

УДК 579.26

## ФАКТОРЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ВЫЖИВАНИЮ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПРОЗООНОЗОВ В МОРСКОЙ СРЕДЕ

<sup>1,2</sup>Бузолева Л.С., <sup>2</sup>Кривошеева А.М., <sup>1,2</sup>Богатыренко Е.А., <sup>1</sup>Ким А.В.

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, e-mail: buzoleva@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИЭМ им. Г.П. Сомова» СО РАМН, Владивосток

Показано, что способность *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* выживать в водной среде зависит от свойств штамма и температуры. Установлено, что штаммы листерий и иерсиний, адаптированные к низким температурам, размножаются в морской воде при низких положительных температурах и сохраняются длительное время. Исследована биологическая активность экзометаболитов (ЭМ) морских микроводорослей в отношении *L. monocytogenes*. Установлено, что ЭМ альгокультур середины стационарной фазы роста микроводорослей стимулируют размножение листерий. ЭМ *Skeletonema costatum* обладали антилистериозным эффектом. Фракции ЭМ морских микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum* не активизируют размножение листерий, но стимулируют рост иерсиний и имеют белковую природу. ЭМ, выделенные из естественной морской воды, стимулировали рост листерий и были представлены в основном липидами.

**Ключевые слова:** сапрозоозы, морская среда, экзометаболиты, морские микроводоросли

## HABITATION OF SAPROZOONOSIS AGENTS IN THE MARINE ENVIRONMENT

<sup>1,2</sup>Buzoleva L.S., <sup>2</sup>Krivosheeva A.M., <sup>1,2</sup>Bogatyrenko E.A., <sup>1</sup>Kim A.V.

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: buzoleva@mail.ru;

<sup>2</sup>Research institute of epidemiology and microbiology n.a. G.P. Somov, Vladivostok

It is shown the ability of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* to survive in the water depends on properties of strain and temperature. It is established the strains of *L. monocytogenes* and *Y. pseudotuberculosis* adapted for low temperatures can reproduce in marine water at low positive temperatures and remain viable for a long time. Biological activity of marine microseaweed exometabolites (EM) concerning *L. monocytogenes* is investigated. It is established EM of algal cultures of the middle of a stationary growth phase stimulate the reproduction of *L. monocytogenes*. EM of *Skeletonema costatum* had antimicrobial effect against *L. monocytogenes*. EM fractions of marine microseaweed *Phaeodactylum tricornutum* don't intensify reproduction of *L. monocytogenes*, but stimulate growth of *Y. pseudotuberculosis* and have the proteinaceous nature. EM isolated from natural marine water stimulated growth of *L. monocytogenes* and were presented generally by lipids.

**Keywords:** saprozoonosis, marine environment, exometabolites, marine microseaweed

*Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* относятся к возбудителям сапрозоозов и обладают двойственной (сапрофитной и паразитической) природой, благодаря чему способны существовать как в эндотермных, так и в эктотермных организмах, растительных объектах, а также в почвенной и водной средах. Для них характерен широкий диапазон экологической толерантности, то есть способность выживать в различных условиях. Сведения о длительном существовании и размножении патогенных бактерий в наземных экосистемах довольно обширны [3]. Однако литературные данные об исследованиях их жизнеспособности в воде ограничены и разноречивы [1, 2]. Необходимость изучения этой проблемы очевидна, так как, начиная с конца 80-х годов и до настоящего времени, в ряде стран Европы и Америки отмечаются многочисленные вспышки листериоза, связанные с употреблением в пищу инфицированных морских продуктов [6, 8, 9]. Известно, что высеваемость листерий из морских гидробионтов доста-

точно высока (10–18%) [7, 10]. Можно предположить, что патогенные бактерии попадают в морскую среду вместе с паводковыми и грунтовыми водами, вымывающими их из береговых почв, а также со сточными и речными водами. При этом не исключена возможность длительного выживания листерий и иерсиний в морской воде, но неизвестны условия, при которых размножение этих бактерий становится возможным.

**Цель работы** – определить возможность размножения *L. monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* в морской воде при разных температурах, а также изучить влияние метаболитов морских организмов, в частности микроводорослей, на размножение патогенных бактерий в морской среде.

