

УДК 579.22, 57.047

ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ МЕТАБОЛИТОВ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН НА РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ *Listeria monocytogenes* И *Yersinia pseudotuberculosis*

© 2012 г. М. Л. Сидоренко*, Л. С. Бузолева**

*Биологический институт ДВО РАН, г. Владивосток, 690022;

**Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток, 690087

e-mail: sidorenko@biosoil.ru

Поступила в редакцию 06.05.2011 г.

Изучена биологическая активность летучих метаболитов прорастающих семян капусты (*Brassica oleracea*), моркови (*Daucus carota*), салата (*Zactuca sativa*), кукурузы (*Zea mays L.*) в отношении *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis*, являющихся для последних факторами передачи. Показано, что летучие метаболиты прорастающих семян могут быть для этих бактерий единственным источником углерода и энергии. Основным веществом, влияющим на их рост и размножение, является метанол.

В последние десятилетия все большее внимание привлекает к себе группа патогенных микроорганизмов, жизненная программа которых состоит в непрерывном переходе из окружающей среды, где они ведут сапрофитный образ жизни, в организмы человека и теплокровных животных, в которых они проявляют паразитические свойства, вызывая инфекционный процесс, и реверсии к сапрофитизму при возврате в окружающую среду. Возможность сапрофитного существования ряда патогенных микроорганизмов в окружающей среде, совершенно отрицаемая в недавнем прошлом, находит все большее признание [1–6].

Научно-технический прогресс и связанная с ним урбанизация нарушили экологическое равновесие и открыли пути для проникновения патогенных микроорганизмов из внешней среды в окружение человека. Ярким примером в этом отношении являются *Yersinia pseudotuberculosis* – возбудитель псевдотуберкулеза (или дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) и *Listeria monocytogenes* – возбудитель листериоза [7–13].

Анализ многочисленных вспышек этих заболеваний показал, что чаще всего факторами передачи бактерий человеку являются овощи и корнеплоды (блюда, приготовленные из них) и, прежде всего свежие капуста и морковь для иерсиний, кукуруза и салат для листерий, в которых эти бактерии активно размножаются и накапливаются в значительных количествах, поддерживая высокую степень вирулентности [14–18].

Внутри сложных ассоциаций, формируемых микроорганизмами с растениями в естественных и искусственных системах, складываются различные взаимоотношения [19–20]. В любом сообще-

стве эти взаимоотношения сложны и многообразны. Выделяемые растениями биологически активные вещества могут играть роль регулятора численности бактерий в сообществе “растение–микроорганизм”. Среди них особый интерес вызывают летучие метаболиты, так как известно, что летучие органические выделения прорастающих семян благодаря высокой проникающей способности и доступности для усвоения, могут быть источником углерода и энергии для микроорганизмов. В настоящее время доказано, что ряд бактерий и грибов могут потреблять летучие метаболиты прорастающих семян в качестве единственного источника углерода [21–28].

Известно, что растения являются ведущим компонентом биосферы и определяют главную форму жизни на Земле, поэтому раскрытие закономерностей взаимодействия растений и бактерий важно для понимания распространения патогенных микробов вне теплокровного организма, а также для обоснования механизмов адаптации эукариотических организмов к изменению условий существования, особенно при действии экстремальных факторов.

Цель работы – изучение использования бактериями видов *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* летучих метаболитов прорастающих семян растений.

МЕТОДИКА

Культуры. В качестве объектов исследования использовали следующие штаммы бактерий из музея НИИ ЭМ СО РАМН: грамположительные *Listeria monocytogenes* (штамм 2L, 1/2a) и грамотрицательные *Yersinia pseudotuberculosis* (штамм

