

Д.И. Стом¹, В.А. Быбин¹, О.Ф. Вятчина¹, А.В. Кононова²

О ВОЗМОЖНОСТИ УСИЛЕНИЯ ИММУННЫХ СВОЙСТВ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ

¹ Иркутский государственный университет (Иркутск)² Иркутский государственный педагогический университет (Иркутск)

С помощью метода дисков оценивали бактериостатическое действие целомической жидкости красного калифорнийского гибрида (*Eisenia fetida Andrei Bouche*) на микроорганизмы разных групп. Показано, что целомическая жидкость подавляет рост *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus sp.* — условно патогенных штаммов — и не влияет на рост и развитие *Yarrowia lipolytica* и *Rhodococcus erythropolis*.

При инокуляции червя *per os* суспензией *B. thuringiensis* и *Staphylococcus sp.* отмечали активацию антимикробных свойств целомической жидкости в отношении *B. thuringiensis*. Максимальное снижение обсемененности кишечника дождевых червей фиксировали при 3-часовой экспозиции дождевых червей, инокулированных перорально 0,03 мл 1,5 % перекиси водорода.

Ключевые слова: целомическая жидкость, дождевые черви, иммунитет

ABOUT THE OPPORTUNITY OF STRENGTHENING OF IMMUNE BEHAVIOUR OF EARTH WARMS

D.I. Stom¹, V.A. Bibin¹, O.F. Viatchina¹, A.V. Kononova²¹ Irkutsk State University, Irkutsk² Irkutsk State Pedagogic University, Irkutsk

The bacteriostatic influence of coelomic liquid of Red Californian hybrid on microorganisms of different groups (*Eisenia fetida Andrei Bouche*) was estimated by disk method. It is shown, that coelomic liquid suppresses the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus sp.*, which are conditionally pathogenic and doesn't affect on growth and development of *Yarrowia lipolytica* and *Rhodococcus erythropolis*.

Under *per os* inoculating of earthworms by *B. thuringiensis* and *Staphylococcus sp.* suspension the activation of antimicrobial characteristics of coelomic liquid to *B. thuringiensis* was marked. The maximal decrease of contamination of earthworms' intestines was fixed after 3 hour expositions of earthworms *per os* inoculated by 0,03 ml of 1,5 % hydrogen peroxides.

Key words: coelomic liquid, earthworms, immunity

Дождевые черви обладают уникальным природным иммунитетом, что позволяет им выживать при серьезном микробиологическом загрязнении среды обитания [6]. Из дождевых червей получают эффективные фармацевтические препараты [3–5]. Иммунная система дождевых червей подвержена значительным флюктуациям под влиянием различных факторов, в результате которых наблюдаются изменения концентраций биологически активных веществ целомической жидкости [6]. В связи с этим цель данного сообщения — изучение возможностей повышения антимикробных свойств дождевых червей для получения более эффективных фармацевтических препаратов на основе дождевых червей и снижение обсемененности кишечника дождевых червей.

МЕТОДИКА

Объектами исследования служили половозрелые особи красного калифорнийского гибрида (*Eisenia fetida Andrei Bouche*) и штаммы микроорганизмов, входящие в состав нефтеразрушающего препарата «Деворойл»: *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yarrowia lipolytica* (штаммы предоставлены И.А. Борзенковым), а также

энтомопатогенные штаммы *Bacillus thuringiensis ssp. Alesti 6–12 kc* и *Staphylococcus sp.*, выделенных О.Ф. Вятчиной [2].

Бактериостатическое действие целомической жидкости дождевых червей и препаратов на их основе оценивали с помощью диско-диффузионного метода [1]. Целомической жидкостью пропитывали стерильные бумажные диски диаметром 6 мм. Препараты изготавливали по традиционным китайским рецептам: очищали кишечник и покровы дождевых червей многочисленными промываниями подкисленной водой. Затем живых червей разрезали на кусочки длиной 2–3 см с последующей сушкой при температуре 50 °С в течение 10 часов. Полученную массу перетирали в ступке до порошкообразного состояния. Данный порошок смешивали со стерильным физиологическим раствором в пропорции 1:7. Изготовленной суспензией порошок дождевых червей так же пропитывали стерильные бумажные диски.

