



УДК 581.111.2:581.573.4

Вариабельность ферментативного аппарата энтеробактерий в зависимости от температуры культивирования

Ю. А. Маркова¹, Л. А. Беловежец², А. Л. Алексеенко¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Институт химии СО РАН, Иркутск

E-mail: lyu-sya@yandex.ru

Аннотация. Показано, что исследованные виды энтеробактерий, патогенных для человека, способны синтезировать регуляторы роста растений, количество которых зависит от температуры культивирования и вида микроорганизма. Активность целлюлазы резко увеличивается при снижении температуры. Проведенные исследования свидетельствуют о возможности переключения метаболизма этих бактерий с паразитического на сапротрофный.

Ключевые слова: энтеробактерии, ферменты, температура.

Роль условно-патогенных микроорганизмов в инфекционной патологии человека постоянно возрастает. Только случаев так называемых диарейных заболеваний, согласно данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется около миллиарда. При этом, по данным Г. Г. Онищенко [6], 87,6 % этих заболеваний имеют бактериальную природу, значительная часть которых вызвана условно-патогенными бактериями семейства *Enterobacteriaceae*.

Одной из причин эпидемического неблагополучия, связанного с этой группой микроорганизмов, является их высокая экологическая пластичность, позволяющая адаптироваться к различным условиям внешней среды, что обуславливает их широкое распространение в почве, поверхностных водоемах, живых организмах [3].

Одним из факторов, определяющих отличие внутренней среды человека от условий окружающей среды, является температура. Известно, что этот показатель играет регулируемую роль на многих этапах метаболизма от экспрессии генов до активации уже существующих ферментов [2].

Цель работы – изучение вариабельности ферментативного аппарата для адаптации условно-патогенных энтеробактерий к различным температурам.

Материалы и методы

Исследования проводили с тремя видами энтеробактерий, на долю которых приходится достаточно высокое количество случаев инфекционных заболеваний: *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*. Все культуры

были выделены от пациентов областной инфекционной клинической больницы г. Иркутска.

Исследуемые микроорганизмы культивировали трое суток в физиологическом растворе с добавлением фосфатного буфера (рН=7) при температурах: 4 °С, 24 °С, 37 °С. Бактериальную суспензию центрифугировали при 30000 g 10 мин. Дальнейшие исследования проводили с супернатантом.

Для изучения образования ауксинов в среду культивирования добавляли 200 мг/л триптофана. Количество ауксинов определяли по методу Сальковского [9], а их активность — по подавлению прорастания семян горчицы сарептской. Изучение гиббереллиноподобной активности (ГПА) проводили по удлинению гипокотилей салата Лолла Росса и по эндоспермальному тесту на беззародышевых половинках семян ячменя Неван [5]. Количество редуцирующих сахаров определяли по методу Шомоди – Нельсона. Целлюлазную активность выявляли с помощью фильтровальной бумаги, которую гидролизовали в 0,1 М ацетатном буфере (рН = 5,9) при t 50 °С. Активность липазы определяли по оливковому маслу [7]. Количество белка оценивали методом Лоури.

Результаты и обсуждение

Общее количество белка в культуральной жидкости всех исследованных микроорганизмов более чем на порядок увеличивалось при 37 °С (табл.). Это свидетельствует о наиболее благоприятных условиях для накопления внеклеточного белка микроорганизмами в условиях температур, аналогичных температуре тела млекопитающих.

Таблица

Активность ферментов и количество фитогормонов в супернатанте исследуемых культур

Показатель	<i>Morganella morganii</i>			<i>Proteus mirabilis</i>			<i>Citrobacter freundii</i>		
	4 °С	24 °С	37 °С	4 °С	24 °С	37 °С	4 °С	24 °С	37 °С
Общий белок	14	12	400	16	12	344	10	8	288
Активность целлюлазы	0,24	0,23	0,017	0,21	0,092	0,024	0,11	0,14	0,019
Активность липазы	0,83	–	0,7	0,98	–	0,91	–	–	–
Ауксины	32	45	39	39	32	90	39	21	0
Гиббереллины	71	59	52	11	9	3	57	6,7	9,1

Многие энтеробактерии, относящиеся к родам *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, являются ризосферными или эндофитными бактериями по отношению к растительным организмам [10]. В связи с этим несомненный интерес представляло определение активности целлюлазы – фермента, свойственного как фитопатогенным, так и симбиотическим почвенным бактериям. Нами показано, что у всех исследуемых культур ее минимальная активность приходилась на 37 °С и почти на порядок отличалась от активности при более низких температурах (см. табл. 1). Можно предположить, что при попадании в организм человека или иного млекопитающего эти микроорганизмы не нуждаются в наличии фермента, разрушающего целлюлозу. В то же время при температуре, соответствующей температуре окружающей среды, этот фермент помогает лучше адаптироваться к обитанию в почве или в растениях.

Многие микроорганизмы, ассоциированные с растениями, продуцируют фитогормоны, которые необходимы как посредники в коммуникации между растением-хозяином и его микробиоценозом. Образование растительных гормонов считается одним из главных свойств ризосферных, эпифитных и симбиотических бактерий, стимулирующих и улучшающих рост растений, так называемых PGPR-штаммов (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) [8]. Учитывая вышеизложенное, нами проведено определение количества ауксиноподобных и гибберелиноподобных соединений у изучаемой группы микроорганизмов (см. табл. 1).

Из приведенных данных таблицы видно, что все изученные виды способны к синтезу фитогормонов. Тем не менее, зависимость синтеза от температуры у исследованных видов была различной. У *Morganella morganii* количество синтезируемых ауксинов практически не зависит от температуры. Для *Proteus mirabilis* характерно значительное их увеличение при 37 °С. Это свидетельствует о том, что синтез ауксинов

является показателем стрессового состояния популяции, вызванного чрезмерным размножением этого микроорганизма. В культуральной жидкости *Citrobacter freundii* наоборот количество ауксинов было максимальным при 4 °С, снижалось при 24 °С и отсутствовало при 37 °С.