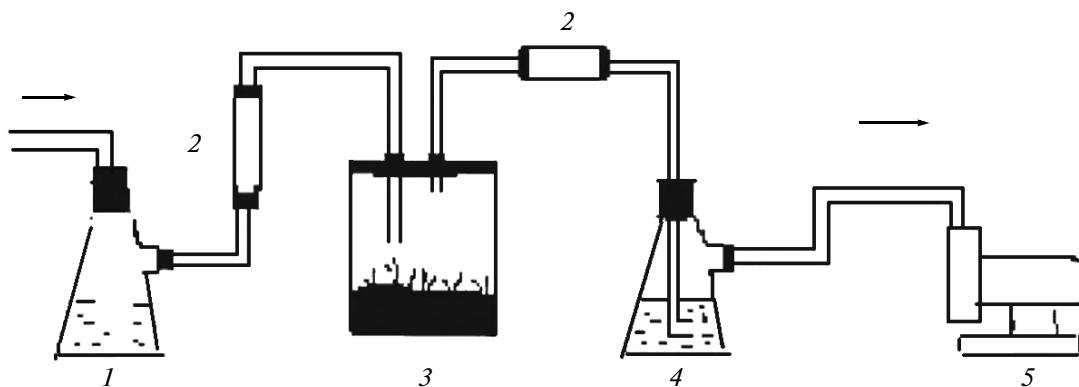


Рис. 1. Схема установки для изучения использования патогенными бактериями летучих метаболитов прорастающих семян: 1 – колба с KOH, 2 – ватные фильтры, 3 – сосуд с почвой и прорастающими семенами, 4 – колба с жидкой средой, инокулированной патогенными бактериями, 5 – перистальтический насос.

512, 3515). В опыте также использовали пророщенные семена растений, являющиеся факторами передачи для иерсиний, – капуста (*Brassica oleacea L.*), морковь (*Daukus carota L.*) и листерий – салат (*Lactuca sativa L.*), кукуруза (*Zea mays L.*) [2, 7].

В качестве источника летучих метаболитов использовали смесь из семян растений (салат, кукуруза, капуста, морковь). Кроме того, культивировали отдельно иерсиний на метаболитах капусты или моркови, а листерий – на метаболитах кукурузы или салата.

Среда. Культивирование микроорганизмов проводили на жидкой минеральной среде без источника углерода, содержащей (%): NH_4NO_3 – 0.3, KH_2PO_4 – 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, KCl – 0.025, pH 6.8–7.0.

Летучие метаболиты. Изучение влияния летучих метаболитов прорастающих семян на размножение бактерий проводили с помощью специально сконструированной установки по схеме Шенк и Стоцкого [5] в нашей модификации (рис. 1). Обработанные семена помещали в сосуд со стерильной почвой (3), который плотно закрывали для того, чтобы в него не поступал воздух извне. Через сосуд при помощи насоса (5) прокачивали стерильный и очищенный от CO_2 воздух. Степень удаления углекислого газа из воздуха проверялась перед постановкой эксперимента с помощью портативного газоанализатора Дукат-В (“Дельта”, Россия). Стерилизацию воздуха осуществляли ватными фильтрами (2), а очистку воздуха от CO_2 проводили в ловушке (1) заполненной 30%-ным раствором KOH. Воздух, проходящий через сосуд с почвой и семенами, увлекал летучие метаболиты и поступал в колбу с жидкой минеральной средой (4), инокулированной культурой исследуемого микроорганизма. В сосуд с почвой помещали 20–40 семян, в зависимости от вида растения. Систему выдерживали при комнатной температуре 20–22°C.

Инокуляцию 100 мл минеральной среды осуществляли 0.1 мл 1-суточной культуры бактерий, выращенных на агаризованной среде, содержащей 10^2 колониеобразующих единиц (КОЕ). Через определенные промежутки времени отбирали пробы для подсчета количества колоний. Для этого по 0.1 мл инокулированной жидкости с учетом необходимых разведений высевали на плотные среды. Для индикации иерсиний использовали среду Серова, для листерий – казеиново-дрожжевой агар с глюкозой. Количество подсчитанных колоний выражали в общепринятых единицах Ig KOE/ 0.1 мл. В качестве контроля использовали сосуд с почвой без семян.

Стерилизация. Внутренние поверхности стеклянных частей установки тщательно обрабатывали 70%-ным раствором этилового спирта, остальные детали – автоклавированием. Семена обрабатывали раствором марганцовокислого калия и промывали стерильной дистиллированной водой. Почву обрабатывали текущим паром трижды по 30 мин. После обработки проводили контроль всех частей установки, семян и почвы на наличие посторонней микрофлоры с использованием питательного агара.

ГЖХ. Определение летучих выделений прорастающих семян осуществляли методом газожидкостной хроматографии. Для хроматографического анализа семена проращивали в плотно закрытых сосудах. Через 24, 48, и 72 ч воздух из сосудов отбирали через резиновые колпачки при помощи 1 мл шприца и вводили его в дозатор хроматографа.