Взятые штаммы использовали в качестве культур для диско-диффузионного метода. Для усиления иммунных свойств дождевых червей *E. fetida* инокулировали суспензиями *B. thuringiensis* или *Staphylococcus sp.*, помещали в воду

охлажденную до +5 °С или нагретую до +38 °С на 5 минут, или наносили на кожные покровы червей суспензию 1-суточной культуры *Staphylococcus sp.* Введение штаммов микроорганизмов в кишечник дождевых червей осуществляли *per os* микроинъектором в объеме 0,03 мл. Время инкубации культур в пищеварительном тракте дождевых червей варьировали от 30 минут до 5 часов. В качестве микроинъектора использовали инсулиновый шприц со сплюснутым острием иглы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целомическая жидкость дождевых червей в контроле проявляла ярко выраженную бактериостатическую активность в отношении *P. aeruginosa*, *Staphylococcus sp.*, *B. thuringiensis*. Значительно слабее целомическая жидкость подавляла рост *Y. lipolityca*, *R. erythropolis* (табл. 1).

При введении дождевым червям *per os* штаммов *Staphylococcus sp.*, *B. thuringiensis* 6–12 кс на-

блюдали усиление антимикробных свойств дождевых червей по отношению к инокулированным штаммам. Отмечаемый эффект зависел от длительности нахождения бактериальных культур *Staphylococcus sp.* или *B. thuringiensis* в кишечном тракте дождевого червя. Наибольший диаметр зоны угнетения роста газона (то есть максимальное антимикробное действие) наблюдали при часовой инкубации *B. thuringiensis* в черве. В наибольшей степени антимикробное действие целомической жидкости при инъекции в целомическую полость *E. fetida* суспензии *Staphylococcus sp.* фиксировали через 2 часа, а при введении бактерий *per os* микроинъектором через 3 часа (табл. 2, 3).

Препараты, активированные с помощью предварительного охлаждения, нагревания или контаминирования дождевых червей со *Staphylococcus sp.*, обнаруживали более высокие антибактериальные свойства, чем препараты, изготовленные из дождевых червей по традиционным прописям.

Таблица 1
Бактериостатическое действие целомической жидкости по отношению к различным штаммам микроорганизмов

Тест-культура	Диаметр зоны подавления роста, мм
<i>P. aeruginosa</i>	50 ± 7,4
<i>Staphylococcus sp</i>	46 ± 5,2
<i>B. thuringiensis</i>	12 ± 1,8
<i>Y. lipolityca</i>	7 ± 1,0
<i>R. erythropolis</i>	–

Таблица 2
Бактериостатическое действие целомической жидкости по отношению к *B. thuringiensis* 6–12 кс

Длительность инкубации <i>B. thuringiensis</i> 6–12 кс в дождевом черве <i>E. fetida</i> , час	Диаметр зоны подавления роста (целомическая жидкость на газонах с <i>B. thuringiensis</i> 6–12 кс), мм
0 (контроль)	10 ± 1,4
0,5	28 ± 4,2
1	40 ± 6,0
2	8 ± 1,2
3	20 ± 3,0

Таблица 3
Радиусы подавления роста *Staphylococcus sp.* на 2-е сутки культивирования газонов

Время инкубации <i>Staphylococcus sp.</i> в дождевом черве, час	Инъекция	Инокуляция
	Диаметры зон подавления роста, мм	
0 (контроль)	12 ± 1,8	53 ± 7,6
0,5	27 ± 4,0	71 ± 9,8
1	12 ± 2,4	48 ± 7,2
2	44 ± 6,6	48 ± 9,3
3	20 ± 4,4	74 ± 11,0
4	29 ± 4,8	25 ± 2,6
5	24 ± 3,5	38 ± 5,2

Таблица 4

Влияние различных концентраций перекиси водорода на количество гетеротрофных бактерий в кишечнике дождевого червя

Отдел кишечника	Концентрации перекиси водорода, %		
	титр, КОЕ/г		
	2	1	0 (контроль)
Передний	$1,15 \pm 0,6 \times 10^8$	$2,54 \pm 0,7 \times 10^9$	$3,54 \pm 0,8 \times 10^9$
Средний	$2,84 \pm 0,7 \times 10^9$	$2,77 \pm 0,7 \times 10^9$	$3,17 \pm 0,8 \times 10^9$
Задний	$2,18 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,07 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,14 \pm 0,5 \times 10^9$

Таблица 5

Влияние 1,5% перекиси водорода и разного времени экспозиции на количество гетеротрофных бактерий в кишечнике дождевого червя

Отдел кишечника	Время экспозиции, час			
	титр, КОЕ/г			
	0,5	1	3	0 (контроль)
Передний	$2,75 \pm 0,7 \times 10^9$	$7,41 \pm 0,8 \times 10^8$	$7,54 \pm 0,8 \times 10^8$	$3,54 \pm 0,8 \times 10^9$
Средний	$2,95 \pm 0,7 \times 10^9$	$6,14 \pm 0,5 \times 10^8$	$3,73 \pm 0,9 \times 10^8$	$3,17 \pm 0,8 \times 10^9$
Задний	$1,68 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,09 \pm 0,5 \times 10^9$	$1,27 \pm 0,3 \times 10^8$	$2,14 \pm 0,5 \times 10^9$

Образцы, полученные с помощью активации *Staphylococcus sp.*, проявляли повышенное антимикробное действие по отношению к *Staphylococcus sp.* и к другим тест-культурам. Препараты, полученные после активации нагреванием, эффективнее контрольных препаратов, но в ряду активированных препаратов оказались самыми слабыми. Нелетальное охлаждение дождевых червей для получения препаратов является одним из самых эффективных и безопасных (с микробиологической точки зрения) способов усиления иммунных свойств дождевых червей.