Гибберелины – самый обширный класс растительных гормонов, распространенных среди растений и микроорганизмов, насчитывающий более 100 соединений. Способность к их биосинтезу обнаружено у всех групп бактерий. Образование гибберелинов свойственно эпифитным и ризосферным бактериям – представителям родов *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium* [8]. В наших исследованиях показано, что количество гибберелиноподобных соединений, синтезируемых всеми исследуемыми видами микроорганизмов, возрастает при низких температурах. Это в свою очередь может свидетельствовать об адаптации бактерий к обитанию во внешней среде.

Активность липазы была определена только для *Morganella morganii* и *Proteus mirabilis*. Практически одинаковое количество фермента, зарегистрированное для различных температур, может быть связано с конститутивной природой синтеза данного фермента. Видимо, он необходим для нормального сосуществования бактерии как с растительным, так и с животным организмами.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о высоком адаптационном потенциале условно-патогенных бактерий семейства Enterobacteriaceae. При снижении температуры до значений, соответствующих окружающей среде, их метаболизм с характерного для паразитирования в организме человека переключается на сапротрофный, способствующий выживанию в почве и созданию различных

взаимоотношений с почвенной биотой, в том числе и с растениями. Синтез целлюлазы – фермента, растворяющего клеточные стенки растительного организма, указывает, что эти микроорганизмы могут проникать внутрь растения и колонизировать его ткани. Наличие ауксинов и гиббереллинов в среде культивирования позволяет предположить, что исследуемые виды вступают в биохимический диалог с растением-хозяином, т. е. не являются пассивными обитателями его тканей, а могут быть, вероятно, его паразитами или симбионтами. Следовательно, выделение этих энтеробактерий из эндосферы растений не является случайным загрязнением или результатом антропогенной трансформации окружающей среды, а, возможно, является доказательством существования еще одной экологической ниши этих бактерий, способствующей их выживанию и циркуляции в окружающей среде.

Литература

1. Возняковская Ю. М. Микрофлора растений и урожай / Ю. М. Возняковская. – Л. : Колос, 1969. – 240 с.
2. Ермилова Е. В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот / Е. В. Ермилова. – СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2007. – 299 с.
3. Мамонтова Л. М. Инфекционная «агрессивность» окружающей среды. Концепция микробиологического мониторинга / Л. М. Мамонтова, Е. Д. Сави-

лов, А. П. Протодюжаков и др. – Новосибирск : Наука, 2000. – 240 с.

4. Маркова Ю. А. Выделение условно-патогенных микроорганизмов из растений / Ю. А. Маркова, А. С. Романенко // Гигиена и санитария. – 2006. – № 1. – С. 58–60.

5. Методы определения фитогормонов и фенолов в семенах / под ред. М. Г. Николаевой. – Л. : Наука, 1979. – 78 с.

6. Онищенко Г. Г. Эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации и основные направления деятельности по ее стабилизации / Г. Г. Онищенко // Материалы к докладу на VIII Всерос. съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М. – 2002. – С. 56.

7. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. вузов / под ред. А. И. Нетрусова. – М. : «Академия», 2005. – 608 с.

8. Цавкелова Е. А. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) / Е. А. Цавкелова, С. Ю. Климова, Т. А. Чердынцева и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.

9. Чумаков М. И. Новый ассоциативный диатроф *Agrobacterium radiobacter* из гистосферы пшеницы / М. И. Чумаков, В. В. Горбань, Л. Е. Ковлер и др. // Микробиология. – 1992. – Т. 61, № 1. – С. 92–102.

10. Yuemei Dong. Kinetics and Strain Specificity of Rhizosphere and Endophytic Colonization by Enteric Bacteria on Seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* / Yuemei Dong, A. Leonardo Iniguez, Brian M. M. Ahmer, and Eric W. Triplett // Appl. and Environ. Microbiol., 2003. – Vol. 69, № 3. – P. 1783–1790.

Variability of enterobacteria fermentative complement depending on cultivation temperature

Yu. A. Markova¹, L. A. Belovezhets², A. L. Alekseenko¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

² Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk

Abstract. Investigated enterobacteria species pathogenic for human has been showed can synthesize plant growth regulators. Their amounts depend on cultivation temperature and species of microorganism. When the temperature reduced cellulase activity increases. Represented data show that this bacteria metabolism change over from parasitic to saprotrophic type.

Key words: enterobacteria, enzymes, temperature.

Маркова Юлия Александровна,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН

664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории фитоиммунологии
тел./факс (3952) 42–50–09 / (3952) 51–07–54,
E-mail: lyu-sya@yandex.ru

Markova Yulia Aleksandrovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS

664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph.D. in Biology, senior research scientist,
Laboratory of Phytoimmunology
phone: (3952) 42–50–09, fax: (3952) 51–07–54
E-mail: lyu-sya@yandex.ru

*Беловежец Людмила Александровна
Иркутский институт химии им. СО РАН,
664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1
кандидат биологических наук, младший
научный сотрудник
E-mail: lyu-sya@yandex.ru*

*Belovezhets Lyudmila Aleksandrovna
Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 1, Favorskogo St.
Ph.D. in Biology, research scientist
E-mail: lyu-sya@yandex.ru*

*Алексеенко Анна Леонидовна,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
аспирант,
тел./факс (3952) 42-50-09 / (3952) 51-07-54*

*Alekseenko Anna Leonidovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
doctoral student
phone: (3952) 42-50-09, fax: (3952) 51-07-54*