

УДК 577.121+616.981.136

## ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ МЕТАБОЛИТОВ САПРОФИТНОЙ МИКРОФЛОРЫ РАЗНЫХ ТИПОВ ПОЧВ НА РАЗМНОЖЕНИЕ *Listeria monocytogenes*

<sup>1</sup>Ли Н.Г., <sup>1,2</sup>Бузолева Л.С., <sup>1,3</sup>Сидоренко М.Л.

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» СО РАМН, Владивосток, e-mail: secr\_niem@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, e-mail: buzoleva@mail.ru;

<sup>3</sup>ФГБУН «Биолого-почвенный институт ДВО РАН», Владивосток, e-mail: sidorenko@biosoil.ru

Изучено влияние летучих метаболитов сапрофитных бактерий, выделенных из выбранных типов почв (бурая лесная типичная, дерново-подзолистая, буро-подзолистая, бурая лесная оглеенная), на размножение *Listeria monocytogenes*. Показано, что сапрофитные бактерии, выделенные из разных типов почв, оказали различную степень стимуляции размножения листерий. Большую степень биологической активности на *Listeria monocytogenes* проявили штаммы, выделенные из почв с неблагоприятными для микроорганизмов условиями.

**Ключевые слова:** метаболиты бактерий, сапрофитная почвенная микрофлора, *Listeria monocytogenes*, стимуляция размножения бактерий

## EFFECT OF VOLATILE METABOLITES OF SAPROPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT SOIL TYPES ON THE REPRODUCTION *Listeria monocytogenes*

<sup>1</sup>Lee N.G., <sup>1,2</sup>Buzoleva L.S., <sup>1,3</sup>Sidorenko M.L.

<sup>1</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok, e-mail: secr\_niem@mail.ru;

<sup>2</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: buzoleva@mail.ru;

<sup>3</sup>Institute of Biology and Soil Science, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, e-mail: sidorenko@biosoil.ru

It was studied effect of volatile metabolites of saprophytic bacteria isolated from different soil types on the reproduction of *Listeria monocytogenes*. It is shown that saprophytic bacteria isolated from different soil types have different degrees of stimulation of reproduction *Listeria monocytogenes*. The strains of soil microorganisms isolated from environment with the adverse conditions are have greater degree of biological activity on reproduction *Listeria monocytogenes*.

**Keywords:** bacteria metabolites, saprophytic soil microorganisms, *Listeria monocytogenes*, stimulation of bacteria growth

Выживание патогенных бактерий, занимающих различные экологические ниши, может быть основано на симбиотическом взаимоотношении с различными биологическими объектами. Подобное взаимодействие патогенных микроорганизмов с представителями биоценоза различных естественных экосистем позволяет им сохраняться в сапрофитическом состоянии в межэпидемические периоды [4].

Одной из экологических ниш для патогенных бактерий является почва, имеющая свою биоту, составной частью которой является множество микроорганизмов с разнообразными биологическими свойствами. Жизнедеятельность микроорганизмов в почве осуществляется в основном на почвенных частицах, в определенных микроразделах которых представлены клетки, питательные вещества и микробные метаболиты.

Многие исследователи [1, 2] считают, что соединения, продуцируемые микроор-

ганизмами, могут действовать как внутри- или межвидовые регуляторы микробных сообществ. Помимо веществ растворимых в воде, среди метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, есть и летучие вещества [12]. При этом отмечено как стимулирующее, так и ингибирующее действие веществ микробного происхождения на размножение микроорганизмов [7, 12]. Изучение характера взаимоотношений между бактериями в микробиоценозах имеет большое значение для выяснения роли отдельных компонентов в биологических сообществах.

Возможность того, что естественная микрофлора почвы может оказывать положительное влияние на сохранение патогенных микроорганизмов, представляет особый интерес для исследований в этом направлении. В отношении влияния почвенной микрофлоры на биологические свойства патогенов, входящих в состав микробного

сообщества, имеются единичные работы [5, 7, 9].

Возбудитель листериоза, как представитель сапрозоонозной инфекции, длительно сохраняется и размножается в почвенных экосистемах [3, 11].

В настоящее время установлено, что на жизнеобитание этих бактерий в почвах оказывают влияние как абиотические факторы среды [6, 10], так и биотические [7, 8]. Влияние метаболитов сапрофитных почвенных бактерий, ассоциированных с листериями в почвенных сообществах, на размножение *Listeria monocytogenes* практически не изучено.

**Цель исследования.** Цель настоящей работы – изучить влияние летучих метаболитов сапрофитных бактерий, выделенных из микробоценозов разных типов почв, на размножение *Listeria monocytogenes*.

**Материалы и методы исследования**

При проведении экспериментальных исследований в качестве объектов исследования были использованы штаммы сапрофитных бактерий, выделенные из разных типов почв: бурая лесная типичная, бурая лесная оглеенная, дерново-подзолистая, бурно-подзолистая. Почвенные образцы отбирали из верхнего (0-10 см) горизонта.