Физиолого-химические, морфологические и тинкториальные признаки свидетельствуют о том, что доминирующая аутофлора кишечника красного калифорнийского гибрида представлена бактериями группы кишечной палочки. Две культуры относятся к роду *Escherichia* и две к роду *Proteus*.

Для снижения общей обсемененности кишечника красного калифорнийского гибрида использовали водные растворы перекиси водорода. В первой серии опытов на аутофлору кишечника *E. fetida* воздействовали 0,03 мл 3% перекиси водорода. При пероральном введении 3% перекиси и 5-минутной экспозиции, двигательная активность червей существенно снижалась. При подсчете общего микробного числа в переднем отделе кишечника было выявлено две колонии, в среднем отделе выделено девять колоний микроорганизмов, все колонии относятся к группе кишечных палочек. В заднем отделе кишечника титр клеток прокариот был равен контролю. Вторая серия опытов заключалась в инокулировании червей 2% и 1% перекисью водорода и последующем асептическом вскрытии через пять минут, объем инокулята оставляли прежним. При введении 2% перекиси

водорода в переднем отделе кишечника титр жизнеспособных клеток прокариот уменьшился на порядок, в других отделах произошло незначительное изменение. Двигательная активность червей изменилась незначительно. Воздействие 1% перекиси не оказало сильного влияния на ОМЧ кишечного тракта червя (табл. 4). При введении 2% перекиси водорода поведение червей изменялось незначительно.

В последующих опытах объем инокулята оставляли прежним, а концентрацию перекиси водорода снизили до 1,5 %.

При 30-минутной экспозиции титр гетеротрофных бактерий снизился незначительно (табл. 5). Спустя час титр гетеротрофных бактерий в переднем и среднем отделах кишечника уменьшился на порядок. В заднем отделе кишечника не произошло снижения количества жизнеспособных клеток прокариот (табл. 5). После 3-часовой экспозиции отмечалось снижение титра клеток прокариот на порядок во всех отделах кишечника (табл. 5).

Следует отметить, что при воздействии перекиси водорода наблюдали уменьшение класса разнообразия гетеротрофных бактерий, выявляемых в кишечнике красного калифорнийского гибрида. При микробиологическом анализе кишечника выявлено 20 морфотипов. После введения перекиси водорода количество морфотипов значительно снизилось, так после 30-минутной экспозиции было обнаружено только 6 морфотипов. Таким образом, с помощью инокулирования H_2O_2 удается снижать уровень обсеменения дождевых червей, а под влиянием некоторых штаммов микроорганизмов и некоторых других воздействий можно повышать бактериальные свойства препарата дождевых червей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 05-04-97237.

Авторы признательны проф. Z. Sun, И.Н. Тутову, И.Н. Жданову, В.В. Батурину за ценные советы и консультации, С.В. Полехиной, Ю.В. Омелчкиной за помощь в проведении работ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. — М.: Изд. центр «Академия», 2003. — 464 с.
2. Вятчина О.Ф. Штаммы *Bacillus thuringiensis*, выделенные при эпизоотии лиственничной мухи (*Hylemyia laricicola*) в Камчатской области / О.Ф. Вятчина // Сибирский экологический журнал. — 2004. — № 4. — С. 501–506.
3. Вятчина О.Ф. Энтомопатогенные бактерии вида *B. thuringiensis*, циркулирующие в биоценозах Камчатки / О.Ф. Вятчина, Т.В. Завезенова // Оценка современного состояния микробиологических исследований в Вост.-Сиб. регионе: Материалы Росс. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения проф. Е.В. Талалаева. — Иркутск, 2002. — С. 13–18.
4. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов. — М.: Изд. центр «Академия», 2005. — 604 с.
5. Sun Z. Vermiculture and vermiprotein / Z. Sun // China Agricultural University Press, 2003. — 367 p.
6. Wang C. A Review for Antibacterial Immunity of the Earthworm / C. Wang, D. Zheng, Z. Sun // Дождевые черви и плодородие почвы: Материалы 2-й Международной научно-практической конференции. — Владимир, 2004. — С. 54.