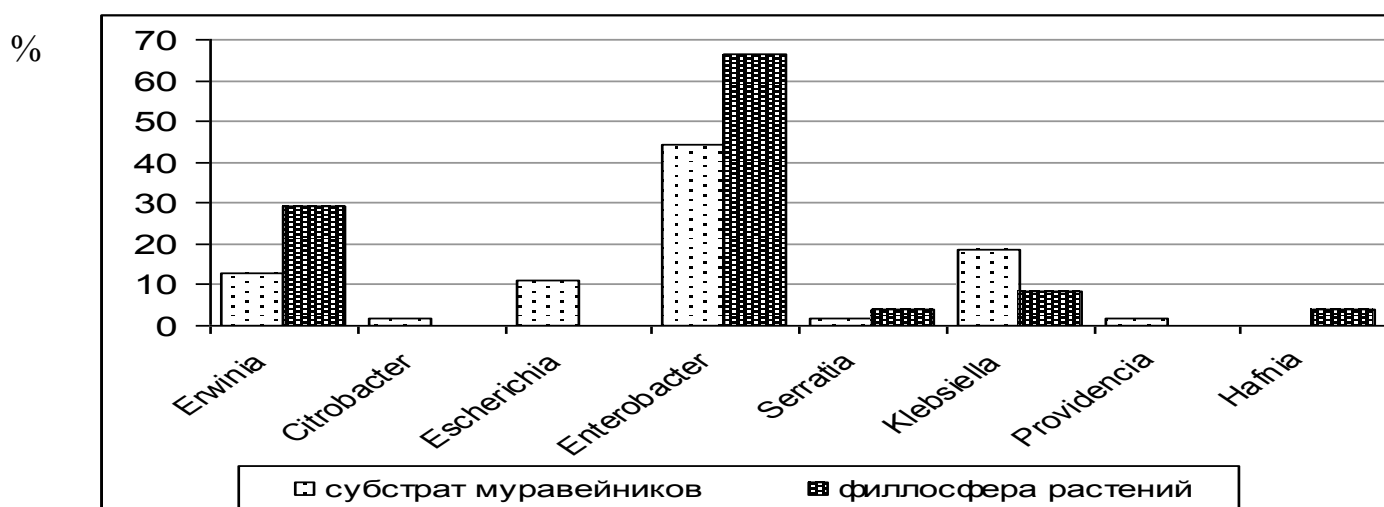


Рис. 4. Представители родов энтеробактерий в субстратах муравейников и филлосфере соседствующих растений

Компоненты муравейников представляют собой систему, обеспечивающую важнейшие в биогеоценотическом плане процессы, в том числе и процесс фиксации молекулярного азота, осуществляемый энтеробактериями.

Микрофлора субстратов муравейников оказалась во многом идентична энтерофлоре дождевых червей, что может быть связано, с одной стороны, с условиями обитания муравьев, с другой — с несомненным богатством органических

субстратов муравейников, близким по составу с органическим веществом почвы, утилизируемым дождевыми червями.

### 3.6. Распространение энтеробактерий в природной системе «насекомые—растения—почва»

Выявлено разнообразие природных местообитаний (дождевые черви, субстраты муравейников, медоносные растения, пчелы), где энтеробактерии являются естественными обитателями, осуществляющими определенную биологическую роль.

При сравнении наиболее часто обнаруживаемых во всех исследуемых субстратах родов энтеробактерий, таких как *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Citrobacter* показано статистически достоверное доминирование микроорганизмов рода *Erwinia* в энтерофлоре медоносных растений и бактерий родов *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Citrobacter* в пищеварительном тракте дождевых червей (рис. 5).

