



ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579.873.61:579.26

ИСПЫТАНИЕ НОВОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ NOCARDIA И RHODOCOCCLUS

© 2008. Халдун А.О., Нуратинов Р.А.

Аденский государственный университет, Йемен; Дагестанский
государственный университет

Изучены некоторые аспекты экологии групп микроорганизмов, относящихся к нокардиям и родококкам. Установлена убикивитарность этих микроорганизмов. Испытана новая питательная среда при выделении и выращивании изучаемых микроорганизмов, приготовленная на основе геотермальной воды нефенольного класса.

Some aspects of ecology of groups of microorganisms concerning to Nocardia and Rhodococcus have been studied. Universal distribution of these microorganisms has been revealed. The new nutrient medium has been tested at allocation and cultivation of studied microorganisms prepared on the basis of geothermal water of not phenolic class.

Ключевые слова: нокардия, родококки, питательные среды, распространение.

По современной классификации микроорганизмов, роды *Nocardia* и *Rhodococcus* определены в группе 22 (нокардиоформные актиномицеты), в подгруппе 1 (бактерии, содержащие миколовые кислоты) [11].

В Одобренных списках названий бактерий [20] к роду *Nocardia* отнесено 20 видов, которые следует причислить к *Nocardia sensu stricto*, *Rhodococcus*, *Oerscovia* или рассматривать как таксоны неясного систематического положения. Типовым видом является *N.asteroides*.

Род *Rhodococcus* занимает близкое таксономическое положение к нокардиям и микобактериям. Исследованиями по гибридизации ДНК-РНК установлено близкое генетическое родство быстрорастущих микобактерий, нокардий и родококков, а коэффициент S_{AB} *M.phlei* и *R.spp.* настолько высок (0,72), что их характеризуют как отдаленно родственные виды.

Близкий состав и структура химических компонентов обуславливают не менее близкие биологические свойства – более 50 видов микобактерий, 20 нокардий и около 20 видов родококков, по которым не всегда возможно правильно определить родовую принадлежность изолятов, поскольку не существует ни одного признака, четко характеризующего бактерии одного рода. Определенный признак, свойственный 80-100% отдельно взятого вида одного рода микроорганизмов, иногда оказывается характерным для 50% штаммов вида, относящегося к другому роду, что стирает границы их разделения. Поэтому для более точной идентификации порой необходимо использовать многочисленные тесты, изучить химический состав клеток, их культурально-морфологические и физиологические свойства. Экология родов *Nocardia* и *Rhodococcus* изучена недостаточно. Однако считают очевидным, что основным местообитанием нокардий и родококков являются почва и вода. Так, например, в 15-70% образцах почв США и Индии обнаружены нокардии [13]. Особенно часто изолируют нокардии в образцах, снятых в зонах тропического, субтропического и умеренного климата [14]. Показано, что *N.asteroides* выживает как в кислых, так и в щелочных почвах. Полевые почвы оказались более инфицированными, чем садовые, луговые, почвы пустошей [19]. Считают, что такое положение связано с подавлением *N.asteroides* в богатых почвах другими видами микроорганизмов, имеющими большую скорость роста. Чаше изолируют нокардии из верхних слоев почвы, чем из проб, взятых из глубоких слоев, особенно из образцов нефтеносных районов и скважин [8]. Убикивитарность нокардий объясняют их высокой резистентностью к действию ультрафиолетовых лучей и высушиванию, способностью длительное время существовать в среде, лишенной притока питательных веществ. На покровных стеклах они остаются жизнеспособными в течение 2 лет; в дистиллиро-



ванной и водопроводной воде – до 15 месяцев; на соломе – до 6 месяцев [17, 19]. Поэтому существует мнение о том, что их следует причислять к аутохтонной микрофлоре [18].

