

- 16.Reynolds C.S. What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status. *Hydrobiologia*. 1998, 369/370: 11-26.
- 17.Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*. 1997 (35): 12-24.
- 18.Stomp M., Huisman J., Voros L. et al. Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol. Lett.* 2007 (10): 290-298.
- 19.Skulberg O.M. Toxin produced by cyanophytes in Norwegian island waters — health end environment. Chemical data a basis of geomedical investigation. Oslo, Norv. Inst. Water Res., 1996.
- 20.Tilman D., Kiesling D., Sterner R. et al. Green, bluegreen and diatom algae: taxonomic difference in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.* 1986, 106 (4): 473-485.
- 21.Wiedner C., Rucker J., Brüggemann R., Nixdorf B. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*. 2007, 152: 437-484.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Т.Н.Шапиро<sup>1</sup>, Г.А.Дольникова<sup>1</sup>, Н.В.Немцева<sup>2</sup>, Д.А.Санджиева<sup>3</sup>, Е.С.Лобакова<sup>1</sup>*

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОНСОРЦИУМА УГЛЕВОДОРОД ОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ**

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова; <sup>2</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; <sup>3</sup>Российский государственный университет нефти и газа им. И.М.Губкина, Москва

Из реактивного топлива ТС-1 выделен консорциум микроорганизмов, каждый член которого способен последовательно деградировать разные фракции углеводородов. Изолировано и идентифицировано 5 штаммов окисляющих углеводород бактерий (УОБ). Определены их физиолого-биохимические особенности. Все штаммы проявляют положительную каталазную активность. Установлено, что все штаммы УОБ, продуцирующие экзогенные и эндогенные поверхностно активные вещества, способны к росту на средах с разными фракциями углеводородов. Изучение подобных ассоциаций позволяет создавать эффективные препараты для биоремедиации при ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 107—113

Ключевые слова: нефть, нефтепродукты, углеводород окисляющие бактерии, углеводороды, консорциум микроорганизмов

*T.N.Shapiro<sup>1</sup>, G.A.Dolnikova<sup>1</sup>, N.V.Nemtseva<sup>2</sup>, D.A.Sandzhieva<sup>3</sup>, E.S.Lobakova<sup>1</sup>*

## **IDENTIFICATION AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A CONSORTIUM OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA OF OIL AND OIL PRODUCTS**

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; <sup>3</sup>Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Moscow, Russia

A consortium of microorganisms were isolated from TC-1 fuel form, each member of which is capable of consistently degrade hydrocarbons' different fractions. The 5 strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria (PSB) were identified and isolated from TS-1 jet fuel. Their physiological and biochemical features are defined. All strains exhibit positive catalase activity. It is determined that all UOB strains, producing exogenous and endogenous surfactants, are capable to growth on media with

different fraction of hydrocarbons. The study of these associations allows to create effective preparations for bioremediation in the elimination of accidental spills of oil and petroleum products.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 107—113

Key words: oil, petroleum products, hydrocarbon oxidizing bacteria, hydrocarbons, consortium of microorganisms

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение особенностей биологического окисления углеводородов нефти микробными сообществами необходимо как для решения фундаментальных задач микробиологии, биохимии, экологии, так и для практического применения в области биотехнологии. Биотехнологический подход к переработке нефти позволяет устранять результаты загрязнений нефтепродуктами почвы и воды, облегчать процессы ее добычи и переработки и получать нефтепродукты, легко утилизируемые микроорганизмами [9].

Известно, что решающую роль в трансформации нефти и нефтепродуктов (Н и НП) до простых соединений выполняют микроорганизмы [6, 22]. Установлено, что не менее 79 родов бактерий, 9 родов цианобактерий, 103 рода грибов и 14 родов водорослей способны использовать нефть и ее производные в качестве единственного источника углерода и энергии [19].