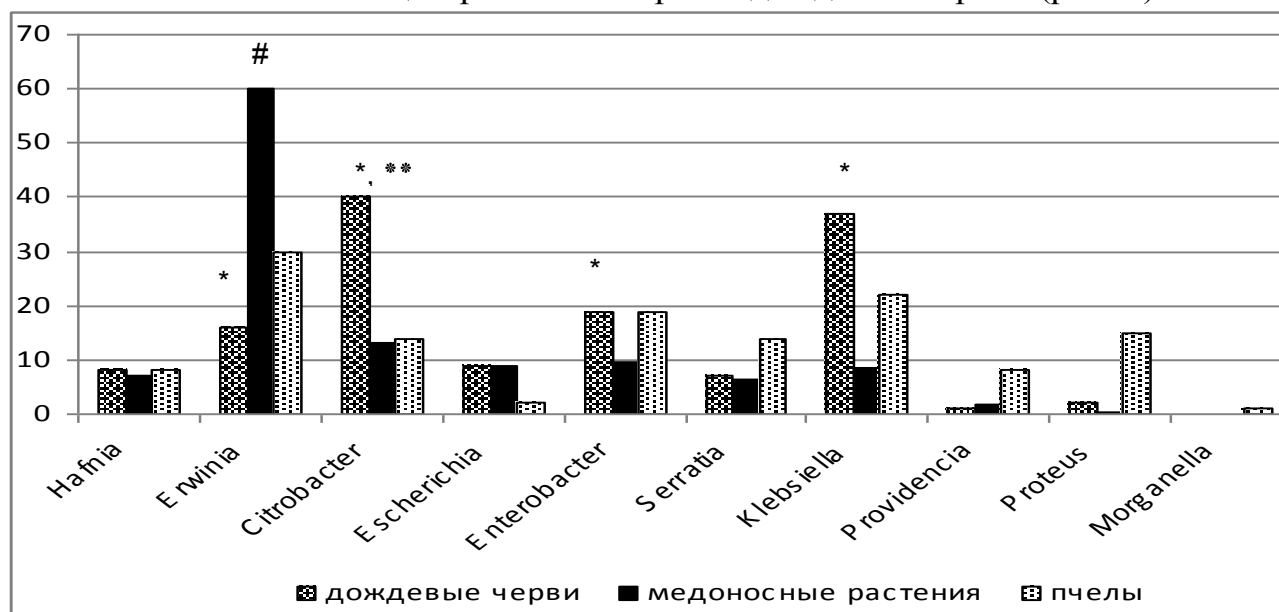


Рис. 5. Соотношение родов энтеробактерий в исследуемых местообитаниях

(\* - достоверные различия частот встречаемости микроорганизмов в местообитаниях дожд.черви – медоносные растения; \*\* - достоверные различия частот встречаемости микроорганизмов в местообитаниях дожд.черви – пчелы; # - достоверные различия частот встречаемости микроорганизмов в местообитаниях пчелы – медоносные растения)

Достаточно частое выявление вышеназванных родов энтеробактерий в системе «насекомые—растения—почва» позволяет предположить их функциональную значимость в исследуемых местообитаниях.

Таблица 1

## Видовое разнообразие энтеробактерий в исследуемых местообитаниях (%)

Исследуемый субстрат	Количество обследованных проб	Количество проб, содержащих энтеробактерии	Количество проб, содержащих бактерий вида... (%)																						
			<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter intermedium</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia ficaria</i>	<i>Serratia plymutica</i>	<i>Morganella morganii</i>
Субстрат муравейников	57	38 (67%)	18	5	-	3	3	-	-	-	18	-	50	8	3	3	-	16	-	-	-	-	3	-	-
Растения вблизи муравейников	24	17 (71%)	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	-	6	-	-	12	-	6	-	-	-	6	-
Дождевые черви	105	93 (89%)	16	1 1	35	-	1	-	2	-	10	-	17	3	-	-	-	10	9	9	7	-	-	-	-
Пчелы	89	82 (92%)	33	1 6	8	-	1	8	6	8	4	-	17	-	2	2	1	22	12	1 2	17	4	-	-	4
Медоносные растения	205	130 (63%)	79	3	16	-	-	3	2	-	3	2	9	-	-	-	2	2	3	6	9	2	-	-	-
Всего	480	360 (75%)	39	9	16	1	1	3	3	2	6	1	18	2	1	1	1	11	7	8	9	2	1	1	1