Также известны данные, утверждающие о том, что нокардии циркулируют в организме животных и человека. Имеются сведения о том, что нокардий обнаружили в организме кровососущих насекомых, воздухе городов и больничных помещений, пыли, пене сточных вод очистных сооружений [13, 15, 16, 18]. Они являются возбудителями нокардиоза человека и животных, патология которого весьма похожа на туберкулезную [10].

Не менее широко распространена в природе группа микроорганизмов, относящаяся к роду *Rhodococcus*. Способность их усваивать многие труднодоступные для большинства других микроорганизмов субстраты (парафины, смолы, фенольные соединения и т.д.) и широкий диапазон температуры роста в средах с высокой концентрацией солей позволяют им обитать в разнообразных водных бассейнах, сточных водах, почвах различных почвенно-климатических зон (даже в арктической) и особенно в местах локализации нефтяных и газовых месторождений [1, 4, 5, 7]. Высокая солеустойчивость позволяет им развиваться в пластовых рассолах с общей соленостью до 250 г/л, в глубоких слоях арктических морей [2]. Основным фактором, дающим родококкам возможность выживать при неблагоприятных для многих других микроорганизмов условиях, считают низкий уровень эндогенного дыхания и накопление ими значительных количеств триглицеридов – запасных энергетических веществ [6].

Разнообразен и видовой состав родококков в различных субстратах. Из окружающей среды наиболее часто изолируют *R. erithropolis*, *R. luteus*, *R. rubropertinctus*, *R. ruber*, *R. maris* и реже *R. bronchialis*, *R. flavus*, *R. rhodnii*, *R. terre* [9]. В грунтовых водах Пермского Предуралья, над контуром нефтеносности обнаружен *R. rhodochrous*, которого не обнаружили там, где нет притока углеводородных газов [4]. В соленых пластовых водах (123-267 г/л) выявили *R. luteus*, *R. maris*, реже *R. rhodochrous* [2]. В заболоченных почвах, в илах соленых лиманов, т.е. в местах, где происходят процессы активной минерализации и накопление жирных кислот и низкомолекулярных спиртов, обнаруживали *R. agustus* [9].

Некоторые родококки могут быть патогенными для человека, животных и растений. Так, *R. bronchialis* вызывает легочные заболевания, септический артрит и остеомиелит у человека [12]; *R. equi* – пневмонию у жеребят, крупного рогатого скота и свиней [14].

Нокардии и родококки представляют существенный интерес и с точки зрения их практического применения. Их используют в промышленности для разрушения водо-нефтяных эмульсий, трансформирования стероидных соединений, получения многих аминокислот, полисахаридов, органических кислот, очистки подсланевых (судовых) вод, для направленной деградации гербицидов и т.д. [3, 5].

Учитывая огромное значение этих микроорганизмов в природе и жизни человека, целью настоящих исследований явилось определение степени распространения и видового состава нокардий и родококков во внешней среде Республики Дагестан.

Материалы и методы. Одной из поставленных задач явилась разработка оптимальной питательной среды для выделения и выращивания нокардий и родококков. В настоящее время в практике ветеринарных и медицинских лабораторий для бактериологической диагностики туберкулеза наиболее широко применяют плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена, Финна II, Гельберга, Мордовского («Новая»), среды 6 и 9 В. А. Аникина и т.д. Перечисленные среды по химическому составу и физическим свойствам мало отличаются одна от другой и состоят из солевой основы и желтков куриных яиц. Поэтому высеваемость и скорость роста микробактерий на разных средах незначительно расходятся в ту или иную сторону.

Мы испытывали эти среды для выращивания нокардий и родококков, и следует отметить, что среда Финн II оказалась наиболее оптимальной для *N. R.*

Нами была модифицирована среда Гельберга, содержащая глицерин, куриные яйца, желтки, малахитовую зелень, солевой раствор, приготовленный на основе дистиллированной воды (готовится на основе геотермальной воды (источник минеральных солей). Дополнительно вносят картофельный экстракт, также приготовленный на основе геотермальной воды.