ГЖХ летучих метаболитов прорастающих семян проводили на газовом хроматографе Shimadzu-16A (“Shimadzu”, Япония) газ-носитель – гелий, неподвижная фаза – полиэтиленгликоль, колонка стеклянная, диаметр 0.32 см, длина 10 м, температура колонки – 35°C, испарителя – 100°C, детектора (пламенно-ионизационный) – 100 °C,

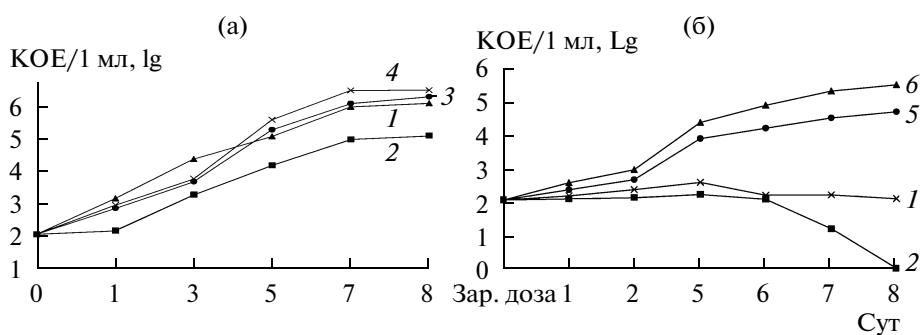


Рис. 2. Размножение *Y. pseudotuberculosis* шт. 512 (а) и *L. monocytogenes* шт. 10CN (б) на летучих выделениях прорастающих семян. 1 – смесь семян, 2 – контроль, 3 – морковь, 4 – капуста, 5 – салат, 6 – кукуруза.

давление водорода и воздуха на детекторе – 0.5 кг/см. Расчет и обработку хроматограмм проводили на специализированном компьютере Shimadzu-cR-4A (“Shimadzu”, Япония). Определение качественного состава летучих органических веществ производили путем сравнения полученных хроматографических пиков с пиками чистых летучих органических веществ (эталоны).

Повторность опытов – трехкратная, результаты обрабатывались статистически в компьютерной программе электронных таблиц Excel 7 с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучали влияние летучих метаболитов смеси семян растений (салат, кукуруза, морковь, капуста) на размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* с помощью специально сконструированной установки. В результате эксперимента было показано, что летучие метаболиты прорастающих семян стимулировали размножение исследуемых бактерий в 10–100 раз по сравнению с контролем (рис. 2). Анализ полученных данных позволил сделать заключение, что интенсивность размножения листерий и иерсиний на летучих метаболитах смеси растений зависела от вида бактерий. Так, количество бактерий *Y. pseudotuberculosis* в минеральной среде увеличилось в 2 раза на 7 сут роста, по сравнению с листериями. Полученные результаты подтверждаются данными литературы, где имеется указание на то, что не все бактерии способны усваивать летучие метаболиты прорастающих семян [19]. Следует отметить также, что иерсиний размножалась на летучих метаболитах на протяжении всего срока наблюдения (8 сут), а у листерий на шестые сутки интенсивность размножения значительно снизилась (рис. 2).

Известно, что использование летучих органических соединений, зависит от вида бактерий и прорашиваемых семян [24]. В связи с этим нами был изучен рост листерий и иерсиний на метабо-

литах растений в зависимости от вида прорашиваемых семян. Для этого исследуемые бактерии культивировали на летучих метаболитах прорастающих семян отдельных видов растений, являющихся для них факторами передачи: листерий – на кукурузе и салате, а иерсиний – на метаболитах моркови и капусты.

Обнаружено, что использование летучих соединений растений бактериями зависело как от свойств самих бактерий, так и от вида растений. При сопоставлении данных, полученных при культивировании микроорганизмов на летучих веществах смеси семян и отдельно взятых растениях, наблюдали избирательный рост бактерий на метаболитах прорастающих семян в зависимости от вида растений (рис. 2). Так, иерсиний практически одинаково размножались как на летучих метаболитах моркови, так и на летучих метаболитах капусты, достигая максимальной концентрации 400 100 КОЕ/0.1 мл, при заражающей дозе 130 КОЕ/0.1 мл, что несколько ниже (на 239 900 КОЕ/0.1 мл), чем в опыте с использованием смеси семян всех растений. Листерий предпочтительно размножались на летучих метаболитах кукурузы, достигая при этом значений 260 200 КОЕ/0.1 мл при заражающей дозе 130 КОЕ/0.1 мл, что на 25 759 800 КОЕ/0.1 мл выше, по сравнению с ростом на летучих метаболитах смеси растений. При этом регистрировали увеличение численности листерий и иерсиний на протяжении всего срока наблюдения (8 сут). В опыте с одновременным использованием семян всех растений увеличение численности листерий не было отмечено, а в контроле интенсивность размножения этих бактерий падала до нуля.