Сравнение видового разнообразия энтеробактерий исследуемых местообитаний оценивали с помощью меры Уиттекера, позволяющей дифференцировать местообитания по степени «благоприятности» для энтеробактерий. Степень «благоприятности» местообитания определяет диапазон доступных бактериям ресурсов, которые могут быть использованы большим числом видов. Так, наиболее «благоприятным» местообитанием энтеробактерий является организм медоносных пчел (табл.1). Возрастание в сообществе межвидовой конкуренции повышает вероятность, что имеющиеся ресурсы будут использоваться полностью. Менее «благоприятными» местообитаниями для энтеробактерий являются растительные субстраты муравейников и растения вблизи них. В связи с тем, что часть ресурсов не используется, видовое разнообразие этих сообществ беднее, чем в более «благоприятных» сообществах.

### 3.7. Изучение физиолого-биохимических свойств штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из различных местообитаний

#### 3.7.1. Распространение бактерий *Klebsiella sp.* в исследуемых природных субстратах

На сегодняшний день бактерии *Klebsiella spp.* входят в число основных возбудителей внутрибольничных инфекций, заболеваний различного характера. В ходе исследования клебсиеллы изолированы из 20% проб всех исследованных субстратов и обнаруживались в энтерофлоре изученных объектов с разной частотой (рис. 6), во всех исследуемых субстратах клебсиеллы составляли значительную долю изолятов.

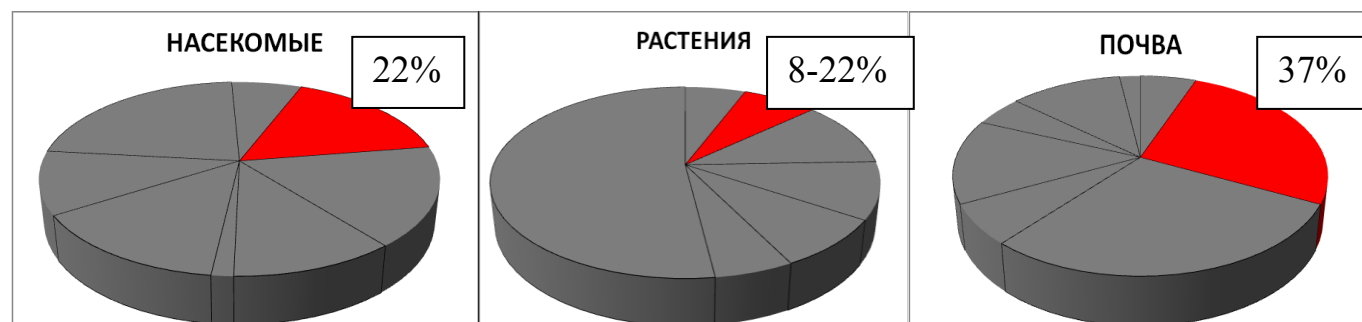


Рис. 6. Распространение бактерий р.*Klebsiella* в природных местообитаниях

Вышесказанное послужило основанием к дальнейшему изучению их биологических свойств.

Всего исследовано 19 штаммов *Klebsiella pneumoniae* из разных местообитаний, в том числе 2 штамма изолированы от больных людей, 4 – от пчел, 4 — от растений, 5 — из кишечного содержимого дождевых червей и 4 — из субстратов муравейников.

### **3.7.2. Изучение адаптационных возможностей штаммов *Klebsiella pneumoniae***

Согласно полученным данным, штаммы *Klebsiella pneumoniae* были объединены в 2 группы, связанные с местообитанием: «почва—растения», «насекомые—человек».

Исследование физиолого-биохимических свойств изолированных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, определяющих их адаптационные возможности: азотфиксирующей активности, было направлено на выявление устойчивости к высокой концентрации хлористого натрия в среде, действию эфирных масел, бактериоцинам *E. coli*.

Слабый рост или его отсутствие на безазотистой среде Эшби отмечен у штаммов, изолированных от растений и дождевых червей.

