

УДК 635.1/8:579.869.1

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПАТОГЕНЫ: МИГРАЦИЯ ОТ ИХ ЕСТЕСТВЕННЫХ РЕЗЕРВУАРОВ ЧЕЛОВЕКУ

© 2019 г. В. И. Пушкарева\*

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

\*e-mail: VPushkareva@inbox.ru

Поступила в редакцию 21.02.2019 г.

После доработки 11.03.2019 г.

Принята к публикации 11.03.2019 г.

Природная очаговость сапронозов охарактеризована с экологических позиций. Отмечено, что многие патогенные бактерии (вibriоны, иерсинии, листерии, сальмонеллы, эшерихии и др.), а также условно-патогенные энтеробактерии связаны общей экологической чертой – возможностью автономно существовать во внешней среде. Обсуждается роль ассоциаций патогенов с другими организмами в формировании резервуаров возбудителей инфекций. Аналитический обзор современной литературы акцентирован на роли сельскохозяйственных и дикорастущих растений как альтернативных хозяев ряда патогенных бактерий (иерсиний, сальмонелл, листерий, энтерогеморрагических кишечных палочек и пр.). Приводятся экспериментальные доказательства способности возбудителей болезней человека и животных проникать и размножаться внутри тканей многих культурных растений, потребление которых способствует вспышкам пищевых инфекций. Обозначены нестандартные подходы к минимизации этой глобальной эпидемиологической проблемы в перспективе: поиск природных растений, устойчивых к энтеропатогенам, и конструирование на их основе трансформированных агрокультур путем использования генов антимикробных пептидов (АМП). Описаны исследования дикорастущих растений медицинского значения. При использовании природоподобных биотехнологий с их помощью могут быть получены новые высокоактивные соединения, способные также преодолевать барьеры полирезистентности ряда антибиотиков. Приведены результаты собственных исследований по выявлению биологической активности экстрактов ряда дикорастущих растений России в отношении листерий и токсинпродуцирующих эшерихий.

**Ключевые слова:** бактериальные патогены, сапронозы, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7(N4), растения, биологическая активность, пищевая безопасность, антимикробные пептиды

DOI: 10.1134/S0042132419040070

### ВВЕДЕНИЕ

Облигатные паразитические бактерии (риккетсии, хламидии) стабильно занимают свои экологические ниши в организме животных или человека, не выходя за их пределы для размножения и сохранения вида в почвенных, наземных, водных экосистемах. Гибель хозяина фатальна для населяющей его бактериальной микропопуляции.

Кардинально отличаются от них многочисленные систематизированные в различные семейства виды, обладающие общей стратегией выживания в окружающей среде – природной либо трансформированной человеком. Теоретическое обоснование принципов выделения таких микроорганизмов в отдельный экологический класс природноочаговых сапронозов принадлежит В.Ю. Литвину (Литвин, 1985; Литвин и др., 1998, 2010; Литвин, Пушкарева, 2004).

Сапронозы (Терских, 1958) условно разделяют на почвенные, водные и зоофильные (сапрозоонозы), что лишь подчеркивает их выраженную эпидемиологическую специфику, характеризующуюся разными источниками и путями заражения человека. Почвы являются природными резервуарами для возбудителей висцеральных микозов (гистоплазмоз, бластомикоз, актиномикоз и др.), клостридиозов (столбняк, газовая гангрена, ботулизм), сибирской язвы, псевдотуберкулеза, листериоза, некоторых микобактериозов, условно-патогенных бактерий семейства Enterobacteriaceae (роды *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* и др.). Типичные водные сапронозы – легионеллез, холера и другие вibriозы, мелиоидоз, аэромоназы. Впрочем, положение некоторых инфекций не вполне определено: так, псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз, листериоз иногда относят к сапрозоонозам, как и чуму (Сомов, Бузолева, 2004). Со-

вершено очевидно, что возбудители сапронозов — полноправные компоненты естественных экосистем — в полной мере отвечают критерию природноочаговых инфекций (Литвин и др., 2010). Вместе с тем, они обладают существенными особенностями, из которых основными мы считаем:

- первичная и основная среда обитания возбудителей — почвы и водоемы, откуда они могут проникать в наземные экосистемы;

- полигостальность возбудителей сапронозов — беспрецедентно широкий круг потенциальных хозяев в почвенных, водных, наземных экосистемах;

- полипатогенность — для простейших, многих беспозвоночных, позвоночных животных, человека и даже растений (Pushkareva, Ermolaeva, 2010; Pushkareva et al., 2010, 2017);

- широкие адаптивные возможности микроорганизмов при смене среды обитания.