По данным некоторых авторов [19, 24], качественный состав летучих выделений может положительно либо отрицательно влиять на процесс потребления этих соединений бактериями. Ряд исследователей [20, 26] отмечает, что основными компонентами, служащими источниками углерода и энергии в выделениях прорастающих семян, являются этанол и ацетальдегид. Другие авторы

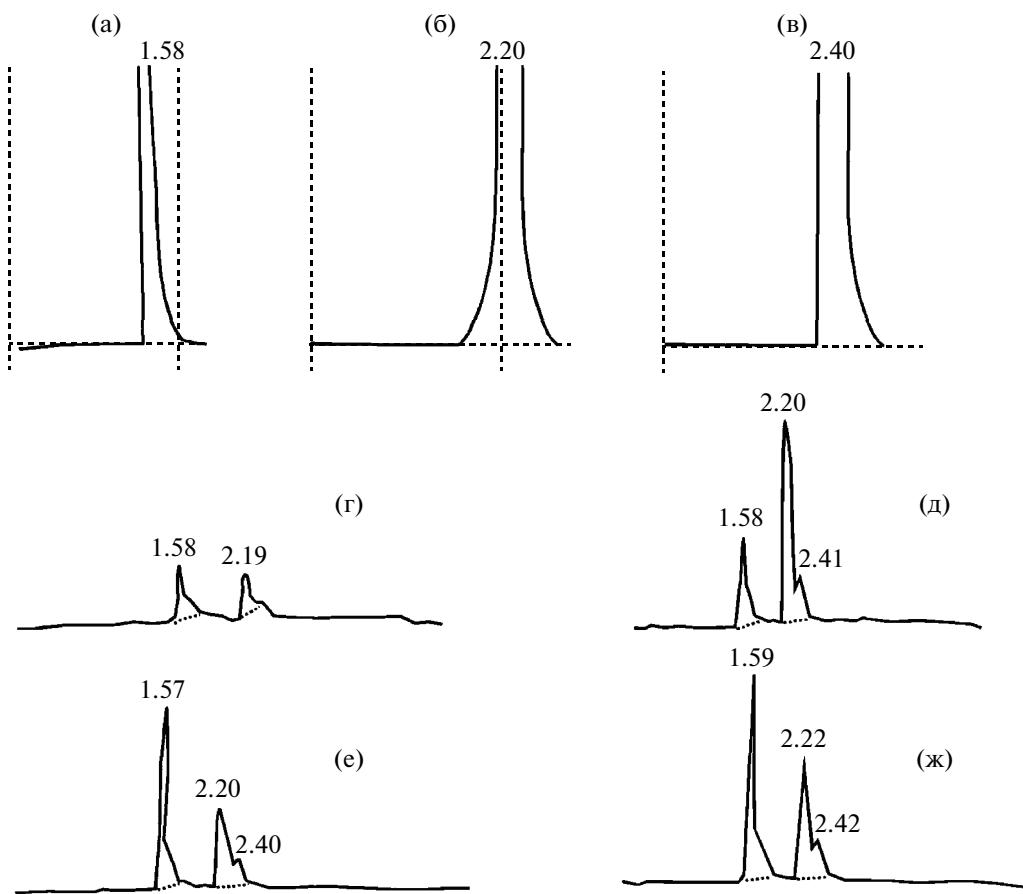


Рис. 3. Хроматограммы летучих метаболитов прорастающих семян (показаны наиболее информативные участки), а – ацетальдегид (контроль), б – метанол (контроль), в – этанол (контроль), г – морковь, д – кукуруза, е – капуста, ж – салат. Цифры на максимумах указывают время выхода пика на хроматограмме данного соединения для определения максимума его поглощения.

указывают на то, что летучие метаболиты прорастающих семян содержат метанол, пропанол, муравьиный и пропионовый альдегиды, ацетон, этилен. [21, 25].

Для выяснения зависимости между ростом численности бактерий и качественным составом летучих метаболитов прорастающих семян был проведен газохроматографический анализ летучих веществ. Из данных хроматографического анализа прорастающих семян кукурузы, моркови, салата, капусты, представленных на рис. 3, видно, что их летучие вещества содержали в достаточно высоких концентрациях ацетальдегид, метанол, этанол. При этом наибольшее количество метанола выделялось проростками кукурузы, гораздо меньше его содержали летучие выделения проростков моркови, капусты и салата. Поскольку в присутствии прорастающих семян кукурузы наблюдалось более интенсивное размножение *L. monocytogenes*, чем в опытах с салатом и смесью семян, установлено, что одним из основных веществ, влияющих на размножение листерий, являлся метанол.