Устойчивость к высокой концентрации хлористого натрия (6,5%) в среде отмечена у 63% исследуемых штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Чувствительность наблюдалось преимущественно у культур, изолированных от дождевых червей. Таким образом, штаммы *Klebsiella*, изолированные из местообитаний «почва—растения» оказались достоверно менее адаптированными к отсутствию источников азота и высокой концентрации хлористого натрия в среде.

В поддержании видового разнообразия бактериальных популяций также велико значение антагонизма. Микроорганизмы, продуцирующие бактериоцины, могут полностью изымать из сообщества отдельные виды бактерий (Алимов, 1992). Из-за антагонизма численность видов может поддерживаться на низком уровне, что приведет к снижению межвидовой конкуренции, а это, в свою очередь, может явиться причиной повышения видового разнообразия. Исследования антагонистической активности *E.coli* M17, продуцирующей колицины, были направлены на оценку выживаемости и конкурентоспособности разных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Способность колицинов подавлять рост клебсиелл показана

для культур, изолированных от растений и дождевых червей, остальные штаммы оказались резистентными к данным бактериоцинам.

Штаммы из группы «насекомые—человек» обладали большей устойчивостью к действию практически всех эфирных масел, чем представители группы «почва—растения».

Выявлено биоразнообразие адаптационных возможностей штаммов клебсиелл, выделенных из различных местообитаний: 63% исследуемых штаммов оставались жизнеспособными в средах с высокой концентрацией солей, 67% — при отсутствии доступного азота, 52% — резистентны к антимикробному действию эфирных масел и 84% — к действию колицинов. Исследование адаптационных способностей показало правомочность объединения изучаемых штаммов в группы по местообитанию.

### **3.8.2. Исследование потенциальной патогенности штаммов *Klebsiella pneumoniae***

Дифференциацию штаммов *Klebsiella pneumoniae* на 2 группы по местообитанию подтверждают и данные по изучению факторов патогенности.

ДНК-азная активность обнаружена у 37% штаммов, большинство из которых изолированы из кишечного содержимого дождевых червей. Аналогичная способность показана для ряда штаммов, выделенных от растений, что, с нашей точки зрения, может объясняться циркуляцией энтеробактерий в системе «почва—растения», где растения служат звеном, выносящим популяции микроорганизмов из почвы. Кроме того, у штаммов из группы «почва—растения» обнаружена лецитиназная и гемолитическая активность (рис. 7).

Разнообразные ферменты — факторы патогенности (ДНКаза, лецитиназа, гемолизины, фосфатаза), обнаруженные нами у штаммов *Klebsiella pneumoniae*, изолированных преимущественно из местообитаний «почва—растения», согласуются с мнением Бухарина О.В. и Литвина В.Ю. (1997) о том, что в природной среде сосредоточено биоразнообразие генетических вариантов микроорганизмов.