Предлагаемая среда имеет следующий состав:

Гликокол, г	1,5
Глицерин, мл	3,0
Вода геотермальная, мл	56,25
Яйца куриные, шт.	6



Картофельный экстракт на основе геотермальной воды, мл	75,0
2%-ный раствор малахитовой зелени, мл	5,0
Дистиллированная вода, мл	18,75

Анализ геотермальной воды фотометрией, комплексометрией, потенциометрией, капиллярной люминесценцией, атомно-абсорбционной и пламенно-эмиссионной спектрометрией показал, что она отличается от водопроводной и дистиллированной воды значительно большим разнообразием и количественным содержанием анионов NH_4 , Na, K, Mg, Ca, Sr, Fe, Mn, Zn, Cu и Ni, суммарное значение которых составляло 1,6771 г/л; катионов Fe, Cl, Br, I, SO_4 , HCO_3 , HPO_4 , NO_3 – в сумме 3,4732 г/л. Кроме того, геотермальная вода содержит нейтральные и кислые битумы (2,5 мг/л), гумусовые вещества (7,1 мг/л), которые обогащают среду разнообразным органическим субстратом и ростовыми веществами. Комплекс микро- и макроэлементов, содержащихся в геотермальной воде, оказал более благоприятное влияние на рост и размножение микроорганизмов, чем внесение пяти минеральных солей в составе среды Финна II.

При экспериментальной проверке были испытаны 4 варианта среды, которые отличались количественным содержанием вносимой геотермальной воды взамен дистиллированной. Наиболее оптимальной оказался 3 вариант среды, в каждом содержится 87,5% геотермальной воды.

Объектами исследования на индикацию нокардий и родококков явились пробы воды (артезианских скважин, горной речной, стоячих водоемов, водопроводной, геотермальной), почвы (снятые с окультуренных угодий и пастбищ на разной высоте вертикальной зональности), кормов (сено, солома, силос, сенаж, зеленая масса, комбикорм), продуктов животного происхождения (молока, кефира, сметаны, сыра), овощей (огурцы, томаты, картофель), биоматериалов (крупного рогатого скота, грызунов, диких голубей), навоза (из помещений и навозохранилищ, с пастбищ). В общей сложности исследовали 991 пробу.

Образцы почвы, кормов, навоза, воды брали с территорий, расположенных на различной высоте вертикальной зональности. Пробы почвы снимали с глубины 5-10 см в количестве 2-12 единиц, которых объединяли в общий образец.

В работе использовали музейные штаммы следующих видов: *N. asteroides* (BKM Ac 1077); *N. brasiliensis* (BKM Ac 863); *N. transvalensis* (BKM Ac 817); *N. Vaccinia* (BKM Ac 856); эти культуры были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Москва). Музейные штаммы культур родококков получили из коллекции микроорганизмов института микробиологии и вирусологии им. Д. Заболотного (г. Киев): *R. amarae* (ИМВ Ac 801); *R. equi* (ИМВ Ac 740); *R. rhodochrous* (ИМВ Ac 744); *R. ruber* (ИМВ Ac 745); *R. luteus* (ИМВ Ac 385); *R. maris* (ИМВ Ac 737).

Для выделения нокардий использовали среду Мюнца с н-алканами, а для родококков – среду с «парафиновой приманкой». Выросшие на них пигментированные колонии пересеивали на плотные агаризованные и яичные среды. Для выращивания (при необходимости получения обильной бакмассы) использовали среду Сотона с жидким парафином. Идентификацию выделенных культур производили на основе изучения широкого комплекса культурально-морфологических, хемотаксономических, физиологических свойств и определителя бактерий Берджи.

