

УДК517.121+582.232+616.981.25:616.981.49

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ МОРСКОЙ  
МИКРОВОДОРОСЛИ PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM НА  
РАЗМНОЖЕНИЕ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И SALMONELLA  
TYPHIMURIUM**

**<sup>1</sup>Кривошеева А.М., <sup>1,2</sup>Бузолёва Л.С., <sup>3</sup>Айздайчер Н.А.**

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» СО РАМН, Владивосток;

<sup>2</sup>ФГОАУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток;

<sup>3</sup>Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток,  
e-mail: an\_gel\_us@mail.ru

Изучено биологическое действие фракций этилацетатного экстракта (ЭАЭ) экзометаболитов морской микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* на размножение патогенных бактерий – *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*. Показано, что стимулирующий эффект фракции 1 на рост патогенных бактерий увеличился в 2-3 раза в 1-2 день культивирования бактерий по сравнению с действием исходного ЭАЭ. Фракция 2 ингибировала рост только *S.typhimurium*. Методика получения биологически активных веществ, стимулирующих рост *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* может быть использована для приготовления диагностикума с целью выявления патогенных бактерий из морской среды.

**Ключевые слова:** *Phaeodactylum tricornutum*, морская среда, экзометаболиты, размножение патогенных бактерий, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, биологическое действие

**BIOLOGICAL ACTION OF EXOMETABOLITES OF MARINE MICROALGAE  
PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM ON THE REPRODUCTION OF  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND SALMONELLA TYPHIMURIUM**

**<sup>1</sup>Krivosheeva A.M., <sup>1,2</sup>Buzoleva L.S., <sup>3</sup>Aizdaicher N.A.**

<sup>1</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology of G.P. Somova RAMS, Vladivostok;

<sup>2</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok;

<sup>3</sup>A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,  
Vladivostok, e-mail: an\_gel\_us@mail.ru

It was studied the biological action of fractions ethyl acetate extract (EAE) of exometabolites marine microalgal *Phaeodactylum tricornutum* on the reproduction pathogenic bacteria – *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. It was shown that stimulatory effect of fraction 1 on the grown of pathogenic bacteria by 2-3 times at 1-2 days cultivation. Method of obtaining biologically active substances – stimulators reproduction of bacteria, can be used for the purpose of detecting these pathogenic bacteria from the marine environment.

**Keywords:** *Phaeodactylum tricornutum*, marine environment, exometabolites, reproduction of pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, biological action

В настоящее время морская среда, в результате антропогенного загрязнения, часто является источником бактерий патогенных и потенциально-патогенных для человека и животных. В прибрежной воде, особенно в местах сброса сточных вод, могут быть обнаружены разнообразные патогенные микроорганизмы (холерные вибрионы, легионеллы, сальмонеллы, стафилококки, псевдомонады, иерсинии, листерии и др.), которые обитают и длительно сохраняются в естественных условиях водоемов (4).

Многосторонне изучено воздействие абиотических факторов на существование и популяционную динамику ряда патогенных бактерий – псевдотуберкулезного микроба, кишечных иерсиний, листерий и др. [1].

Изучение биотических факторов, способствующих длительному сохранению патогенных бактерий в водных экосистемах, началось сравнительно недавно. Актуаль-

ным является изучение факторов выживания популяций патогенных бактерий в водной морской среде и путей их циркуляции, связанных с гидробионтами. Симбиотическое взаимодействие патогенных микроорганизмов с различными сообществами водных биот: простейшими, моллюсками, червями, рыбами и другими гидробионтами позволяет им выживать в морской среде [4].