### РЕЗЕРВУАРНЫЕ ХОЗЯЕВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПРОНОЗОВ

В последние десятилетия под давлением неопровержимых доказательств, полученных как в полевых, так и в экспериментальных условиях, многие инфекционные болезни, традиционно причислявшиеся к антропонозным, передающимся исключительно от человека к человеку, рассматриваются в новой парадигме — связи с окружающей средой. Самым ярким примером является холера, известная человечеству около 3 тыс. лет, опустошительные эпидемии которой однозначно связывали с климатом, с зависимостью от социально-экономических и природных условий, с миграцией, с другими факторами, но только не с тесными симбиотическими связями возбудителя с сочленами биоценоза. Экологическая обусловленность эпидемиологии холеры находит все больше подтверждений при натурных исследованиях: холерные вибрионы — автохтонные представители водных экосистем, а не следствие заноса больными людьми и инфицирования водоемов сточными водами. Они могут быть симбионтами гидробионтов разных трофических уровней: фитопланктона, водорослей, а также простейших, копеподов, моллюсков, червей, рыб и др., что обеспечивает им возможность миграции по трофическим цепям в биоценозах (Литвин и др., 1998, 2010; Пушкарева и др., 2010; Colwell, Hug, 1994; Colwell, 2004; Lutz et al., 2013; Alam et al., 2014; Islam et al., 2017). Образно говоря, глобальным “накопителем”, резервуаром вибрионов является Мировой океан, где они активно циркулируют либо сохраняются в некультивируемой форме в межэпидемический период. Эпидемиология не может “оставаться глухой к экологии вибрионов в водоемах, особенно к их связям с флорой и фауной” (Colwell, 2004, p. 287).

Последние достижения молекулярной биотехнологии показали, что эти бактерии могут быть обнаружены за пределами эндемичных регионов (в средних широтах — в отсутствие заноса), где ранее никогда не выделялись. Экологическая стойкость возбудителя холеры в водной среде обеспечивается многими путями: адаптивной регуляцией генов (активация системы секреции 6 типа — T6SS), переходом в покоящуюся форму, формированием биопленок на биотических и абиотических поверхностях, конкурентоспособностью при взаимодействии с множеством других организмов в биоценозе. Холерный вибрион может выживать при воздействии таких стрессоров, как голод, температура и колебания солености, а также проявляет устойчивость к фагоцитозу, регулируемая геном *ToxR*, при постоянном хищничестве гетеротрофных простейших (Erken et al., 2013; Alam et al., 2014).

Установлено, что протозойно-бактериальные ассоциации являются эпидемически значимым резервуаром вибрионов, численность которых значительно выше, чем вне клетки-хозяина.

Подобная закономерность наблюдается и при изучении легионелл (Valeru et al., 2012), иерсиний, в том числе, чумного микроба. Патогены сохраняются не только в трофозоитах, но и в цистах простейших, которые надежно защищают их от стрессовых условий внешней среды (Пушкарева и др., 2010).

Антропогенное воздействие на окружающую среду, приводящее к эвтрофикации водоемов, потребовало более пристального изучения альго-бактериальных ассоциаций, сочленами которых являются и другие возбудители. Это детально изучено на модели холерного вибриона. Фитопланктон, макроводоросли и высшие растения (водный гиацинт), продуцирующие мегатонны биомассы, служат триггерами не только холеры, но и множества диарейных болезней (Colwell, 2004; Islam et al., 2007, 2017). Маннитол-специфичные энзимы, являющиеся продуктами фотосинтеза микро- и макроводорослей, секретируются в высокой концентрации, стремительно транспортируются в вибрионы, а также другие патогенные микроорганизмы, которые используют их как источник углерода, выполняют функцию осмопротекторов при резких перепадах солености воды и играют большую роль в формировании биопленок, прикрепляясь даже к единичным клеткам макроводорослей (Lutz et al., 2013; Ymele-Leki et al., 2013).

Из широкого спектра патогенных бактерий, способных к существованию в окружающей среде без присутствия теплокровных хозяев, выделяется *Legionella pneumophila*, открытая в 1977 г. после смертельной вспышки пневмонии в Калифорнии. Типичный водный сапроноз, экология кото-

рого изучена так же детально, как и экология холеры, сразу однозначно связывался с биотой водоемов. Натурные и лабораторные эксперименты доказали, что взаимоотношения между бактериями и зелеными или синезелеными (цианобактериями) водорослями носят симбиотический характер: темпы роста легионелл линейно зависимы от фотосинтетической активности водорослей и от увеличения численности простейших (амеб и инфузорий), которые признаны основными резервуарными хозяевами; максимальной концентрации возбудитель достигал при цветении воды (Erken et al., 2013; Lutz et al., 2013).

Наши исследования альго-бактериальных ассоциаций, включающих мало изученных возбудителей: иерсиний, листерий, сальмонелл – в модельных условиях, приближенных к естественным (почвенная вытяжка, прудовая вода), показали, что популяции длительно (до трех месяцев) поддерживались в вегетативном состоянии в присутствии “живых” клеток *Scenedesmus quadricauda* и *Anabena* spp., а продукты их метаболизма, напротив, угнетали патогенов (Солохина и др., 2001).

Листерии из вегетативной формы переходили в некультивируемое состояние значительно быстрее (после 21 сут), причем при низкой температуре от 5 до 10°C, что согласуется с многими работами (Colwell, 2004; Islam, 2017) по экологии холерных вибрионов. Опыты на животных подтвердили сохранение потенциала вирулентности у “спящих микробов” при их переходе в некультивируемую форму, что проявлялось в манифестации инфекции, благодаря реверсии бактериальных клеток при пассажах через организм теплокровных моделей – морских свинок, мышей (Солохина и др., 2001).

Таким образом, истоки проблемы сапронозов находятся в природных экосистемах; взаимодействия возбудителей с самыми массовыми представителями фито- и зоопланктона выявили общие закономерности существования бактериальных популяций в сообществе с зелеными и синезелеными водорослями, а также с протистофауной (Литвин и др., 1998; Солохина и др., 2001; Диденко и др., 2002; Пушкарева и др., 2010). На примерах холеры и легионеллеза выявлено, что эпидемические проявления водных сапронозов наиболее значимы при формировании вторичных очагов инфекций, неразрывно связанных с трансформирующей деятельностью человека.

### СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ – ФАКТОР ПЕРЕДАЧИ ПИЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Высшие растения как альтернативные хозяева иерсиний, сальмонелл, клебсиелл, листерий, энтеропатогенных кишечных палочек, кампило-

бактера и др. привлекли внимание, прежде всего, отечественных эпидемиологов в связи с регулярными вспышками пищевых инфекций, связанных с употреблением листовых агрокультур либо салатов из капусты, моркови, мангольда и пр. (Сомов, Литвин, 1988; Литвин и др., 1998). Возникло новое междисциплинарное направление изучения воздействия микроорганизмов, не являющихся фитопатогенными, на модельные растения как при контаминации пророщенных семян, листьев, стеблей, так и непосредственно из ризосферы (Литвин и др., 1998, 2010; Тимченко и др., 2000; Dong et al., 2003; Prithiviraj et al., 2005; Персиянова, 2008; Пушкарева и др., 2012, 2013, 2015; Heaton, Jones, 2008; Tyler, Triplett, 2008; Brandl, Amundson, 2008; Berger et al., 2010; Dinu, Bach, 2011; Abreu et al., 2012; Barak, Schroeder, 2012; Schikora et al., 2012; Hernandez-Reyes, Schikora, 2013; Martinez, 2013).

Наиболее важными в эпидемиологическом аспекте оказались иерсинии, вызывающие псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз, которые актуальны для разных географических зон России, стран Западной Европы, Америки, причем главным фактором передачи возбудителя часто являются овощные культуры. Опыты (с генетически маркированными штаммами) по интродукции *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в почву выявили проникновение бактерий из ризосферы через корневые волоски в проростки капусты, салата, бобовых. Далее иерсинии колонизировали растения и накапливались в стеблях и листьях до высокой концентрации, способной заразить зеленоядных грызунов (полевок), отловленных в природных очагах. Впервые показана принципиальная возможность передачи возбудителя алиментарным путем, а также установлена циркуляция иерсиний по трофической цепи почва–растение–животное в естественной среде обитания грызунов (Литвин и др., 1998).

Расшифрованы многочисленные и постоянные вспышки псевдотуберкулеза (дальневосточной scarлатиноподобной лихорадки) на Дальнем Востоке, которые в 97.5% случаев возникали после приема овощей, не подвергавшихся термической обработке (Сомов, 1979; Сомов и др., 2001). Эндемичность псевдотуберкулеза обусловлена уникальными экологическими особенностями дальневосточного региона: совокупностью климатических, абиотических и биотических факторов, которые сформировали самый большой ареал природноочаговых сапронозов, где помимо иерсиний циркулируют многие возбудители – листерии, псевдомонады, и где условно-патогенные представители семейства Enterobacteriaceae находят оптимальные условия для существования (Сомов, Литвин, 1988; Персиянова, 2008).

Особого внимания заслуживают исследования по изучению взаимоотношений возбудителя псевдотуберкулеза с растениями на популяционном, клеточном и ультраструктурном уровнях, которые дали полную картину этих взаимодействий (Тимченко и др., 2000; Персиянова, 2008).

При этом инфицирование каллусов (клеточных культур) капусты с проникновением бактерий внутрь выявило быстрое накопление *Y. pseudotuberculosis* в тканях; численность *Y. pseudotuberculosis* возрастала в течение трех суток в 100000 раз и сохранялась до 60 сут. Кроме того, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии впервые зарегистрировано фитопатогенное воздействие иерсиний, не относящихся к возбудителям болезней растений, на растительные клетки-мишени. В модельных опытах авторы доказали способность иерсиний, сохраняющих вирулентный потенциал, реализовывать механизмы установления паразито-хозяйинных отношений, характерных для фитопатогенных микроорганизмов.

Другие возбудители пищевых инфекций: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter* и др. – регулярно выделяются в природных и урбанизированных экосистемах (почвах, водоемах, бассейнах, субстратах агрокомплексов, прудах орошения, предприятиях пищевой индустрии и пр.), что свидетельствует об их способности к автономному существованию во внешней среде с сохранением потенциала вирулентности для человека.

Особое место в этом ряду занимают листерии, до недавнего времени причислявшиеся исключительно к возбудителям зоонозных инфекций. Листерия, относящийся, по определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), к особо важным пищевым инфекциям (WHO, 2013), характеризуется высокой летальностью, до 43%, а у пожилых пациентов – до 90%, обусловлен проникновением в желудочно-кишечный тракт грамположительных бактерий *L. monocytogenes*, встречающихся на всех континентах.

Эта инфекция, занимающая третье место по распространенности в США после ботулизма и вибриоза (*Vibrio vulnificus*), является фатальной по своим последствиям. Например, в 2011 г. в штате Колорадо при вспышке, связанной с употреблением дынь, заболели 147 человек, при этом умерли 33 заболевших, несмотря на лечение антибиотиками.

В Швеции при некоторых вспышках погибало 90% пожилых людей, что свидетельствует о неэффективности стандартных антибиотиков (Europe PMC..., 2014).