Разнообразие микроорганизмов, способных к утилизации Н и НП, обусловлено высокой конкуренцией и большим количеством путей деградации различных их фракций [13]. Микроорганизмы обладают свойством избирательного отношения к различным углеводородам. Эта способность определяется различием в количестве углеродных атомов в молекуле и особенностью структуры углеводорода. В природных условиях микроорганизмы образуют консорциумы, составляя единую цепь окисления углеводородов Н и НП. Каждый из микроорганизмов консорциума, обладая специфичными ферментными системами, направленными на использование определенного субстрата (как самих углеводородов, так и их производных), использует данный субстрат в своем метаболизме. Поэтому при совместном воздействии микроорганизмов консорциума происходит извлечение как большего количества, так и более широкого спектра углеводородов Н и НП.

Целью данной работы было изучение консорциума углеводород окисляющих бактерий (УОБ) реактивного топлива ТС1, а также морфологических, физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов УОБ, определение их субстратных предпочтений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали штаммы УОБ, выделенные из образца реактивного топлива (ТС1). Для выделения микроорганизмов использовали стандартные накопительные микробиологические среды, содержащие природные органические добавки — «универсальная среда» (УС), УС10 (разбавленная в 10 раз УС) [7] и среда Эванса (СЭ) [17]. Для выделения культур УОБ использовали среду Эванса минеральную (ЭМ) и среду по ГОСТ 9.023-74 (СГ) (1974), в которые добавляли сырую стерильную нефть средней плотности ( $\rho=0,870$  г/см<sup>3</sup>).

Выделение УОБ проводили путем внесения 0,025 мкл исследуемого образца топлива на чашки Петри с плотными (2% агара) средами при комнатной

температуре. Учет колоний УОБ проводили на 4-7 сутки путем подсчета общего числа КОЕ, выросших на средах. Чистые культуры УОБ из полученных колоний микроорганизмов получали методом предельных разведений [4]. Поддержание выделенных бактериальных культур осуществляли на среде УС10.

Микроскопический контроль полученных чистых культур УОБ и определение их морфологических характеристик проводили на световом микроскопе Leica DM 2500.

Идентификацию полученных штаммов УОБ проводили с помощью секвенирования по 16S рРНК с использованием универсальных бактериальных праймеров.

Выделение геномной ДНК проводили из полученных суточных культур с помощью набора Thermo Scientific TMMag JETTM Plant Genomic DNA Kit. Фрагмент гена 16S рНК амплифицировали с помощью пары праймеров 16Suni27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGGCTCAG-3') и 16Suni907R (5'-CCGTCGAATTCCTTAGTTT-3'), где М = А или С, а К = А или G [21] в полимеразно-цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия). Качество полученных образцов ДНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 2,5% в агарозном геле с этидием бромидом. Очистку ПЦР продукта проводили с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Секвенирование ПЦР продукта проводили на приборе ABI Prizm 3730 (Applied Biosystems). Чтение последовательностей нуклеотидов проводили в двух направлениях. Сравнительный анализ и поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных соответствующим последовательностям изучаемых штаммов, проводили в базе данных GenBank с помощью программного пакета BLAST [15].

Культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов проверяли согласно методикам, описанным в [4] и определителю бактерий Берджи [10].

Эмульгирующую активность определяли визуально согласно методике [23], а также методом Купера и Голденберга [16] по определению индекса эмульгирования. Для этого в мерные пробирки объемом 25 мл вносили 5 мл гексадекана и 5 мл исследуемой жидкости и перемешивали в течение 2 мин на вортексе (Vortex V-1 plus, Biosan, Latvia). Индекс эмульгирования рассчитывали спустя 24 ч как отношение объёма плотной эмульсии ( $V_э$ , мл), образуемой при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объёму раствора ( $V$ , мл), умноженное на 100%:  $E_{24} = V_э/V \cdot 100\%$ , где  $V = 10$  мл. Контролем служила стерильная питательная среда.

Измерение показателя поверхностного натяжения проводили методом Вильгельми [14]. Измерения проводили в супернатанте исследуемой культуры при 20°C на тензиометре, представляющим собой торсионные весы ВТ-500 с подвешенной алюминиевой пластиной. Поверхностное натяжение рассчитывали по формуле:  $\sigma = mg/2l$ , где  $m$  — масса отрыва пластины, г (среднее из трех измерений);  $g = 9,8$  м/с<sup>2</sup> — ускорение свободного падения;  $l = 15,7$  мм — длина линии отрыва (ширина пластины). Снижение поверхностного натяжения ( $\Delta\sigma$ ) рассчитывали как разницу между значениями поверхностного натяжения стерильной среды (контроль) и пробы исследуемой культуры.