Другим фактором выживания патогенных бактерий в водной среде является их способность к симбиотическим взаимоотношениям с одноклеточными водорослями. Экспериментальными исследованиями показано, что адгезия и колонизация клеток сальмонелл к поверхностям микроводорослей, а также сохранность клеток хлорелл, указывают на их симбиотические взаимоотношения и возможность накопления популяций сальмонелл в водной среде в летний период [5]. Микроводоросли выделяют

в морскую среду различные метаболиты. Максимальные величины внеклеточных выделений микроводорослей характерны для летнего периода, минимальные – для зимнего. Разнообразен химический состав экзометаболитов микроводорослей – это углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды и их производные, фитогормоны, фенолы, изопреноиды, витамины, токсины и др. [7]. Они оказывают стимулирующее, ингибирующее и другие влияния на сопутствующую микрофлору. В настоящее время ведется интенсивное изучение процессов выделения экзометаболитов водорослями как в природных популяциях, так и в лабораторных культурах, однако многие вопросы не ясны. Большой интерес представляет биологическая активность внеклеточных веществ, экскретируемых водорослями в окружающую среду, особенно ростстимулирующая активность, позволяющая патогенным бактериям выживать и размножаться в морских экосистемах.

В ранее опубликованных нами исследованиях было установлено, что экзометаболиты стационарной фазы роста микроводорослей стимулируют размножение патогенных бактерий [1, 2]. Показано также, что только экзометаболиты этилацетатного экстракта культуральной среды микроводоросли *P. tricornutum*, культивируемой в естественной морской воде, взятой в летний сезон, обладают ярко выраженным стимулирующим действием на рост всех взятых в эксперимент тест-микроорганизмов [2].

**Цель исследования.** Целью настоящего исследования является изучение влияния фракций этилацетатного экстракта экзометаболитов морской микроводоросли *P. tricornutum* на размножение патогенных бактерий – *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*.

#### Материалы и методы исследования

Исследование проводили с альгологически чистой культурой морской микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, полученной из коллекции Института биологии моря им. А.В.Жирмунского ДВО РАН (г. Владивосток). В качестве тест-культур исполь-

зовали штаммы *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*, типичные по своим культурально-морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам.

*P. tricornutum* культивировали в модифицированной среде Гольдберга [6], содержащей природную морскую воду соленостью 32 ‰, взятую в начале июля в б. Лазурная Уссурийского залива. Водоросль выращивали в 750 мл колбах с 250 мл среды при 200 °С с использованием свето-темнового режима – 12 ч: 12 ч при освещении люминесцентными лампами 3500 лк в течение 14 суток до стационарной стадии роста культуры. Исходная концентрация клеток составляла  $2 \cdot 5 \times 10^4$  кл/мл, в конце опыта –  $1100 \cdot 1300 \times 10^4$  кл/мл.

Клетки микроводоросли отделяли от культуральной жидкости (КЖ) центрифугированием при 6000 об/мин. КЖ фильтровали через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Экзометаболиты (ЭМ) микроводоросли *P. tricornutum* получали экстракцией этилацетатом культуральной жидкости, взятой в стационарной фазе роста. Таким образом были получены: вещества этилацетатного экстракта (ЭАЭ) КЖ. Вещества ЭАЭ КЖ дополнительно разделяли на колонке с силикагелем (40-63 мкм), используя растворители (гексан, этилацетат-метанол, метанол), получили 4 фракции. Исследовали биологическое действие всех фракций экзометаболитов микроводоросли на рост *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*. Контролем служили аналогичные фракции органических веществ, полученные колоночной хроматографией ЭАЭ природной морской воды.

Изучение динамики роста штаммов *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* в среде Патерсона-Кука (рН 7,2 – 7,4) с 0,1 % глюкозой и экзометаболитами (40 мкг/мл) проводили при периодическом культивировании в течение 14 суток при температуре 20 °С. Численность бактерий определяли спектрофотометрически по оптической плотности (ОП) культуральной среды при  $\lambda = 600$  нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) и T70 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd (Англия). Биологическую активность экзометаболитов микроводоросли *P. tricornutum* определяли по изменению роста штаммов *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*, выраженному в процентах по отношению к контролю:  $ОП_{\text{к}}^{600} / ОП_{\text{к}}^{600} \times 100\% - 100\%$ . Контроль принимался за 100 %.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Данные, полученные в результате исследования биологической активности этилацетатного экстракта КЖ *P. tricornutum* представлены в табл. 1