Глобальный (по 67 странам) эпидемиологический метаанализ заболеваний с количественной оценкой перинатального и неперинатального ли-

стериоза, проведенный впервые специальной группой под эгидой ВОЗ, однозначно связал их с трудностью контроля биологической безопасности в пищевой индустрии и с выявлением листерий в антропогенно-преобразованной среде. Несмотря на беспрецедентные статистические материалы, вопросы о причинах, механизмах укоренения и путях распространения возбудителей в современных техногенных очагах авторами отчета даже не формулируются (Europe PMC..., 2014). Россия остается белым пятном на эпидемиологической карте мира – статистика по листериозу и энтерогеморрагическому эшерихиозу (другой смертельной токсикоинфекции) в материалах ВОЗ отсутствует. И только отдельные научные группы (Москва, Владивосток) занимаются фундаментальными основами этой проблемы.

Показано, что *L. monocytogenes* EGD при контаминации вегетирующих растений петрушки, листовых салатов, капусты демонстрируют высокую кинетику роста при посевах зеленой массы в течение 7 сут. Углубленные исследования каллусов на клеточном и ультраструктурном уровнях через 2 сут выявили цитопатогенное воздействие вирулентных листерий на растительные клетки с разрушением клеточных стенок, локализацией бактерий в вакуолях и последующим некрозом. Гистологические срезы тканей показали глубокое проникновение листерий (до 32 мкм) и их значительные скопления. Потенциал вирулентности возбудителя сохранялся на протяжении опыта. Вегетирующие растения по внешним признакам значительно отличались от интактных (пожелтение, некроз листьев и пр.). В контрольных опытах с аттенуированным штаммом *L. monocytogenes* EGD  $\Delta$ hly и со свободноживущими (сапрофитическими) *L. innocua*, несмотря на колонизацию растений бактериями, фитопатогенного воздействия не обнаружено, что подтверждается цитологическими и гистологическими исследованиями (Пушкарева и др., 2013).

Наш выбор для изучения в качестве приоритетных фитобактериальных моделей *L. monocytogenes* и энтерогеморрагических *E. coli*, принадлежащих к разным таксономическим группам, обусловлен тем, что они конвергентно связаны общей экологической чертой – возможностью автономно существовать во внешней среде (Пушкарева и др., 2010, 2012, 2013).

По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется около трети миллиарда диарейных заболеваний (WHO, 2013, 2015); лабораторно-подтвержденные вспышки опасного энтерогеморрагического эшерихиоза, постоянно встречающиеся в Европе, к 2015 г. уже достигли 45% среди токсинпродуцирующих возбудителей. В Северной Америке наблюдаются спорадические случаи на 100000 населения, в Аргентине – до 22 случаев на

100 000, причем инфекции всегда связывают с животными, однозначно причисляя их к зоонозам, но не с пищевыми растениями (Europe PMC..., 2014; Voqvist et al., 2018).

Эпидемия эшерихиоза в Японии (более 10 000 человек), вызванная *Escherichia coli* серовара O157:H7, возникла в результате употребления школьных завтраков с проростками редиса, привела к серьезным осложнениям у детей и инициировала работы по изучению взаимодействий растений с бактериями, патогенными для человека и животных (Watanabe et al., 1999).

За последнее десятилетие в мире зарегистрировано более 40 серьезных вспышек эшерихиоза, причиной которых были овощи и салаты, не подвергающиеся тепловой обработке. В 2011 г. Европу охватила “зеленая эпидемия” (около 4000 человек), вызванная энтерогеморрагической *Escherichia coli* серовара O104:H4. Возбудитель отличался полирезистентностью к нескольким классам антибиотиков, что затрудняло лечение больных, в результате чего засвидетельствован летальный исход у 52 человек, причем в число инфицированных входили здоровые в остальном люди работоспособного возраста. Все пациенты употребляли овощи: лук-порей, огурцы, сою и листовые агрокультуры. Вспышка носила резонансный характер, однако осталась эпидемиологически нерасшифрованной, с невыясненным резервуаром и источником возбудителя (Brandl, Amundson, 2008; Europe PMC..., 2014; WHO, 2015; Voqvist et al., 2018).

Как указано выше, многочисленные эпидемические вспышки, вызванные *E. coli*, в разных странах инициировали работы по изучению взаимодействий токсин-продуцирующих эшерихий с агрокультурами. В модельных опытах выявлено, что *E. coli* интенсивно колонизируют филлосферу салата при поверхностной контаминации, длительно сохраняются как в вегетирующих растениях, так и на срезанных листьях (Пушкарева и др., 2015; Dong et al., 2003; Brandl, Amundson, 2008; Heaton, Jones, 2008; Dinu, Bach, 2011).

В сравнительных экспериментах с грамотрицательными энтерогеморрагическими *E. coli*, продуцирующими шигаподобный токсин, и с культурами листового салата, капусты, базилика, которые входят в состав фастфуда, методами трансмиссионной и сканирующей микроскопии зафиксирована активная колонизация тканей эшерихиями, заполнившими не только поверхностные структуры, но и межклеточные каналы (Пушкарева и др., 2012, 2015).

Популяционная динамика патогенных *E. coli*, инокулированных в ризосферу базилика (оптимальной модели), выявила быстрое (2 сут) накопление эшерихий в вегетативных органах до опасных концентраций ( $10^5$  КОЕ/г). Наблюдалось

формирование биопленки на поверхности растительных тканей, при этом биопленочный матрикс был визуально выражен, на его фоне заметны делящиеся бактерии, что свидетельствует об их максимальной численности в образцах. В параллельных опытах доказана роль почвы и технической воды в сохранении эпидемически опасных эшерихий в объектах окружающей среды.