### Материал и методы исследования

В качестве объектов исследования были взяты референс-штаммы *Listeria monocytogenes*: 2 м, 10 CN, № 546, К, П, А, 1-А (1/2 а и 4b сероварианты), полученные из музея ВГНКИ ветпрепаратов, г. Москва, и штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* 512 и Н-2781 (1b серовариант) из музея Всероссийского центра по иерсиниозу и псевдотуберкулезам

(НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, г. Владивосток). Пробы воды были взяты в октябре в б. Лазурная Японского моря, в 100 м от берега. Стерилизацию морской воды проводили методом фильтрации через ватно-марлевый и бактериальный фильтры. Заражающую дозу, подобранную с помощью стандарта мутности (1000 клеток в 0,1 мл инокулируемой среды для нативной воды, 100 клеток в 0,1 мл среды для стерильной воды), вносили в морскую воду и культивировали при положительных температурах 6–8 и 20–25 °С. Для подсчета выживших в воде бактерий (КОЕ) 0,1 мл инокулированной воды высевали в определенные сроки на чашки Петри с питательной средой (дрожжевой агар с добавлением на 100 мл среды 0,2% глюкозы, 40 мг налидиксовой кислоты и 0,2 мл 10% раствора трипофлавина). Адаптированные к низкой температуре штаммы листерий и иерсиний получали путем пятикратного пассирования микроорганизмов и морской воды в течение одного месяца при температуре 6–8 °С.

Для изучения влияния экзометаболитов морских микроводорослей на размножение листерий и иерсиний был использован метод А.Х. Тамбиева с соавторами [4]. Для эксперимента были взяты альгологически чистые культуры микроводорослей, распространенные в прибрежных водах дальневосточных морей: Bacillariophyta – *Skeletonema costatum*, Chlorophyta – *Chlorella minutissima*, *Platymonas* sp., Cryptophyta – *Chroomonas salina*. Исключение составила культура *Phaeodactylum tricorutum*, выделенная из Красного моря, являющаяся универсальным альгологическим тест-объектом. Водоросли культивировали при температуре  $20 \pm 2$  °С и освещенности 3000 лк люминесцентными лампами со свето-темновым периодом 12 ч свет/12 ч темнота в питательной среде, приготовленной на основе натуральной стерильной морской воды соленостью 34 ‰. Стадию кривой роста определяли графическим методом (количество колоний выражали в lg). [5]. Экзометаболиты водорослей, взятых в экспоненциальной и стационарной фазах роста, получали центрифугированием в течение 30 минут со скоростью 2000 об/мин. В эксперименте ЭМ водорослей разводили физиологическим раствором 1:10, 1:1000 соответственно, после чего инокулировали *L. monocytogenes* (заражающая доза  $10^3$  КОЕ/мл). Температура культивирования 6–8 °С, время экспозиции 14 суток. Контролем служили кривые роста листерий в среде, используемой для культивирования водорослей, разведенной физиологическим раствором 1:10 и 1:1000 соответственно.

С целью изучения природы веществ, стимулирующих рост бактерий в морской среде, экзометаболиты микроводорослей *Phaeodactylum tricorutum*, выращенной как на искусственной, так и на естественной морской воде, получали последовательной экстракцией 1 л фильтрата культуральной жидкости рядом органических растворителей, в порядке возрастания их полярности (по 100 мл гексана, бензола, этилацетата). Экстракты упаривали в вакууме при 40 °С. Контролем служили аналогичные фракции, полученные в результате экстракции 1 л морской воды, как естественной, так и искусственной, пропущенной через бактериальный фильтр. Полученные фракции ЭМ были пропущены через бактериальные фильтры и использованы в качестве сред для культивирования бактерий, при этом заражающая доза бактерий составила 1000 кл/мл культивировали при 22 °С в течение двух недель (срок наблюдения). Рост бактерий определяли на спектрофотометре СФ-24 при длине волны 540 нм.