**Таблица 1**

Биологическое действие экзометаболитов ЭАЭ КЖ микроводоросли *P. tricornutum* на рост *S. aureus* и *S. typhimurium* в % от контроля ( контроль взят за 100%)

Продолжительность опыта, сутки	1	2	3	6	7	8	9	10	13	14
Биологическое действие ЭАЭ КЖ на рост <i>S. aureus</i> , %	+33,9 ± 0,2	+50,0 ± 0,3	+36,9 ± 0,2	+55,6 ± 0,3	+14,5 ± 0,1	+34,1 ± 0,2	+37,0 ± 0,2	+25,3 ± 0,1	+25,3 ± 0,1	+31,1 ± 0,2
Биологическое действие ЭАЭ КЖ на рост <i>S. typhimurium</i> , %	+8,6 ± 0,02	+17,0 ± 0,1	+22,6 ± 0,1	+24,5 ± 0,1	+19,3 ± 0,1	+22,1 ± 0,1	+17,6 ± 0,1	+28,2 ± 0,2	+36,6 ± 0,2	+27,1 ± 0,2

Согласно данным табл. 1, экзометаболические ЭАЭ КЖ *P. tricornerutum* стимулировали рост стафилококков и сальмонелл на протяжении 14 суток наблюдений, однако больший эффект наблюдался для *S.aureus* – уже на 2 сутки рост увеличился на 50%.

Разделение ЭАЭ КЖ *P. tricornerutum* на отдельные фракции методом колоночной хроматографии на силикагеле дало 4 фрак-

ции веществ в порядке возрастания их полярности. Динамика роста *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* в среде Патерсона-Кука с 0,1% глюкозой и ЭМ фр.1 контроля и опыта при температуре 20°C представлена на рис. 1 и рис. 2.

Биологическое действие фракций представлено в табл. 2 и 3.



Рис. 1. Динамика роста *Staphylococcus aureus* в среде Паттерсона-Кука с 0,1% глюкозой и ЭМ фр.1 контроля и опыта при температуре 20°C

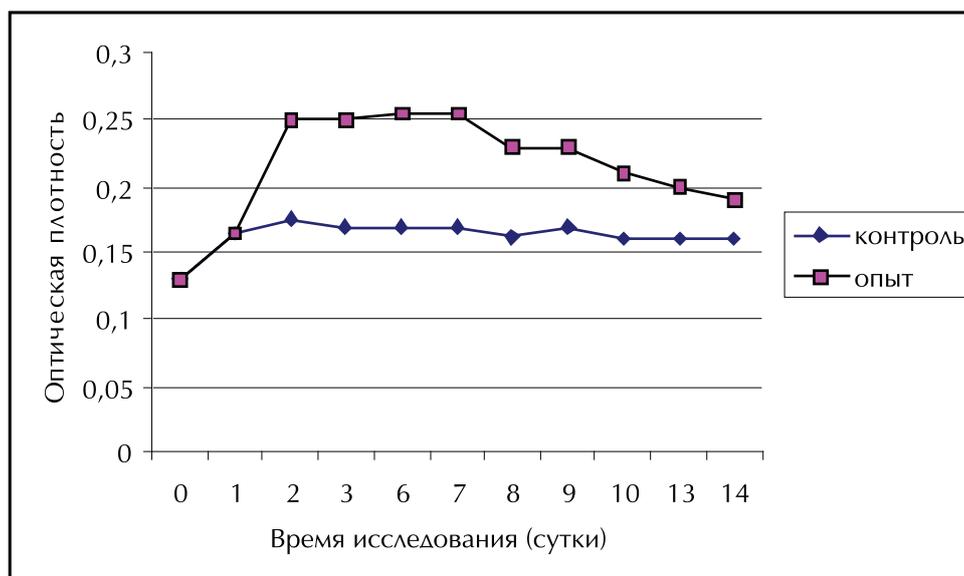


Рис. 2. Динамика роста *Salmonella typhimurium* в среде Паттерсона-Кука с 0,1% глюкозой и ЭМ фр.1 контроля и опыта при температуре 20°C.