Полимеразная цепная реакция амплифицированной ДНК подтвердила длительное сохранение веротоксина (обнаружены четыре фрагмента следующих размеров: 1250 п.н. (ген *16S rRNA*), 480 п.н. (ген *stx2*), 407 п.н. (ген *rfb-O104*), 300 п.н. (ген *flicH4*)), что является чрезвычайно опасным при энтерогеморрагических эшерихиозах (Пушкарева и др., 2012, 2015; Voqvist et al., 2018).

Фундаментальные исследования симбиотических связей сельскохозяйственных растений с патогенными бактериями фрагментарны и малочисленны, в основном они констатируют, что многие энтеропатогены используют растения в качестве альтернативных хозяев наряду с человеком и животными (Пушкарева и др., 2012). Удалось расшифровать молекулярно-генетические механизмы взаимодействия патогенных бактерий с растительным организмом-хозяином, претендующие на универсальность характера некоторых молекулярных основ патогенности грамотрицательных бактерий, прежде всего, за счет схожести структуры системы секреции III типа (ССТТ) у фитопатогенных бактерий и возбудителей заболеваний человека и млекопитающих, которые позволяют реализовать их потенциал патогенности. ССТТ называют молекулярным шприцем, так как эта система секреции состоит из полой иглы (пиля), которая закреплена на так называемом базальном теле, пронзающем цитоплазматическую и наружную мембраны бактериальной клетки, и транслокаторного комплекса, который находится на другом конце иглы и встраивается в цитоплазматическую мембрану клетки-мишени. Основное отличие в структуре ССТТ патогенов растений и животных заключается в длине иглы – пиля: если для взаимодействия с клетками млекопитающих достаточно длины 40–80 нм, то для преодоления клеточной стенки растительной клетки необходима игла порядка 1 мкм. Эффекторные и структурные белки ССТТ дают очевидный пример сходства молекулярных основ патогенности у возбудителей болезней человека, животных и растений (Buttner, Bonas, 2003; Buttner, He, 2009).

Важно отметить, что у грамположительных листерий основной фактор патогенности – листериолизин O – также претендует на универсальность. В экспериментальных условиях при взаимодействии патогенных листерий с различными эукариотическими организмами – высшими и низшими (амебами, инфузориями), а также с рас-

тениями, наблюдаются необратимые морфологические изменения на клеточном уровне (Пушкарева и др., 2012, 2013, 2015; Pushkareva, Ermolaeva, 2010; Pushkareva et al., 2010).

### ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ С ПАТОГЕНАМИ ЧЕЛОВЕКА

Остаются неизвестными взаимодействия возбудителей инфекций с растениями природных экосистем. Развитие этого направления требует нестандартных подходов к конструированию моделей трансформированных агрокультур путем использования генов антимикробных пептидов (АМП) растений, устойчивых к патогенам человека и животных (Пушкарева, Ермолаева, 2018).

В последние годы по рекомендации ВОЗ (WHO, 2014) во многих странах развернуты интенсивные исследования, связанные с прикладными аспектами воздействия субстанций дикорастущих растений медицинского значения на различные микроорганизмы, поскольку абсолютное доминирование антибиотиков при лечении пищевых и других инфекций порождает глобальную проблему — полиантибиотикорезистентность возбудителей: более 700 000 больных погибает ежегодно от неэффективности стандартной антибактериальной терапии (Pushkareva et al., 2017).

Многokратно констатировано, что сальмонеллы, в частности, устойчивы к фторхинолонам, хлорамфениколу, триметоприму, ампициллину и др. (EFSA, 2013). Обследованные дети с длительной диареей, обусловленной различными возбудителями кишечных инфекций, не были восприимчивы к этиотропному лечению, а культуры выделенных бактерий (сальмонеллы, эшерихии, холерные вибрионы и др.) обладали полирезистентностью к современным антибиотикам (Savoia, 2012; Rath, Radhy, 2015).

Существует единичная работа по изучению резистентности *L. monocytogenes* к 19 антибиотикам, широко применяемым в ветеринарии и медицине. На когорте из 120 штаммов, изолированных как из продуктов, так и из окружающей среды на протяжении всей технологической цепи на пищевых предприятиях, выявлено, что от 2.5 до 11.4% культур были устойчивы к традиционным антимикробным препаратам (Conter et al., 2015).

По отчетам ВОЗ, клинические изоляты или культуры, выделенные из объектов (субстратов) внешней среды, по чувствительности к антибиотикам в тестах, выполненных *in vitro*, имеют значительные отличия от коллекционных штаммов (WHO, 2014). Альтернативным путем преодоления резистентности является поиск и изучение антимикробных субстанций растительного про-

исхождения, способных ингибировать популяции патогенных бактерий.

Обзор современной литературы свидетельствует о масштабных исследованиях дикорастущих растений — эндемиков, произрастающих в странах с жарким климатом (Африка, Азия, Латинская Америка) и в Европе, как ингибиторов патогенных микроорганизмов различных семейств, а также источников для получения антиоксидантных и других биологически активных веществ (Kim et al., 2011; Witkowska et al., 2013; Soni, Soni, 2014; Mardafkan et al., 2015; Perestrelo et al., 2016).