### Результаты исследования и их обсуждение

В ходе экспериментальных исследований было установлено, что музейные штаммы *L. monocytogenes*, *Y. pseudotuberculosis* быстро погибали в нестерильной морской воде при температуре 20–25 °С, но выживали при 6–8 °С (до 3–4 суток в зависимости от штамма). Наиболее устойчивыми к заданным условиям в морской воде оказались штаммы *L. monocytogenes* 2м, 10СN, наименее устойчивым – штамм *L. monocytogenes* К. В стерильной морской воде листерии размножались до  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/0,1 мл, как при температуре 6–8 °С, так и при 20–25 °С. При температурах выше 8 °С бактерии быстрее достигали максимальной численности, но дольше сохранялись при низкой температуре (до 1 месяца), если в воду вносили адаптированные к низкой температуре и голодным условиям штаммы бактерий и выращивали при температуре 6–8 °С. Следовательно, оптимальными условиями для размножения листерий в естественной морской воде является низкая температура культивирования и адаптированность штамма к условиям среды.

Сравнительные исследования показали, что в образцах фильтрованной морской воды численность сапрофитных микроорганизмов снижается в  $10^6$ – $10^7$  раз по сравнению с естественной морской водой, что позволяет патогенным бактериям не только длительно сохраняться, но и размножаться в фильтрованной морской воде. Следовательно, в холодное время года, когда количество сапрофитных бактерий в морской воде резко снижается, конкурентоспособность возбудителей сапрозоонозов, обладающих психрофильными свойствами, значительно возрастает. В связи с этим можно предполагать, что поздняя осень и ранняя весна являются наиболее вероятным временем для заражения гидробионтов, в том числе и широко используемых в пищу человеком.

Изучение влияния ЭМ морских микроводорослей показало, что ЭМ из экспоненциальной фазы роста нейтральны по отношению к *L. monocytogenes*. ЭМ середины стационарной фазы роста микроводорослей стимулируют размножение листерий. Лучшее всего листерии размножались на ЭМ зеленых и криптомоновых водорослей, при этом концентрации бактерий в указанных условиях к 14 суткам культивирования превышали контроль на 2,3 и 2,5 lg соответственно. Значительно меньше стимулировали рост бактерий ЭМ диатомовой водоросли. В данном случае количество бактерий за тот же период культивирования увеличилось лишь на 1,7 lg по сравнению с контролем.

Стимулирующее влияние ЭМ микроводорослей, взятых из стационарной фазы роста по-видимому, заключается в том, что в стационарной фазе роста клетки микроводорослей выделяют больше метаболитических органических веществ, чем в экспоненциальной фазе.

В результате проведенных серий экспериментов было показано, что через 18 часов культивирования фракции *P. tricornutum* (гексановая, бензольная, этилацетатная) стимулировали размножение *L. monocytogenes* 4b сероварианта на 40,4; 30 и 28% соответственно по сравнению с контролем. При этом роста клеток 1/2a сероварианта на этих субстратах не наблюдали. У иерсиний не было отмечено стимулирующего эффекта полученных фракций (20; 10 и 0% соответственно). Использование же в качестве среды культивирования для водорослей искусственной морской воды показало результаты прямо противоположные предыдущим. Так фракции метаболитов водоросли *P. tricornutum*, выращенной на искусственной морской воде симулировали размножение иерсиний на шестые сутки в следующей последовательности: этилацетат – 60%, бензол – 30%, гексан – 0%. Размножения листерий на этих фракциях не наблюдали.

#### Заключение

Патогенные бактерии – возбудители сапрозоонозов способны не только существовать в морской среде, но и размножаться при определенных условиях. При этом они могут инфицировать гидробионты, в том числе и промысловые виды в цепи питания через микроводоросли, которые способны стимулировать их размножение. Биологическая активность ЭМ морских микроводорослей в отношении *L. monocytogenes* зависит от видовой принадлежности водорослей и стадии развития альгокультуры. Можно предположить, что механизм стимуляции роста грамположительных и грамотрицательных бактерий ЭМ различен. В фильтрах естественной морской воды содержится большое количество экзометаболических различных морских обитателей (водоросли, гидробионты, морские микроорганизмы и т.д.) и, как показал наш анализ, преобладают в них в основном вещества липидной природы, экстрагируемые гексаном. Последние стимулируют рост грамположительных листерий в лаг фазе, но практически не влияют на размножение грамотрицательных иерсиний. Экзометаболические, выделяемые в среду микроводорослю *P. tricornutum*, стимулирующие рост *Y. pseudotuberculosis* в логарифмической стадии (то есть влияют непосредственно на скорость деления бактерий), имели в основном белковую природу.