Результаты исследований. Скорость роста и накопление бакмассы музейными штаммами на среде 3 варианта превышали все другие варианты и контроль. При изучении их экологии из 991 пробы разнообразных материалов выделили 190 штаммов культур. Родовую дифференциацию этих штаммов проводили по узкому набору изучаемых признаков, в числе которых использовали тест Хью и Лефсон (анаэробное усвоение кислорода), определение арилсульфатазной активности и определение чувствительности к митомицину. На основе изучения этих признаков 56 (29,5%) штаммов были отнесены к роду *Nocardia* и 134 (70,5%) – к роду *Rhodococcus*.

Почва и корма оказались наиболее богаты изучаемыми микроорганизмами (табл.1).

Частота индикации нокардий и родококков из почв равнинной зоны была почти в 2 раза больше, чем в высокогорной. Вместе с тем, различия наблюдались и в видовом составе изолированных культур. Так, из проб почвы равнинной зоны были выделены штаммы *R. luteus* и *R. equi*, которые не были обнаружены в образцах, взятых из горной и высокогорной зон. Наблюдалась прямая зависимость частоты обнаружения *R. erythropolis*, *R. coprofilus* и *R. rubropertinctus* в образцах почвы, взятых из различных местностей по вертикальной зональности. Чаще всего их выделяли из почвы равнинной зоны, где преобладают солончаковые почвы. Ареал распространения *R. erythropolis* оказался наиболее широким. Их выделяли почти из всех образцов почвы, независимо от вертикальной зональности, обнаруживали в пробах водопроводной воды, стоячих водоемов, в продуктах расти-



тельного и животного происхождения. *R.soprofilus* наиболее чаще обнаруживали в образцах почвы пастбищ, особенно в занавоженных участках. Их также выделяли из проб комбикорма, сена разнотравного, силоса, навоза, молока. В биоматериалах крупного рогатого скота (реагировавшего на туберкулин), убитого с подозрением на туберкулез, обнаружили кислотоустойчивые формы *R.bronchialis* и *R.egui*. Эти же виды родококков изолировали из биоматериалов диких голубей и полевых мышей. Неочищенный от кожуры картофель и укроп оказались инфицированными *R.erythropolis* и *R.soprofilus*, тогда как томаты и огурцы после бытового очищения оказались свободными от них.

Таким образом, наиболее заселенной родококками оказалась почва, затем (по степени уменьшения) корма, вода, внутренняя поверхность и покрытия помещений для животных, навоз, продукты животного происхождения, биоматериалы от животных и, наконец, – овощи. Их не обнаружили в геотермальной и артезианской воде Прикаспийской равнины, в сметане, огурцах и томатах.

Таблица 1

Объекты исследований и число выделенных культур нокардий и родококков

Объекты бактериологических исследований		проб	Выделено культур			
			нокар- дии	%	родокок- ков	%
Почва	всего	160	25	15,6	61	38,1
	равнина	40	8	20,0	19	47,5
	предгорье	40	6	15,0	17	42,5
	горы	40	5	12,5	15	37,5
	высокогорье	40	5	12,5	10	25,0
Вода	всего	59	5	8,5	8	13,6
	речная	9	1	11,1	1	11,1
	артезианская	я				
	геотермальная	10				
	водопроводная	15	1	6,7	2	13,3
Корма	стоячих водоемов	18	3	16,7	5	27,8
	всего	83	11	13,3	23	27,7
	сено разнотравное	17 15	5 3	29,4 20,0	6 5	35,3 33,3
	солома	27	2	7,4	5	18,5
	силос	5			3	20,0
Продукты животного происхождения	сенаж комбикорм	19	1	5,3	3	15,8
	всего	150	2	1,3	7	4,7
	молоко	82	1	1,2	4	4,9
	сметана	25	-	-	-	-
	кефир	33	1	3,0	2	6,1
Продукты растительного происхождения	сыр	10	-	-	1	10,0
	всего	102	2	2,0	3	2,9
	огурцы	30	1	3,3	-	-
	томаты	26	-	-	-	-
	картофель	36	1	2,8	2	5,6
Биоматериалы от животных	укроп	10	-	-	1	10,0
	всего	250	2	0,8	9	3,6
	круп. рог. скот	222	2	0,9	6	2,7
	дикие голуби	13	-	-	1	7,7
	полевые мыши	15	-	-	2	13,3
Навоз	всего	126	3	2,4	15	11,9
Пробы из помещений	всего	61	6	9,8	8	13,1
Итого		991	56	5,7	134	13,5