Высокой антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных бактерий (стафилококков, сальмонелл, эшерихий и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*) обладали экстракты растений, произрастающих в Египте: имбиря, тимьяна, кориандра, майорана и ряда других. Имбирь, кориандр, тимофила подавляли рост бактерий на 99% (в диско-диффузионном тесте диаметр границ зоны лизиса составлял 80–90 мм); майоран, мускат и ромашка также были высокоактивны (зона ингибиции составляла до 70 мм). Наименьший эффект отмечен для солодки и чернушки, которые известны и в России (Mohamed et al., 2016). Размеры зоны задержки роста при воздействии растительных экстрактов на бактерии значительно превосходили данные, приведенные в таблицах стандартов для выбора антибиотиков в клинической практике.

Эндемичные растения Индии, Египта, Пакистана и других тропических стран: кассия трубчатая (бобовые), холарена пушистая (олеандр), терминалия, паэдерия (листья и кора), известные с древних времен как лекарственные средства при кишечных инфекциях, использовались для получения этанольного, этилацетатного и метанольного экстрактов. Антибактериальную активность препаратов изучали на когорте энтеропатогенов, изолированных из клинического материала больных с длительной диареей. В отличие от коллекционных штаммов, полученные культуры сальмонелл, эшерихий, шигелл и даже холерные вибрионы обладали мультирезистентностью к антибиотикам (макролидам, аминогликозидам, триметоприму, бета-лактамам, цефалоспорином, сульфамидам). Авторы детально изучили фитохимический состав экстрактов, который был представлен алкалоидами, эфирными маслами, гликозидами, терпеноидами, сахарами, сапонинами, таннинами, флавоноидами, индолом (паэдерия). В диско-диффузионном тесте испытывали образцы экстрактов на бактериальных изолятах, полученных от больных с тяжелыми случаями диареи. Экстракты показали высокую и среднюю бактерицидную активность: зоны задержки роста патогенов колебались от 16 до 25 мм, что сопоставимо

с коммерческими антибиотиками, однако *Vibrio cholerae* слабо ингибировались даже при высоких концентрациях. Рекомендовано включать экстракты лекарственных растений как интегративные компоненты в дополнение к антибиотикотерапии, используемой в алгоритмах ведения больных с острыми кишечными инфекциями (Rath, Radhy, 2015).

Оставалось неизвестным, способны ли потенциально лекарственные растения разных географических зон России проявлять биологическую активность в отношении значимых возбудителей пищевых инфекций – листерий и токсинпродуцирующих эшерихий.

Для получения экстрактов были использованы дикорастущие растения, принадлежащие к четырем семействам: *Chenopodium album* (марь белая), *Plantago major* (подорожник), *Elythrigia elongata* (пырей), *Filipendula ulmaria* (таволга), произрастающие повсеместно в Московском регионе, и *Nigella sativa* (чернушка, тмин), ареал распространения которой – Кавказ, Средняя Азия, многие южные страны. Фитохимический анализ выявил у растений наличие биологически активных соединений: алкалоидов, эфирных масел, гликозидов, терпеноидов, редуцированных сахаров, сапонинов, таннинов, флавоноидов.

С помощью жидкостной хроматографии получены различные экстракты – гексановый, этилацетатный, этанольный и две фракции уксуснокислого экстракта. Скрининговый анализ 24 препаратов, проведенный диско-диффузионным методом, выявил ингибирующую активность несвязавшейся уксуснокислой фракции подорожника, пырея и таволги на грамположительных листерий; граммотрицательные эшерихии были высокочувствительными к этим же фракциям. Гексановый и этилацетатный экстракты таволги и подорожника также обладали бактерицидным эффектом. В опытах по скорости редукции популяции *E. coli* при обработке наиболее эффективными препаратами из подорожника и пырея показано падение численности токсигенных эшерихий через сутки, а *L. monocytogenes* – через 2 сут (подорожник, таволга) (Pushkareva et al., 2017).

Сравнение биологической активности антибиотиков, стандартно применяемых в этиотропной терапии листериоза и энтерогеморрагического эшерихиоза (ампициллина, гентамицина и цефтриаксона), с экстрактами *in vitro* выявило дозозависимое шестикратное преимущество экстрактов. Таким образом, поиск лекарственных растений разных географических зон России открывает перспективы для создания трансгенных растений, устойчивых к возбудителям болезней человека, и для получения на их основе новых субстанций с антимикробными эффектами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После уничтожительных эпидемий прошлых веков современная эпидемиология все чаще сталкивается с болезнями цивилизации (легионеллез, листериоз, иерсиниозы и пр.), которые несет с собой технический прогресс. Возникают новые места обитания для патогенных бактерий в объектах окружения человека: кондиционеры, станции фильтрации воды для мегаполисов, агрокомплексы по выращиванию сельскохозяйственных животных и пищевых растений, централизованные предприятия переработки и хранения пищевых продуктов и многое другое. Возбудители активизируют генетические механизмы, позволяющие им адаптироваться и существовать вдали от природных экосистем, что провоцирует возникновение дополнительных путей их распространения, результатом которого является формирование мощных вторичных очагов, опасных для населения.