Определение гидрофобности/гидрофильности поверхности клеток проводили по методу Розенберга в модификации Серебряковой [12].

Изучение субстратного спектра штаммов проводили с помощью метода лунок [3] на плотной среде ЭМ. В качестве единственного источника угле-

рода и энергии для микроорганизмов в минеральную среду вносили следующие углеводороды (УВ): н-алканы (изооктан, ундекан, гексадекан), ароматические (бензол, бифенил), полиароматические (нафталин, фенантрен, антрацен), нефтепродукты (дизельное топливо, ТС1, нефть). УВ вносили в лунку диаметром 8 мм, проделанную стерильным пробочным сверлом в центре агаризованной минеральной среды на чашке Петри. Вокруг лунки с субстратом производили штрихом посев культур в направлении от лунки к краю чашки Петри. О способности к ассимиляции УВ судили по интенсивности роста культур спустя 7-14 суток инкубации при 4°С.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из образца топлива ТС1 на использованных средах получены 5 типов бактериальных колоний. Микроскопический анализ этих бактерий показал, что они имеют морфотип палочек. Окраска колоний — бежевая. Среди выделенных штаммов доминировали грамположительные бактерии.

Молекулярно-генетическая идентификация на основе рибосомальной филогении была проведена для всех выделенных штаммов бактерий. Были определены представители 2 родов: *Rhodococcus* и *Sphingobacterium*. Последовательности депонированы в международную базу данных, им присвоены номера: *Sphingobacterium multivorum* strain Bi2 — MG812313.1, *Rhodococcus jialingiae* strain Bi4 — MG871258.1, *Sphingobacterium mizutaii* strain Bi5 — MG871469.1, *Rhodococcus erythropolis* strain Bi6 — MG871403.1, *Rhodococcus* sp. strain Bi10 — MG871414.1.

В результате определения физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов УОБ показано, что все они являются каталазоположительными, что, согласно литературным данным, может указывать на способность использовать углеводороды Н и НП [2]. Оксидазной активностью обладает *Rhodococcus erythropolis* strain Bi6, остальные — оксидазоотрицательные.

Все штаммы являются факультативными анаэробами, способны в качестве источника углерода и энергии использовать не только углеводы, но и органические кислоты (цитрат натрия). При использовании глюкозы газ не образуют.

Способны для роста использовать как органические, так и неорганические формы азота. Штамм *S. multivorum* не способен к нитратредукции.

Образование индола и сероводорода у выделенных штаммов УОБ не обнаружено. Штаммы *S. mizutaii*, *R. erythropolis* способны декарбоксилировать орнитин.

Известно, что углеводородокисляющая (ферментативная) активность часто сопряжена со способностью микроорганизмов к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ), повышающих доступность УВ для клеток [8]. Способность к образованию стабильных эмульсий не всегда связана со снижением поверхностного натяжения. Так, биосурфактанты обычно обладают эмульгирующей активностью, в то время как биоэмульгаторы не всегда снижают поверхностное натяжение [20]. В связи с этим, проводили определение способности микробных культур к продукции биоПАВ. Оценку поверхностной активности проводили тремя методами: по определению индекса эмульгирования, измерению показателя поверхностного натяжения и измерению показателя гидрофобности клеток.

В целом, штаммы, относящиеся к роду *Rhodococcus*, характеризуются невысокими показателями эмульгирующей активности. Эмульсии, получен-

ные после осаждения и ресуспендирования в среде ЭМ, биомассы клеток и гексадекана, отличались устойчивостью, их высота не уменьшалась спустя сутки после проведения эксперимента. Так, *R. erythropolis* strain Bi6 показал самую низкую эмульгирующую активность, равную  $15,9\% \pm 5,7$ . Штаммы *Rhodococcus* sp. strain Bi10 и *R. jialingiae* strain Bi4 имеют показатели эмульгирующей активности  $36,9\% \pm 3,2$  и  $53,3\% \pm 3,2$  соответственно.