По данным хроматографических исследований, летучие выделения капусты и моркови содержали метанола меньше, чем ацетальдегида (рис. 3). Кроме того, они выделяли меньшее количество метанола, чем кукуруза. Было показано, что при культивировании *Y. pseudotuberculosis* отдельно на летучих метаболитах прорастающих семян моркови и капусты бактерии размножались хуже, чем на летучих метаболитах смеси семян, в состав которых входила кукуруза. Полученные данные позволяют предположить, что в условиях лимитирования источника углерода, иерсинии так же, как и листерий, используют для питания метанол. В ранее опубликованных нами исследованиях было показано, что метанол стимулирует размножение иерсинии и листерий в физиологическом растворе и фосфатно-солевом буфере [29, 30].

Таким образом, установлен один из механизмов адаптации листерий и иерсинии к условиям окружающей среды: летучие метаболиты прорастающих семян могут являться для них единственным источником углерода и энергии. Показано, что основным летучим веществом, влияющим на

рост и размножение изучаемых бактерий, является метанол.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: экологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1988. 208 с.
2. Литвин В.Ю., Сомов Г.П., Пушкирова В.И. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 1. С. 10–16.
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолова С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех, 2002. 200 с.
4. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкирова В.К., Романова Ю.М., Баев Б.В. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. /Ред. С.В.Прозоровский. М.: Изд-во Фаргус-Принт, 1998. 256 с.
5. Герциун В.И. Экология возбудителей сапронозов. М.: Наука, 1988. С. 80–85.
6. Литвин В.Ю. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. 1999. № 5. С. 26–33.
7. Тимченко Н.Ф., Булгаков В.П., Булах Е.В., Яснецкая Е.Г., Журавлев Ю.Н. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. 2000. № 1. С. 6–10.
8. Тирранен Л.С., Шиленко М.П. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008. Т. 42. № 6/1. С. 36–39.
9. Маркова Ю.А., Романенко А.С., Игумнова Е.К., Салиев Р.К. // Доклады РАН. 2002. Т. 386. № 2. С. 277–279.
10. Маркова Ю.А., Романенко А.С., Духанина А.В. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 4. С. 1–4.
11. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 168 с.
12. Alfano J.R., Collmer A. // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1683–1698.
13. Ausubel F.M. // Nat. Immunol. 2005. V. 6. № 10. P. 973–979.
14. Рожкова Л.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (псевдотуберкулез человека). Владивосток: Дальнаука, 1974. С. 35–38.
15. Годова Г.В., Пушкирова В.К., Калашникова Е.А., Борисова Е.Ю., Ермолова С.А., Литвин В.Ю. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2009. № 4. С. 80–89.
16. Денисов К.А., Усенко А.Д., Слюсарь Л.И., Ванханен В.В., Беседина Е.И., Ванханен В.Д., Мельник В.А. // Вестник гигиены и эпидемиологии. 2000. Т. 4. № 2. С. 219–223.
17. Falkao D.P., Correa E.F., Falkao G.P. // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 529. P. 341–343.
18. JasfconA O., Taylor C.B. // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1651–1668.
19. Morello J.E. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 5. P. 3103–3109.
20. Mounier J., Goerges S., Gelsomino R., Vancanneyt M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Brennan N.M., Scherer S., Swings J., Fitzgerald G.F., Cogan T.M. // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 101. P. 668–681
21. Бурмистрова А.Л. Антибиотики и антибиотикорезистентность. Проблемы и пути решения. Челябинск: Изд-во “Челябинский Дом печати”, 2004. 179 с.
22. Tirranen L.S. // Adv. Space Res. 2006. V. 38. P. 1227–1232.
23. Tirrcmen L.S., Gitelson I.I. // Adv. Space Research. 2006. V. 38. P. 1227–1232.
24. Tirranen L.S., Borodina E.V., Ushakova S.A., Rygalov V.Ye., Gitelson I.I. // Acta Astronautica. 2001. V. 49. № 2. P. 105–108.
25. Tirranen L.S. // Acta Astronautica. 2001. V. 49. № 1. P. 47–52.
26. Андреев Л.Н., Талиева М.Н. // Бюлл. ГБС. 1995. Вып. 171. С. 161–167.
27. Власов А.А., Павлова И.Б. // Сельскохозяйственная биология 2009 № 4 С. 89–92
28. Ermolaeva S., Belyi Y., Tartakovskii I. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 174. № 1. P. 137–141.
29. Бузолева Л.С, Сомов Г.П. // Биохимия. 1999. Т. 64. Ж10. С. 1357–1361.
30. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 273–277.