#### Список литературы

1. Гершун, В.И. Жизнеспособность листерий в воде // Сиб. Вестник с.-х. науки. – 1979. – № 6. – С. 48–50.
2. Поманская, А.А. О размножении листерий в воде // Журн. микробиологии. – 1962. – № 9. – С. 102–105.
3. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: Экологические аспекты. – Новосибирск: Наука, 1988. – 208 с.
4. Тамбиев А.Х., Шелястина Н.Н., Болдырева Л.С. Изучение биологической активности экзометаболических одноклеточных морских водорослей // Физиол. раст. – 1981. – Т. 28, № 3. – С. 31–35.
5. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
6. Goulet V., Espasze T., Bastide I. Human listeriosis in France in 1987 // Acta microbiol. Hung. – 1989. – Vol. 36, № 2/3. – P. 173–176.
7. Hartemink R., Georgsson F. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads // Int. J. Food Microbiol. – 1991. – Vol. 12. – P. 189–195.
8. Liston J. Microbial hazards of seafood consumption toxins, bacteria and viruses are the principal causes of seafoodborne diseases // Food. Technol. – 1990. – Vol. 44, № 12. – P. 58–62.
9. Luppy A., Bucci G., Maini P., Rocourt J. Ecological survey of listeria in the Ferrara Area (Northern Italy) // Zbl. Bacteriol., Microbiol. Und Hug. A. – 1988. – Vol. 269, № 2. – P. 266–275.
10. Nakkama F., Maruyama T., Khokubo Y., Iida T., Umekki F. Incidence of *Listeria monocytogenes* in foods in Japan // Listeria 1992: 11-th Int. Symp. Probl. Listeriosis. Copenhagen, 1992: ISOPPOL XI: Book Abstr. S.I., S.A. – P. 317–318.

#### References

1. Gershun, V. I. Siberian bulletin of agricultural sciences, 1979, no. 6, pp. 48–50.
2. Pomanskaya, A.A. Journal of Microbiology, 1962, no. 9, pp. 102–105.
3. Somov G.P., Litvin V.Yu. Saprotitizm i parasitizm patogennyh bakterii: Ekologicheskie aspect [Saprotrophic and parasitism of pathogenic bacteria: Ecological aspects]. Novosibirsk, Nauka, 1988. 208 p.
4. Tambiyev A.H., Shelyastina N.H., Boldyreva L.S. Plant physiology, 1981, Vol. 28, no. 3, pp. 31–35.
5. Shlegel G. Obschaya mikrobiologiya [General microbiology]. Moscow, Mir, 1987. 567 p.
6. Goulet V., Espasze T., Bastide I. Human listeriosis in France in 1987 // Acta microbiol. Hung. 1989. Vol. 36, no. 2/3. pp. 173–176.
7. Hartemink R., Georgsson F. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads // Int. J. Food Microbiol. 1991. Vol. 12. pp. 189–195.
8. Liston J. Microbial hazards of seafood consumption toxins, bacteria and viruses are the principal causes of seafoodborne diseases // Food. Technol. 1990. Vol. 44, no. 12. pp. 58–62.
9. Luppy A., Bucci G., Maini P., Rocourt J. Ecological survey of listeria in the Ferrara Area (Northern Italy) // Zbl. Bacteriol., Microbiol. Und Hug. A. 1988. Vol. 269, no. 2. pp. 266–275.
10. Nakkama F., Maruyama T., Khokubo Y., Iida T., Umekki F. Incidence of *Listeria monocytogenes* in foods in Japan // Listeria 1992: 11-th Int. Symp. Probl. Listeriosis. Copenhagen, 1992: ISOPPOL XI: Book Abstr. S.I., S.A. pp. 317–318.

#### Рецензенты:

Мартынова А.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Владивосток;

Кузнецова Т.А., д.б.н., зав. лабораторией иммунологии, ФГБУ «НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН», г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 26.11.2014.