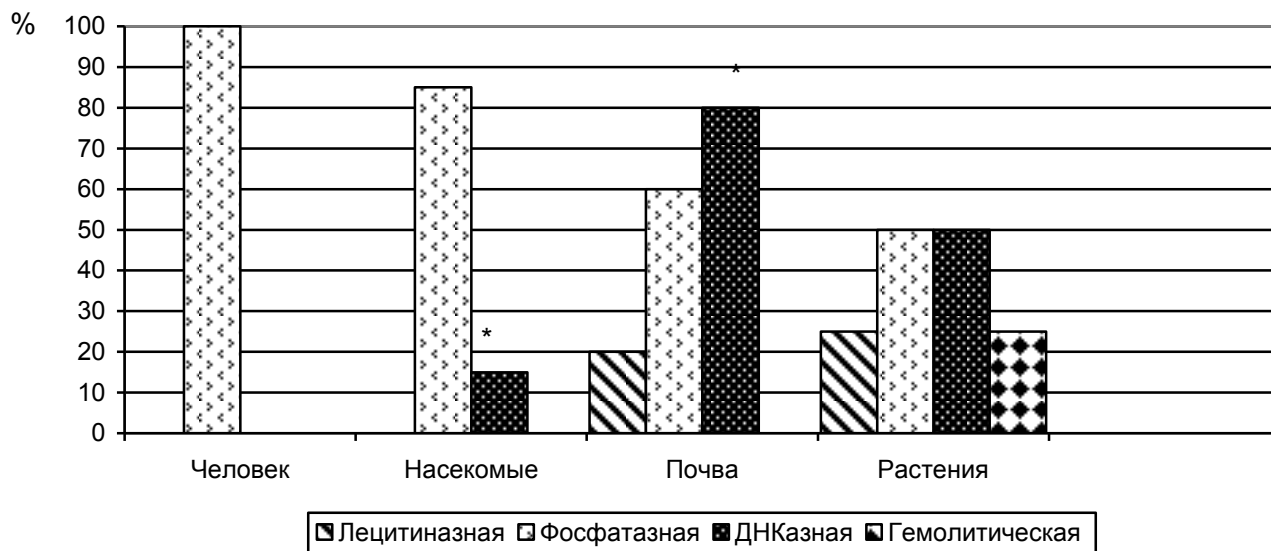


Рис. 7. Количество штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из различных природных местообитаний, обладающих ферментами - факторами патогенности

(\* - достоверные различия)

По способности адгезироваться на эритроцитах человека исследуемые штаммы также можно разделить на 2 группы. Низкая и средняя степень адгезивности отмечена у штаммов, изолированных от насекомых.

Способность к адгезии иногда может иметь решающее значение для успеха в борьбе за существование, кроме того, адгезивная активность является одним из важнейших факторов, обуславливающих патогенность бактерий и развитие патологического процесса. Специфичность адгезии обусловлена наличием комплементарных структур у адгезинов микробов и лигандов чувствительных к ним эукариотических клеток макроорганизма.

Циркуляция штаммов *Klebsiella pneumoniae* у медоносных пчел — в ближайшем окружении человека, в дальнейшем может привести к модификации генов, ответственных за адгезию и повысить степень проявления этого фактора патогенности.

Поскольку бактерии р. *Klebsiella* все чаще вносят свой вклад в этиологию внутрибольничных заболеваний, возрос интерес к использованию специфических бактериофагов для лечения и профилактики ряда инфекций, в том числе, и вызванных *Klebsiella pneumoniae*.

Проведённые исследования позволяют предположить наличие двух групп штаммов, так называемых «человеческих» и «природных», по отношению к которым показана статистически достоверная дифференциация литической активности фага. Это подтверждает положение о специфике рецепторов фага к определенным комплементарным поверхностным структурам клеточных стенок бактерий, выделенных из различных субстратов.

Обращает на себя внимание феномен лизиса бактериофагом штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от насекомых, что заставляет предполагать идентичность поверхностных структур этих штаммов и штаммов, изолированных от человека.

Не менее четко дифференциация штаммов на две группы в зависимости от их местообитания прослеживается и при исследовании антибиотикорезистентности. Спектр антибиотикорезистентности шире у штаммов из группы «почва—растения». Выявлено достоверное различие резистентности к аминогликозидам штаммов из разных групп (рис.8).