Таблица 2

Биологическое действие фракций экзометаболитов ЭАЭ КЖ микроводоросли *P.tricornutum* на рост *Staphylococcus aureus* в % от контроля ( контроль взят за 100 %)

Фракции	1с	2с	3с	6с	7с	8с	9с	10с	13с	14с
Фр.1	+72,7 ± 0,3	+63,6 ± 0,3	+54,5 ± 0,3	+18,2 ± 0,1	+30,0 ± 0,2	+27,3 ± 0,2	+23,8 ± 0,2	+19,0 ± 0,1	+9,1 ± 0,03	+50,0 ± 0,3
Фр.2	0,0 ± 0,0	-7,1 ± 0,01	-13,0 ± 0,1	-39,3 ± 0,2	-51,9 ± 0,3	-56,8 ± 0,3	-74,6 ± 0,3	-75,6 ± 0,3	-77,3 ± 0,3	-63,0 ± 0,3
Фр.3	0,0 ± 0,0	+18,1 ± 0,1	+10,0 ± 0,03	-16,7 ± 0,1	-8,3 ± 0,03	-8,3 ± 0,03	-4,2 ± 0,02	-4,5 ± 0,02	-4,8 ± 0,02	-5,0 ± 0,02
Фр.4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-9,2 ± 0,03	-15,2 ± 0,1	-13,0 ± 0,1	+8,0 ± 0,03	+10,0 ± 0,1	+10,0 ± 0,1	+1,6 ± 0,01	0,0 ± 0,0

Таблица 3

Биологическое действие фракций экзометаболитов ЭАЭ КЖ микроводоросли *P.tricornutum* на рост *Salmonella typhimurium* в % от контроля ( контроль взят за 100 %)

Фракции	1с	2с	3с	6с	7с	8с	9с	10с	13с	14с
Фр.1	0,0 ± 0,0	+47,1 ± 0,3	+47,1 ± 0,3	+47,1 ± 0,3	+50,0 ± 0,3	+42,0 ± 0,2	+35,3 ± 0,2	+27,3 ± 0,2	+25,0 ± 0,1	+18,8 ± 0,1
Фр.2	+2,6 ± 0,02	+2,5 ± 0,02	+6,4 ± 0,03	+2,6 ± 0,02	+1,1 ± 0,01	+4,3 ± 0,02	+9,8 ± 0,03	+9,1 ± 0,03	+5,3 ± 0,03	+17,4 ± 0,1
Фр.3	-2,3 ± 0,02	-3,6 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	+4,7 ± 0,03	+9,1 ± 0,03	+10,3 ± 0,1	+11,1 ± 0,1	+8,0 ± 0,03	-1,5 ± 0,01
Фр.4	0,0 ± 0,0	+2,3 ± 0,01	+4,7 ± 0,03	0,0 ± 0,0	-3,6 ± 0,02	-1,8 ± 0,01	-3,2 ± 0,02	-1,5 ± 0,01	-2,4 ± 0,01	+2,7

Как видно из данных, представленных на рис. 1, 2 и в табл. 2, 3 вещества фр.1 стимулировали рост стафилококков и сальмонелл на протяжении 14 суток наблюдений с максимальным эффектом 72,7% на 1 сутки для стафилококка (рис. 1, табл. 2) и 47,1-50,0% на 2-7 сутки для сальмонеллы (рис.2, табл.3). Сравнение результатов по биологическому действию ЭАЭ КЖ и фр.1 (табл. 1, 2, 3) показало, что ростстимулирующий эффект фр.1 в 2 раза выше для *Staphylococcus aureus* уже на 1 сутки культивирования и в 2,8 раза для *Salmonella typhimurium* на 2 сутки.