Штаммы УОБ рода *Sphingobacterium* имеют показатели эмульгирующей активности больше 50%:  $56,5\% \pm 4,9$  и  $50,8\% \pm 5,7$  для *S. multivorum* strain Bi2 и *S. mizutaii* strain Bi5 соответственно. Так как измерение активности проводили в эмульсии с клетками, можно предполагать, что у данных культур, по крайней мере, порядка 50% ПАВ являются экзоПАВ и выделяются в среду культивирования.

Гидрофобность клеток обусловлена липофильностью их клеточной стенки или компонентов клеточной мембраны, некоторые из которых поверхностно-активны. Таким образом, клетки сами по себе могут демонстрировать значительную эмульгирующую активность и выступать в роли биосурфактантных агентов [18]. Регистрация показателя гидрофобности может служить дополнительным критерием отбора бактерий, синтезирующих связанные с клетками биоПАВ, не экскретирующиеся в водную среду [1]. Поэтому для исследования были взяты отмытые от среды и ресуспендированные в среде ЭМ клетки УОБ.

Исследование гидрофобности клеток штаммов УОБ показало, что степень ее в основном не превышала 50%, за исключением *S. mizutaii* Bi5, для которого показатель гидрофобности оказался более 80%. При этом для данного штамма отмечали практически полный переход клеток в гидрофобную фазу, о чем судили по изменению прозрачности суспензии клеток.

Установлено, что снижение поверхностного натяжения среды зависело от штамма УОБ. Штамм *S. multivorum* Bi2 снижал поверхностное натяжение культуральной среды более чем на 21 мН/м, а штаммы *R. jialingiae* Bi4 и *Rhodococcus* sp. Bi10 почти на 15 мН/м. Штамм *R. erythropolis* Bi6 незначительно на 2,5 мН/м повышал значение поверхностного натяжения среды культивирования.

Использованный метод позволяет определять наличие низкомолекулярных ПАВ и можно предположить, что штамм *R. erythropolis* Bi6 может обладать способностью синтезировать высокомолекулярные ПАВ.

Таким образом, суммируя полученные данные можно констатировать, что у штамма *R. erythropolis* Bi6 выявлена самая низкая эмульгирующая активность и отсутствовала способность при росте снижать показатели поверхностного натяжения среды. Остальные штаммы УОБ, выделенные из реактивного топлива ТС-1, снижают поверхностное натяжение жидкости более чем на 10 мН/м. Согласно литературным данным, организмы, снижающие поверхностное натяжение жидкости более чем на 10 мН/м, могут являться перспективными продуцентами ПАВ [18]. Показатель гидрофобности клеток указывает на наличие у выделенных штаммов не экскретирующихся в водную среду эндоПАВ, что особенно выражено у штамма *S. mizutaii* Bi5.

В качестве единственного источника углерода и энергии для микроорганизмов в минеральную среду вносили 11 различных углеводов (см. Материалы и методы). Считается, что при использовании данного метода УВ равномерно диффундируют в агар и частично испаряются, так что культивирование происходит одновременно и на твердом субстрате, и в парах УВ [11]. Полученные результаты представлены в табл.

## Изучение роста на плотной среде с добавлением УВ

Углеводородный субстрат	Культура микроорганизма				
	<i>S. multivorum</i> Bi2	<i>S. mizutaii</i> Bi5	<i>R. erythropolis</i> Bi6	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi10	<i>R. jialingiae</i> Bi4
Н-алканы					
изооктан	2	2	3	3	4
ундекан	2	2-3	3	3	4
гексадекан	2	2	2	3	4
Ароматические углеводороды (АУ)					
бензол	2-3	2	2	2	2-3
бифенил	2	2-3	2	2-3	2
Полиароматические углеводороды (ПАУ)					
нафталин	1	2	2-3	2-3	3
антрацен	2	2	2	2	2
фенантрен	2	2	2	2	2
Нефтепродукты (НП)					
ДТ	1	4	3	3-4	3
нефть	2	3	3-4	1-2	3
ТС1	1	1	3-4	3	2-3

Примечание. 1 — слабый рост; 2 — умеренный рост; 3 — хороший рост; 4 — отличный рост.