Почти аналогичная картина наблюдалась и в отношении выделения нокардий из проб исследованных объектов. Большая часть культур нокардий удалось изолировать из образцов почвы равнинной зоны. Наблюдалась подобная родококкам почвенная убиквитарность нокардий в зависимости от вертикальной зональности. Наиболее часто из исследованных образцов почвы выделялись культуры *N.asteroides* и *N.transvalensis*. *N.asteroides* изолировали как из образцов возделываемых (огородные, садовые, пшеничные поля), так и из неосультуренных (пастбищные, луговые, степные и т.д.) почв,



независимо от вертикальной поясности. Большинство штаммов нокардий, изолированных из кормов, было определено как *N.asteroides* и *N.transvalensis*, реже выявлялись *N.brasiliensis*. Последних изолировали из биоматериала от крупного рогатого скота. В единичных случаях нокардий обнаружили в речной и водопроводной воде, в комбикормах, молоке и кефире, на картофеле и огурцах. Чаще всего их обнаруживали на соломе, сене разнотравном и несколько меньше – в силосе.

Исследования показали, что из общего числа выделенных штаммов чаще всего в окружающей среде Республики Дагестан обнаруживаются *R.erythropolis* и *R.coprofilus*, на долю которых приходится 76,8%, а из нокардий – *N.asteroides* и *N.transvalensis* – 77,0% (табл.2).

Кроме того, из разнообразия исследованного материала были выделены *R.luteus*, *R.egui*, *R.rubropertinctus*, *R.bronchialis*, *N.vaccinii*, *N.brasiliensis*.

Обсуждение. Исследования показали, что разработанная нами новая питательная среда явилась наиболее оптимальной из всех испытанных вариантов. На этой среде нокардии и родококки дают обильную бакмассу за короткое время, что очень важно как при диагностике, так и в промышленной микробиологии. Изучение экологии этих бактерий свидетельствует о том, что нокардии и родококки широко распространены в окружающей среде и они циркулируют в животном организме. Считаем, что видовой состав этих микроорганизмов не может ограничиться изолированными нами штаммами, поскольку при использовании специальных методов, приемов, питательных сред и условий могут быть выделены и другие виды нокардий и родококков.



Таблица 2

Виды и численность нокардий и родококков, выделенных из различных материалов

Род	Вид	Количество выделенных штаммов	%
<i>Rhodococcus</i>	<i>erithropolis</i>	83	61,9
	<i>coprofilus</i>	20	14,9
	<i>luteus equi</i>	11 9	8,2 6,8
	<i>rubroperitinctus</i>	8	6,0
	<i>bronchialis</i>	3	2,2
	<i>asteroides</i>	36	62,7
<i>Nocardia</i>	<i>transvalensis</i>	8	14,3
	<i>vaccinn</i>	7	12,5
	<i>brasiliensis</i>	5	8,9

Выживаемость изучаемых микроорганизмов в сухих, солончаковых, степных почвах Прикаспийской равнины, вероятно, связана со значительной гидрофобностью их клеточных стенок, присутствием в клетках восков, глицеридов, гликогена, способностью усваивать воск и углеводороды растительного, животного происхождения, труднодоступные для других микроорганизмов. Как утверждают литературные данные, нокардии и родококки являются частыми обитателями почвы нефтеносных районов и газовых скважин, к которым можно причислить и Прикаспийскую равнину.

Наблюдается закономерность уменьшения частоты выделения из почвы и изменения видового состава нокардий и родококков в зависимости от вертикальной зональности. Естественно, такое положение не является удивительным, поскольку почвенное разнообразие, соответственно, разнообразные условия вносят коррективы в способность выживать тех или иных микроорганизмов.