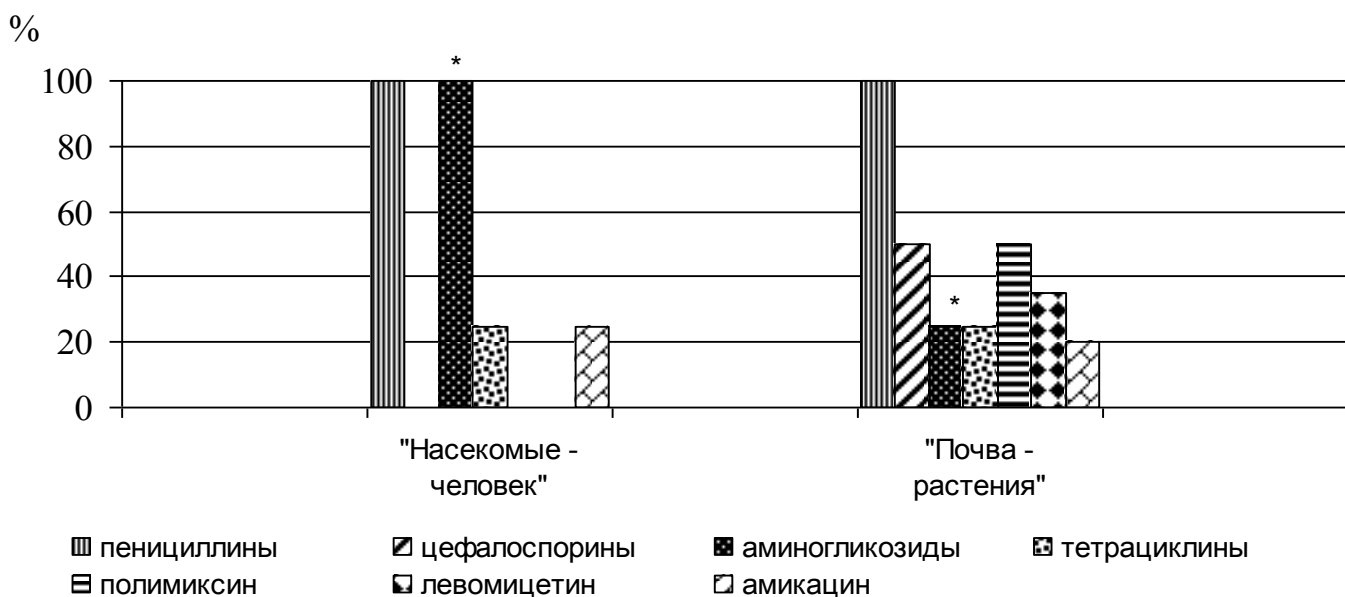


Рис. 8. Доля штаммов *Klebsiella pneumoniae*, устойчивых к антимикробным препаратам (%) (\*- достоверные различия)

Все исследуемые штаммы были полирезистентны к антимикробным препаратам: 63% — к 6—9 препаратам одновременно, 37% — к 4—5 препаратам. Наибольшая устойчивость отмечена к карбенициллину, азлоциллину, ристомичину, линкомицину, фузидину.

По-мнению Ленгелера, проблема антибиотикорезистентности — это проблема эпидемии генов резистентности в глобальных сетях экосистем микроорганизмов (Ленгелер, 2005). Распространение генов резистентности обуславливает биоразнообразие популяций бактерий в природных сообществах, характеризующееся наличием плазмид резистентности.

Поиск генов - факторов патогенности энтеробактерий, кодирующих термолабильный, термостабильный токсины и шигоподобные цитотоксины, не выявил положительных вариантов среди исследуемых штаммов.

Таким образом, показано биоразнообразие штаммов, изолированных из различных природных местообитаний, по адаптационным способностям и свойствам, определяющим потенциальную патогенность (рис. 9).