Штаммы рода *Rhodococcus* различаются по типу использования УВ. Штаммы *R. jialingiae* и *R. erythropolis* активно используют для роста н-алканы и НП, а АУ и ПАУ — менее активно, штамм *Rhodococcus* sp. с одинаковой активностью использует все типы УВ.

Представители рода *Sphingobacterium* менее активны в использовании н-алканов, АУ и ПАУ, чем штаммы УОБ рода *Rhodococcus*. *S. multivorum* слабо использует для роста Н и НП, а штамм *S. mizutaii* показывает активный рост на Н и дизельном топливе. По сравнению с другими штаммами эти культуры используют ТС1 с наименьшей активностью.

Участие микроорганизмов в деструкции органического вещества осуществляется ассоциациями в процессе реализации принципа кооперативного существования [5], когда продукты жизнедеятельности предыдущего вида служат питательной средой для жизнедеятельности последующего. Микробное окисление углеводов Н и НП происходит через серию каталитических процессов с образованием промежуточных продуктов метаболизма — спиртов, альдегидов, кетонов, жирных и карбоновых кислот, которые, в конечном итоге, окисляются до углекислого газа. Из реактивного топлива ТС-1 выделены штаммы УОБ, различающиеся по способности использовать для роста углеводороды, синтезирующие как экзогенные, так и эндогенные ПАВ. Полученные штаммы УОБ, объединенные в консорциум, могут служить основой для создания биопрепаратов для биоремедиации вод и почв при аварийных разливах Н и НП.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках выполнения государственного задания 4.6718.2017/6.7 (анкета 1422), государственного задания 10.5422.2017/8.9.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Волченко Н.Н., Карасёва Э.В. Скрининг углеводородоокисляющих бактерий — продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама. Биотехнология. 2006, 2: 45-60.
2. Гоголева О. А., Немцева Н. В., Бухарин О. В. Каталазная активность углеводородоокисляющих бактерий. Прикладная биохимия и микробиология. 2012, 48(6): 612-618.
3. Егоров Н. С. (ред.). Практикум по микробиологии. Учеб. пособие. МГУ, 1976.
4. Егорова М. А., Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. Учеб. пособие для студ. ВУЗов., М., Изд. центр «Академия», 2005.
5. Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н. Введение в природоведческую микробиологию. М., Университет, 2001.
6. Квасников Е. И., Ключникова Т. М. Микроорганизмы-деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев, Наукова думка. 1981.
7. Лысак Л. В., Скворцова И. Н., Добровольская Т. Г. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. МАКС пресс, 2003.
8. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Григорьян А.А., Сюз Я.-Ф., Беляев С.С., Иванов М.В. Образование нефтевытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин. Микробиология. 2003, 72(2): 206-211.
9. Нечаева И. А. и др. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путем внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях. Биотехнология. 2009, 1:64-70.
10. Определитель бактерий Берджи. 1997, 1:94-155.
11. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Практ. пособие (под ред. Н.С. Егорова). М., Изд-во Моск. ун-та, 1983.
12. Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа. Микробиология. 2002, 71(2):237-239.
13. Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородоокисляющими микроорганизмами. Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012, 7(1):15-43.
14. Шукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. М., Высшая школа, 2004.
15. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. et al. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics. 2009, 10:421.
16. Cooper D.G., Goldenberg G.G. Surface-active agents from two Bacillus species. Appl. Environ. Microbiol. 1987, 53(2):224-229.
17. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of microorganisms: construction of a chemostat. Methods Microbiol. 1970, 2(277):e327.
18. Francy D.S., Thomas J.M., Raymond R.L., Ward. C.H. Emulsification of hydrocarbon by subsurface bacteria. J. Industrial Microbiology. 1991, 8:237-246.
19. Head I. M., Jones D. M., Ruling W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. Nature Reviews Microbiology. 2006, 4(3):173.
20. Karanth N.G.K., Deo P.G., Veenanadig N.K. Microbial production of biosurfactant and their importance. Ferment. Sci. Technol. 1999, 77:116-126.
21. Lane D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1985, 82(20):6955-6959.
22. Muyzer G., Stams A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. Nature Reviews Microbiology. 2008, 6(6):441.
23. Rosenberg E. Biosurfactants. In: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. (Ed. Dworkin M. et al.). New York, Springer Science, Business Media Inc., 2006.