Исследования также показали, что основным местом обитания нокардий и родококков является почва. Следующим очевидным звеном их циркуляции в природе, естественно, является произрастающая на ней растительность, далее животные и все остальные факторы (вода, продукты, навоз и т.д.). Как показали наши исследования, ареал их обитания распространяется на птиц, грызунов, и вероятно, окажется намного широким.

Таким образом, принимая во внимание огромное значение данных микроорганизмов в природе и жизни человека, считаем необходимым дальнейшее глубокое изучение их экологии и не только в Республике Дагестан.

Библиографический список

1. Аристархова В.И. Об отношении микроорганизмов рода *Nocardia* к источникам углерода и азота // Извест. АР СССР. Сер. биол., 1972. №4. – С.559-563.
2. Бердичевская М.В. Экология углеводородокисляющих бактерий нефтяных пластов Пермского Предуралья. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1983. – 23 с.
3. Голловлев Е.Л. Биохимическая активность родококков. Генетика, таксономия и физиологическая активность актиномицетов: Сб. докл. сов.-амер. конф. Ялта, 1980. – М., 1981. – С. 242-255.
4. Ившина И.Б. и др. Бактерии рода *Rhodococcus* грунтовых вод района нефтяных месторождений Пермского Предуралья // Микробиол., 1981. №4. – С.709-714.
5. Квасников Е.И., Ключникова Т.М. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. – Киев: Наукова думка, 1978. – 131 с.
6. Коронелли Т.В. Липиды сапрофитных микобактерий. Автореф. дис. ... доктора биол. наук. – М., 1980. – 46 с.
7. Лысак Л.В. Биология почвенных психрофильных коринеподобных бактерий. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1978. – 25 с.
8. Нестеренко О.А., Касумова С.А., Квасников Е.И. Микроорганизмы рода *Nocardia* и группы “*rhodococcus*” в почвах Украинской ССР // Микробиология, 1978. №5. – С.866-870.
9. Нестеренко О.А. и др. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. – Киев: Наукова думка, 1985. – 333 с.
10. Никифоров Ю.Ф. Нокардиоз и его возбудители. – Л.: Медицина, 1973. – 116 с.
11. Хоулт Д. и др. Определитель бактерий Берджи. 2 тома. – М.: Мир, 1967.
12. Broughton R.A. et al. Septic arthritis and osteomyelitis caused by an organism of the genus *Rhodococcus* // J. Clin. Microbiol. – 1981. – 13. №1. – P. 209-213.
13. Cross T. et al. The ecology of nocardioform actinomycetes // Acad. Press. – London etc. – 1976. – P.337-371.
14. Goodfellow M., Minnikin D.E. The genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. – The Procarotes. Berlin: Heidelberg: Springer. – 1981. – V.2. – P. 2017-2027.
15. Houand E.T. et al. *Nocardia asteroides* infection – a transmissible disease // J. Hosp. Infect. – 1980. – 1. №1. – P. 31-40.
16. Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. *N. amarae* sp. Nov., an actinomycete common in foaming activated sludge // J. Sistem. Bacteriol. – 1974. – 24. №4. – P. 248-288.
17. Lindner K.E. Zur. Tenazität von Nocardien in der Aussenwelt // Arch. exp. Net. Med. – 1973. – 27. №1. – P. 139-143.
18. Orchard V. The ecology of *Nocardia* and related taxa // actinomycetes. Stuttgart; Neww-York: Fischer. – 1981. – P. 167-180.
19. Schaal K.P., Bickenbach H. Soil occurrence of pathogenic nocardiae. *Nocardia* and



Streptomyces. Stuttgart; – New-York: Fischer. – 1978. – P. 429-434. 20. Skerman V.B. et al. Apporoved lits of bacterial names // J. Sistem. Bacteriol. –1980. – 30. №1. – P. 225-420.