Не менее важны проблемы минимизации риска пищевых инфекций, связанных с растениями, путем создания перспективных устойчивых к патогенам человека сельскохозяйственных культур; при этом могут быть использованы гены АМП дикорастущих растений для генетической трансформации. Также важно и перспективно получение новых высокоактивных соединений, преодолевающих барьеры полирезистентности к антибиотикам, стандартно применяемым в ветеринарии и медицине. Экологическая стратегия, направленная на поиск природных растений, являющихся уникальным источником биологически активных веществ, может быть использована в различных сферах: в фармакологии как дополнение к традиционным антибиотикам, для безопасной консервации пищевых продуктов, в эстетической медицине и пр.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Диденко Л.В., Константинова Н.Д., Солохина Л.В., Пушкарева В.И. Ультроструктура *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе обратимого перехода в покоящееся (некультивируемое) состояние в ассоциации с синезелеными водорослями // Журн. микробиол. 2002. № 1. С. 17–23.

- Литвин В.Ю. Сапрофитическая фаза в экологии возбудителей инфекционных заболеваний // Журн. микробиол. 1985. № 6. С. 98–103.
- Литвин В.Ю., Пушкарева В.И. Биоэкологические основы природной очаговости сапронозов // Журн. микробиол. 2004. № 4. С. 21–24.
- Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И. и др. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М.: Фармарус-принт, 1998. 256 с.
- Литвин В.Ю., Сомов Г.П., Пушкарева В.И. Сапронозы как природно-очаговые болезни // Эпидемиол. вакцинопроф. 2010. № 1. С. 10–16.
- Персиянова Е.В. Характеристика взаимоотношений *Yersinia pseudotuberculosis* с растительными клетками: Дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ДВГУ, 2008. 167 с.
- Пушкарева В.И., Ермолаева С.А. Экспериментальное обоснование роли растений в эпидемиологии сапронозных инфекций // Журн. микробиол. 2018. № 5. С. 113–121.
- Пушкарева В.И., Ермолаева С.А., Литвин В.Ю. Гидробионты как резервуарные хозяева возбудителей сапронозных инфекций // Зоол. журн. 2010. Т. 89. С. 37–47.
- Пушкарева В.И., Литвин В.Ю., Ермолаева С.А. Растения как резервуар и источник возбудителей пищевых инфекций // Эпидемиол. вакцинопроф. 2012. № 2. С. 10–20.
- Пушкарева В.И., Диденко Л.В., Годова Г.В. и др. *Listeria monocytogenes* – взаимодействие с агрокультурами и стадии формирования биопленок // Эпидемиол. вакцинопроф. 2013. № 1. С. 42–49.
- Пушкарева В.И., Диденко Л.В., Ермолаева С.А. Взаимодействие *Escherichia coli* с растениями на популяционном и клеточном уровнях // Успехи соврем. биол. 2015. Т. 135. № 3. С. 297–306.
- Солохина Л.В., Пушкарева В.И., Литвин В.Ю. Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием синезеленых водорослей (цианобактерий) и их экзотоксинов // Журн. микробиол. 2001. № 3. С. 17–22.
- Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. М.: Медицина, 1979. 184 с.
- Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий. Новосибирск: Наука, 1988. 208 с.
- Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: Примполиграфкомб, 2004. 167 с.
- Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001. 256 с.
- Терских В.И. Сапронозы (о болезнях людей и животных, вызываемых микробами, способными размножаться вне организма во внешней среде, являющейся для них местом обитания) // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 1958. № 8. С. 118–122.
- Тимченко Н.Ф., Булгаков В.П., Булаха (Персиянова) Е.В. и др. Взаимодействие *Yersinia*, *Listeria* и *Salmonella* с растительными клетками // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 2000. № 1. С. 6–10.
- Abreu A.C., McBain A.J., Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents // Nat. Prod. Rep. 2012. V. 29. P. 1007–1021.
- Alam M.T., Weppelmann T.A., Weber C.D. et al. Monitoring water sources for environmental reservoirs of toxigenic *Vibrio cholerae* 01, Haiti // Emerg. Infect. Dis. 2014. № 20 (3). P. 356–363.
- Barak J.D., Schroeder B.K. Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants // Ann. Rev. Phytopathol. 2012. № 50. P. 12–26.
- Berger C.N., Sodha S.V., Shaw K. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens // Environ. Microbiol. 2010. № 12 (9). P. 2385–2397.
- Boqvist S., Söderqvist K., Vågsholm I. Food safety challenges and one health within Europe // Acta Vet. Scand. 2018. V. 3. № 60 (1). P. 1186–1198.
- Brandl M.T., Amundson R. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* // App. Environ. Microbiol. 2008. V. 74 (8). P. 2298–2306.
- Buttner D., Bonas U. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria // Curr. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 312–319.
- Buttner D., He S.Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria // Plant Physiol. 2009. № 150 (4). P. 1656–1664.
- Colwell R.R. Infectious disease and environmental: cholera as a paradigm for waterborne disease // Int. Microbiol. 2004. V. 7 (4). P. 285–289.
- Colwell R.R., Hug A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994. V. 740. P. 44–54.
- Conter M., Paludi D., Zanardi E. et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* // Int. J. Food Microbiol. 2009. V. 128 (3). P. 497–500.
- Dinu L.D., Bach S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor // App. Environ. Microbiol. 2011. № 77 (23). P. 8295–8302.
- Dong Y., Iniguez A.L., Ahmer B.M. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* // App. Environ. Microbiol. 2003. № 69 (3). P. 1783–1790.
- EFSA and ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011 // EFSA J. 2013. P. 1–485.
- Erken M., Lutz C., McDougald D. The rise of pathogens: predation as a factor driving the evolution of human pathogens in the environment // Microb. Ecol. 2013. V. 65 (4). P. 860–868.
- Europe PMC Funders Group // Lancet Infect. Dis. 2014. № 11. P. 1073–1082.
- Heaton J.S., Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere // J. App. Microbiol. 2008. № 104. P. 613–626.
- Hernandez-Reyes C., Schikora A. *Salmonella*, a cross-kingdom pathogen infecting humans and plants // FEMS Microbiol. Lett. 2013. V. 343. P. 1–7.
- Islam M.S., Jahid M.I., Rahman M.M. et al. Biofilm acts as a microenvironment for plankton-associated *Vibrio*