Для каждого типа почвы были определены указанные показатели (табл. 1).

**Таблица 1**

Физико-химические свойства почвенных образцов

Показатели тип почвы	pH	Гумин, %	C, %
бурая лесная типичная	6,5	17,39	2,0
дерново-подзолистая	5,4	30,5	2,5
бурно-подзолистая	7,3	22,14	2,6
бурая лесная оглеенная	5,5	10,4	1,1

Выбор представленных биотопов объясняется тем, что наибольшее количество выделений *L. monocytogenes* отмечается в почвах лесной зоны (Гершун, 1988; Сомов, Литвин, 1988). Данные биотопы представляют высокий риск в распространении листериозной инфекции.

В качестве тест-микроорганизмов для исследования были использованы штаммы *Listeria monocytogenes*, типичные по своим культуральным, серологическим и биохимическим свойствам, взятые из музея «НИИЭМ имени Г.П. Сомова» СО РАМН.

Сапрофитные бактерии выделяли и выращивали для экспериментов на пептонном агаре (ПА) (1% пептона, 0,5% NaCl на дистиллированной воде с 2%-м агаром, pH=7,4) при температуре 22 °С, 20-24 ч. Листерии культивировали на питательном агаре с дрожжевым экстрактом и 0,1% глюкозой при температуре 37 °С, 20-24 ч.

Морфотипы сапрофитных бактерий выделяли по морфологическим и культуральным признакам колоний. Микроскопию, окрашенных по Граму мазков, проводили на микроскопе Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Германия).

Для определения биологической активности летучих метаболитов использовали скрининговый экспресс-метод Л.С. Тирранен (1980) в нашей модификации. Культуру сапрофитных бактерий высевали газоном на чашки Петри с питательным агаром. На чашки Петри с казеиново-дрожжевым агаром производили посев уколом культуры листерий. Чашки

с посевами сапрофитов и листерий соответственно состыковывали. Посевы выдерживали в течение семи суток при комнатной температуре.

Для оценки размножения *L. monocytogenes* измеряли зоны роста в месте укола. Воздействие культуры сапрофитов на тест-культуру *L. monocytogenes* оценивали как положительное (стимулирующее) или отрицательное (ингибирующее), когда размер колоний тест-культур в опыте был соответственно увеличен или снижен на 20% и более по сравнению с контролем. Если размер колоний тест-культуры *L. monocytogenes* в опыте отличался от контрольной не более чем на ±20%, действие испытуемой культуры оценивали как нулевое. Долю случаев положительного влияния летучих метаболитов на листерии выражали в процентах (%). Критерием отбора активных штаммов, проявивших максимальную стимуляцию размножения листерий, служил диаметр зон роста листерий больше 10 мм ( $d \geq 10$ ).

Все опыты проводились в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Всего было выделено 135 морфотипов сапрофитных бактерий, различных по своим культуральным и морфологическим признакам (табл. 2).

Таблица 2

Биологическая активность и численность морфотипов сапрофитных бактерий, выделенных из разных типов почв

Источник выделения	Общее количество штаммов	Доля случаев положительного влияния на рост листерий, %	Количество активных штаммов	Количество штаммов, активных в отношении <i>L. monocytogenes</i> , серотип 4b
бурая лесная типичная	53	76,5	7	1
дерново-подзолистая	23	48,3	6	2
буро-подзолистая	35	55,7	10	3
бурая лесная оглеенная	24	32,5	5	3

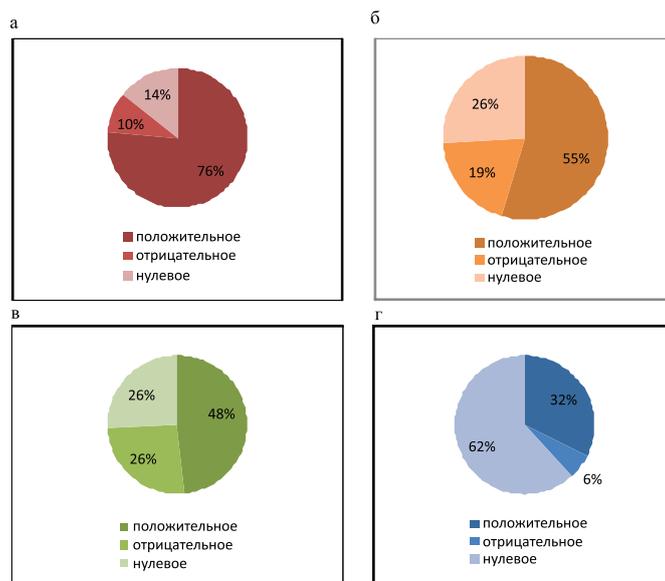
Высокие показатели численности морфотипов (табл. 2), выделенных из бурой лесной типичной и буро-подзолистой объясняются тем, что для данных типов почв характерен богатый растительный опад, преимущественно широколиственных пород, слабокислая реакция среды, высокая насыщенность основаниями и достаточное количество легкоокисляемой органики, что способствуют интенсивному развитию в них микроорганизмов и многообразию видов.