По данным литературы, стимулирующее действие экзометаболитов на размножение сопутствующей микрофлоры объясняется влиянием метаболитических органических веществ микроводоросли, являющихся доступным питательным субстратом для бактерий [9]. Другие авторы объясняют стимулирующее действие экзометаболитов зеленых водорослей присутствием фитогормонов, которые выделяются в среду [10].

Фр. 2 обладала уже ингибирующим действием на рост *Staphylococcus aureus* (максимальный эффект 77,3% на 13 сутки), а на рост *Salmonella typhimurium* фр.2 про-

должала оказывать слабое стимулирующее действие. Биологическое действие фр.3 и фр.4 было незначительным как для стафилококка, так и для сальмонеллы.

Из литературы также известно, что близкое расположение фракций стимуляторов и ингибиторов свидетельствует о сходстве их строения, однако, вещества сходного строения могут проявлять разную биологическую активность, их биологическое действие зависит от концентрации и соотношения этих веществ [3].

**Заключение.** Таким образом, мы выяснили, что экзометаболиты морской микроводоросли *P. tricornutum*, культивируемые в естественной морской воде летнего сезона содержат вещества, обладающие ростстимулирующим и ростингибирующим действием на патогенные бактерии – *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*, причем ростстимулирующая активность экзометаболитов микроводоросли преобладает, что дает возможность бактериям размножаться в морской среде.

Экстракцией этилацетатом КЖ *P. tricornutum* получили стимуляторы роста патогенных бактерий. Сочетанием методов экстракции КЖ микроводоросли этилацетатом и разделения активных веществ ко-

лоночной хроматографией можно добиться выделения максимально активной фракции экзометаболитов *P. tricorntutum*, стимулирующей рост стафилококков и сальмонелл эффективнее в 2-3 раза.

Методика получения биологически активных веществ, стимулирующих рост *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* может быть использована для приготовления диагностикума с целью выявления патогенных бактерий из морской среды.

#### Список литературы

1. Бузолева Л.С., Терехова В.Е. Выживаемость штаммов бактерий *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* в морской и речной воде // Биол. моря. 2002. № 4. С. 286-290.
2. Бузолева Л.С., Терехова В.Е., Кривошеева А.М. Влияние экзометаболитов морских микроводорослей на размножение патогенных бактерий // Журн.микробиол., 2010. № 2. С. 96-99.
3. Вахитов Т.Я. Регуляторные функции бактериальных экзометаболитов на внутривидовом и межвидовом уровнях: дис. ... канд. биол. наук. СПб, 2006. 561 С.
4. Литвин В.Ю. и др. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М. ФАРМАРУС ПРИНТ. 1997.
5. Зуев В.С. Факторы выживания популяций сальмонелл и их взаимоотношения с некоторыми гидробионтами: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. –М., 2004. 18 с.
6. Кабанова Ю.Г. О культивировании в лабораторных условиях планктонных диатомовых и перидиниевых водорослей. // Тр. ин-та океанологии. – М.: Изд-во АН СССР. 1961. Т. 47. С. 203-215.
7. Максимова.И.В., Горская Н.В. Внеклеточные органические продукты микроводорослей. Химический состав // Биологические науки. 1980. № 6. С.5-21.
8. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток, Примполиграфкомбинат, 2004. 167 с.
9. Newell B.S., Dalpont G.A., Grant B.R. The production of extracellular nitrogenous substances by a *Phaeodactylum tricorntutum* // *Canad.J.Bot.* 1972. Vol.50.N12.P.2605.
10. Ordog V. Beneficial effects of microalgae and cyanobacteria in plant/soil-systems, with special regard to their auxin- and cytokinin-like activity // Intern/ Workshop and Training course on Microalgal Biology and Biotechnology. Mosonmagyarovar, Hungary, 1999. P. 43-44.