К.А.Собянин., Е.В.Сысолятина, Я.М.Чаленко, А.Я.Лаврикова, Е.В.Калинин, В.И.Пушкарева, С.А.Ермолаева

## РОЛЬ ПРИРОДНЫХ ВАРИАНТОВ ФАКТОРОВ ИНВАЗИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ЛИСТЕРИОЗЕ

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

*Цель.* Определить вклад природных вариантов фактора инвазии *Listeria monocytogenes* InlB в вероятность развития перинатальной инфекции на модели интрагастрального заражения беременных мышей. *Материалы и методы.* Мышам на 12-16 день беременности интрагастрально вводили  $10^8$  КОЕ изогенных рекомбинантных штаммов *L. monocytogenes* EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 и EGDe $\Delta$ inlB::InlB14, экспрессирующих отличающиеся природные варианты InlB9 и InlB14. Через 72 час мышей подвергали эвтаназии, вскрывали и оценивали микробную нагрузку во внутренних органах. *Результаты.* Перинатальная инфекция наблюдалась только при инфекции штаммом, экспрессирующим InlB14. Также микробная нагрузка этого штамма превышала нагрузку штамма EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 в 715, 315 и 70 раз для печени, селезенки и Пейеровых бляшек соответственно ( $p < 0,01$ ). Микробные нагрузки в эпителии тонкого кишечника были сравнимы для двух штаммов. Раздельные высевы плацент и плодов одной мыши, инфицированной EGDe $\Delta$ inlB::InlB14, выявили возбудитель в 5 плацентах и 2 плодах из 9. *Заключение.* Природные варианты InlB отличаются по своей способности способствовать развитию перинатальной инфекции при интрагастральном пути введения *L. monocytogenes*.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 114—118

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, природные факторы инвазии, листериоз

К.А.Собянин, Е.В.Сысолятина, Я.М.Чаленко, А.Я.Лаврикова, Е.В.Калинин, В.И.Пушкарева, С.А.Ермолаева

## THE ROLE FOR NATURALLY OCCURRING VARIANTS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* INVASION FACTORS IN PERINATAL LISTERIOSIS

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow Russia

*Aim.* Using the model of intragastric *Listeria monocytogenes* infection in pregnant mice to compare an input of found in nature variants of the invasion factor InlB in perinatal listeriosis. *Materials and methods.* Mice on 12-16 days of pregnancy were injected intragastrically with  $10^8$  CFU of isogenic recombinant *L. monocytogenes* strains EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 and EGDe $\Delta$ inlB::InlB14. The strains expressed naturally occurring InlB variants, InlB9 and InlB14. In 72 h, mice were subjected to euthanasia to evaluate bacterial loads in the internal organs. *Results.* Only the strain, which expressed InlB14, caused perinatal infection. Microbial loads in the liver, spleen and Peyer's patches was 715, 315 and 70 times higher for this strain than for the strain EGDe $\Delta$ inlB::InlB9 ( $p < 0,01$ ). Microbial loads in the villous epithelium were comparable for both strains. Separate plating of placentas and fetuses infected with EGDe $\Delta$ inlB::InlB14 demonstrated that 5 and 2 placentas and fetuses, respectively, were infected from totally 9 embryonic structures. *Conclusion.* Naturally occurring InlB variants differed in their ability to provide perinatal listeriosis in intragastrically infected mice.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.4, P. 114—118

Key words: *Listeria monocytogenes*, naturally variants invasion factors, listeriosis