Меньшая численность морфотипов (в 2 раза меньше по сравнению с бурой лесной типичной), выделенных из дерново-подзолистой почвы объясняется малой мощностью дернового горизонта и кислой реакцией (рН=5,4), которая неблагоприятна для многих микроорганизмов.

Численность морфотипов, выделенных из бурой лесной оглеенной почвы, также низка, по сравнению с бурой лесной типич-

ной. Это объясняется типичным для бурой лесной оглеенной почвы рядом характеристик. Процессы оглеения, происходящие в бурой лесной оглеенной почве, связаны с избыточным переувлажнением, развитием восстановительных процессов в анаэробных условиях, подкислением реакции почвы, что неблагоприятно отражается на качественной и количественной структуре микрофлоры этих почв.

Если рассматривать показатели биологической активности выделенных штаммов на тест-культуре, то видно, что сапрофитная микрофлора бурых лесных типичных почв оказывает наибольшее стимулирующее влияние на листерии, по сравнению с сапрофитными бактериями, выделенными из остальных типов почв (буро-подзолистая, дерново-подзолистая, бурая лесная оглеенная) (рисунок 1, а). При этом наибольшее количество активных штаммов выделено из буро-подзолистой почвы (табл. 2).



Оценка влияния летучих метаболитов сапрофитных бактерий, выделенных из разных типов почв, на размножение листерий, (% случаев):

а – бурая лесная типичная, б – буро-подзолистая, в – дерново-подзолистая, г – бурая лесная оглеенная

Штаммы, выделенные из бурой лесной оглеенной почвы оказывали стимулирующее влияние в 32% случаев (рис. 1, г). На диаграмме показано, что большинство случаев характеризовались как нулевые, они могли быть слабо отрицательными или слабо положительными. Но, несмотря на меньшее число морфотипов и количество активных штаммов из бурой лесной оглеенной почвы, они в большей степени проявили биологическую активность в отношении эпидемически значимого штамма *L. monocytogenes*, серотип 4b (табл. 2).

Результаты сравнительной характеристики показывают зависимость количества морфотипов бактерий и их биологической активности от источника выделения (типы почв). Выявлено, что показатели биологической активности выше у штаммов, выделенных из почв с неблагоприятными для микроорганизмов условиями.

### Выводы

Таким образом, отмечено стимулирующее, ингибирующее и нулевое действие летучих метаболитов сапрофитных почвенных бактерий. Количественная оценка влияния летучих метаболитов на размножение листерий, показала, что в большинстве случаев преобладает положительное действие. Так же выявлено, что численность морфотипов бактерий, а также их биологическая активность в отношении листерий зависела от условий типа почв из которых они выделены. Большую степень биологической активности проявили штаммы из почв с неблагоприятными для микроорганизмов условиями.

### Список литературы

1. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2010. Т. 12, № 4. С. 347–352.
2. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболитов бактерий // *Микробиология.* 2006. Т. 75, № 4. С. 483–488.
3. Гершун В.И. Распространение листерий в объектах внешней среды / *Изв. АН Казахской ССР. Серия биологическая.* Алма-Ата. 1980. № 6. С. 42–44.
4. Зуев В.С. Сапрофитизм патогенных бактерий // *Ветеринарная патология.* 2004. № 4. С. 11–16.
5. Литвин В.Ю., Пушкарева В.И., Ермолаева С.А. Патогенные листерии и почвенные простейшие: сопряженность жизненных циклов // *Успехи современной биологии.* 2008. № 3. С. 245–251.
6. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С., Костенков Н.М. Влияние свойств почв на сохранение и размножение листерий и иерсиний // *Почвоведение.* 2006. № 2. С. 237–243.
7. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. Характер взаимоотношений сапрофитной микрофлоры почв через газообразные метаболиты // *Микробиология.* 2008. Т. 77, № 2. С. 273–277.
8. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. Влияние летучих метаболитов прорастающих семян на размножение бактерий *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2012. Т. 48, № 3. С. 308–312.
9. Солохина Л.В., Пушкарева В.И., Литвин В.Ю. Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зеленых водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов // *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2001. № 3. С. 17–22.
10. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. – Владивосток: ОАО «Примполиграфкомбинат», 2004. 167 с.
11. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: Экологические аспекты. – Новосибирск: Наука, 1988. – 208 с.
12. Торотенкова В.Н., Тирранен Л.С., Сысоева О.В. Взаимодействие микроорганизмов через продуцируемые ими летучие вещества // *Вестник КрасГАУ.* 2009. № 12. С. 150–154.