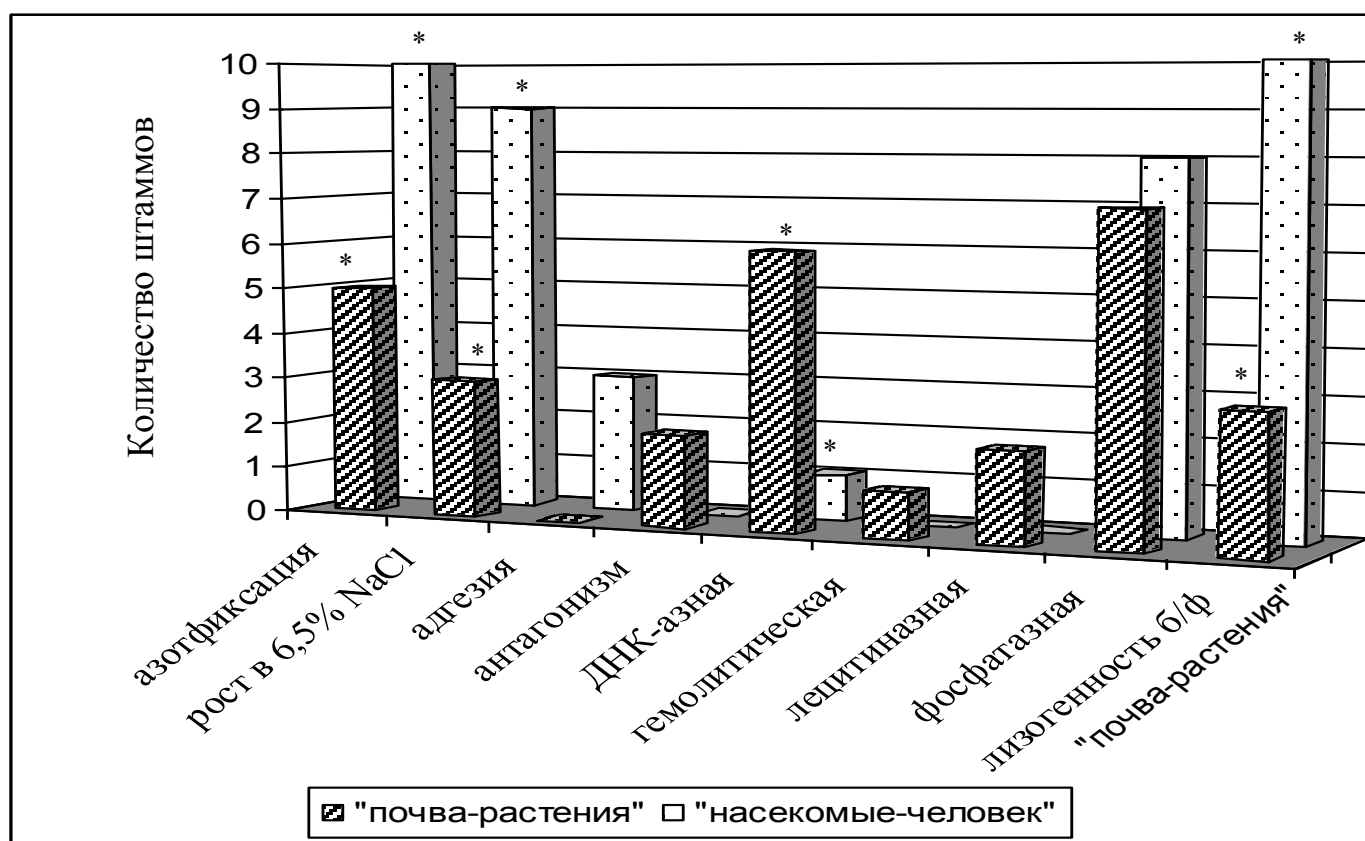


Рис. 9. Биоразнообразие штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из природных местообитаний (\*- достоверные различия)

Внутривидовое биоразнообразие штаммов *Klebsiella pneumoniae* обеспечивается, скорее всего, популяционными механизмами, в основе которых лежит исходная гетерогенность популяции по любому из жизненно-важных признаков.

Селективные процессы, происходящие при попадании в новую среду обитания, не уничтожают эту гетерогенность, а как бы «смещают» ее в соответствующем направлении путем изменения процентного соотношения особей с адекватными среде свойствами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природная среда – основной резервуар для микроорганизмов-возбудителей сапронозов, среди которых особое значение имеет семейство *Enterobacteriaceae*. Обладая широким диапазоном экологической толерантности данные микроорганизмы способны занимать различные экологические ниши, в том числе быть участниками консорциев насекомые—растения—почва. В данной работе расширены теоретические представления о возможных природных местообитаниях энтеробактерий, среди которых отмечены: пчелы, медоносные растения, компоненты муравейников, содержимое кишечника дождевых червей.

Показано биоразнообразие энтеробактерий в исследуемых местообитаниях. Наиболее часто во всех местообитаниях обнаруживались бактерии родов *Erwinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, что может свидетельствовать об их функциональной значимости. Биоразнообразие энтеробактерий выявлено и внутри популяции штаммов *Klebsiella pneumoniae*, изолированных из различных местообитаний. Физиолого-биохимические признаки и степень проявления факторов патогенности позволили объединить исследуемые штаммы в группы по местообитанию: «почва—растения», «насекомые—человек», что согласуется с позицией В.Ю. Литвина и В.О. Бухарина (1997) о двух параллельно существующих частях популяции условно-патогенных микроорганизмов – внеорганизменной и организменной, причем внеорганизменная (природная) — является доминирующей.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено биоразнообразие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в природных местообитаниях (пчелы, медоносные растения, субстраты муравейников и дождевые черви). Идентифицированы представители родов *Serratia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Escherichia*, *Erwinia*. Наиболее часто во всех субстратах выявлялись бактерии родов *Erwinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*.

2. Показано, что микробоценоз медоносных пчел включает не менее 18 видов энтеробактерий, представителей 10 родов. Впервые в составе энтерофлоры пчел обнаружены микроорганизмы родов *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*.

3. В состав микрофлоры вегетативной и генеративной частей медоносных растений входят не менее 14 видов энтеробактерий, представители 9 родов с доминированием микроорганизмов р. *Erwinia*.

4. В микробоценозе кишечника дождевых червей обнаружены 12 видов энтеробактерий, представители 9 родов, и установлено доминирование микроорганизмов *Klebsiella spp.* и *Citrobacter spp.*

5. Выявлено биоразнообразие штаммов *Klebsiella pneumoniae* по физиолого-биохимическим признакам и факторам патогенности, позволяющее объединить их в группы, связанные с местообитанием: «почва-растения», «насекомые-человек».

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

1. Речкин А.И. Поиск новых резервуаров для персистенции и участников циркуляции энтеробактерий в естественных экосистемах / Речкин А.И., Евтеева Н.И. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2007, №6. С. 99-103 (принято к печати 23.11.2007).

2. Речкин А.И. Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* в природных сообществах / Речкин А.И., Евтеева Н.И. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2008, Т. 1. С. 222-225.



## **II. Статьи, доклады, тезисы докладов региональных и всероссийских конференций:**

1. **Евтеева Н.И.** Энтеробактерии в ближайшем окружении человека / Евтеева Н.И., Речкин А.И. // Популяции в пространстве и во времени. Сборник материалов VIII Всеросс. популяцион. семинара. Н. Новгород, 2005. С.89-91.

2. Речкин А. И. Пейзаж энтеробактерий разных природных резервуаров / Речкин А. И., **Евтеева Н. И.**, Касаткина Е. О. // Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний. Матер. научн. конференции. Н.Новгород, 2006. С. 59-61.

3. **Евтеева Н.И.** Экологические аспекты существования энтеробактерий / Евтеева Н. И., Речкин А. И. // Материалы Всероссийской научной конференции "Современные проблемы медицинской микробиологии"/ Под ред. А.П. Щербо, В.Д. Бадикова, В.Г. Кубася. СПб.: ГНУ ИОВ РАО, 2007. С.188-189.

4. Чернышева А.Ю. Энтеробактерии как компонент содержимого кишечника дождевых червей (*Lumbricus terrestris* L.) / Чернышева А.Ю., **Евтеева Н.И.** // Сборник материалов III Всеросс. научн. конференции «Принципы и способы сохранения биоразнообразия». Пушино, 2008. С. 95-96.

5. **Евтеева Н.И.** *Klebsiella sp.* в природной среде / Евтеева Н.И., Речкин А.И. //«Научная мысль информационного века – 2008». Прага, 2008. Т. 11. С. 9-11.

6. **Евтеева Н.И.** Компоненты муравейника как потенциальный резервуар энтеробактерий в природной среде // Сборник материалов III Всеросс. научн. конференции «Принципы и способы сохранения биоразнообразия». Пушино, 2008. С. 61-62.

7. **Evteeva N.I.** The new places of reservation *Enterobacteriaceae* in natural systems / Evteeva N.I., Rechkin A.I. // Материалы IV международной научно-практич. конференции «Научное пространство Европы - 2008». София, 2008. Т. 21. С. 28-30.

8. **Евтеева Н.И.** Новые природные резервуары и биологические свойства штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Евтеева Н.И., Речкин А.И. // Сборник науч.тр. I Всеросс., с междунар. участием конгресса студентов и аспирантов биологов «Симбиоз Россия 2008». Казань, 2008. С. 114-119.