- cholerae* in the aquatic environment of Bangladesh // Microbiol. Immunol. 2007. V. 51. № 4. P. 369–379.
- Islam M.T., Alam M., Boucher Y. Emergence, ecology and dispersal of the pandemic generating *Vibrio cholerae* lineage // Int. Microbiol. 2017. V. 20. № 3. P. 106–115.
- Kim S.Y., Kang D.H., Kim J.K. et al. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce // J. Food Sci. 2011. № 76. P. 41–46.
- Lutz C., Erken M., Noorian P. et al. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae* // Front. Microbiol. 2013. V. 4. P. 375–385.
- Mardafkan N., Iranmanesh M., Larijani K. et al. Chemical components and antibacterial activities of essential oils obtained from Iranian local *Lavandula officinalis* and *Thymus vulgaris* against pathogenic bacteria isolated from human // J. Food Biosci. Technol. 2015. № 5. P. 31–36.
- Martinez J.L. Bacterial pathogens: from natural ecosystems to human hosts // Environ. microbiol. 2013. № 15. P. 325–333.
- Mohamed H.G., Gaafar A.M., Soliman A.Sh. Antimicrobial activities of essential oil of eight plant species from different families against some pathogenic microorganisms // Res. J. Microbiol. 2016. № 11. P. 28–34.
- Perestrello R., Silva C.L., Rodrigues F. et al. A powerful approach to explore the potential of medicinal plants as a natural source of odor and antioxidant compounds // J. Food Sci. Technol. 2016. № 53. P. 132–144.
- Prithiviral B., Weir T., Bais H.P. Plant models for animal pathogenesis // Cell. Microbiol. 2005. № 7. P. 315–324.
- Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. *Listeria monocytogenes* virulence factor listeriolysin O favors bacterial growth with the ciliate *Tetrahymena pyriformis* causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts // BMC Microbiol. 2010. № 10. P. 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-1026>
- Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A., Litvin V.Yu. Hydrobionts as reservoir hosts for infectious agents of sapronoses // Biol. Bull. 2010. № 37. P. 1–10.
- Pushkareva V.I., Slezina M.P., Korostyleva T.V. et al. Antimicrobial activity of wild plant seed extracts against human bacterial and plant fungal pathogens // Am. J. Plant Sci. 2017. № 8. P. 1572–1592.
- Rath S.H., Radhy R.N. Antibacterial efficacy of five medicinal plants against multidrug-resistant enteropathogenic bacteria infecting under 5 hospitalized children // J. Integr. Med. 2015. № 13. P. 45–57.
- Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics // Fut. Microbiol. 2012. P. 979–990.
- Schikora A., Garcia A.V., Hirt H. Plants as alternative hosts for *Salmonella* // Tr. Plant Science. 2012. № 17 (5). P. 245–249.
- Soni S., Soni U.N. *In vitro* antibacterial and antifungal activity of select essential oils // Int. Pharm. Pharmaceut. Sci. 2014. № 6. P. 586–591.
- Tyler H.L., Triplett E.W. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria // Ann. Rev. Phytopathol. 2008. № 46. P. 53–73.
- Valeru S.P., Wai S.N., Saeed A. et al. *ToxR* of *Vibrio cholerae* affects biofilm, rugosity and survival with *Acanthamoeba castellanii* // BMC Res. Notes. 2012. № 16. P. 5–33.
- Watanabe Y., Ozasa K., Mermin J.H. et al. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan // Emerg. Infect. Dis. 1999. V. 5. P. 123–153.
- Witkowska A.M., Hickey D.K., Alonso-Gomes M., Wilkinson M. Evaluation of commercial herb and spice extract against selected food-borne bacteria // J. Food Res. 2013. № 2. P. 37–54.
- WHO. Critically important antimicrobials for human medicine. 3<sup>rd</sup> revision // Geneva, 2013.
- WHO. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance // Geneva, 2014.
- WHO. Estimates of the global burden of foodborne diseases // Geneva, 2015.
- Ymele-Leki P., Houot L., Watnik P. Mannitol and the mannitol-specific enzyme 2B subunit activate *Vibrio cholerae* biofilm formation // App. Environ. Microbiol. 2013. V. 79 (15). P. 4675–4683.

## Bacterial Pathogens: Migration from Environmental Reservoirs to Human Host

V. I. Pushkareva\*

*Gamaleya National Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia*

\*e-mail: [VPushkareva@inbox.ru](mailto:VPushkareva@inbox.ru)

Received February 21, 2019

Revised March 11, 2019

Accepted March 11, 2019

Specific epidemiology of sapronotic (soilborne, waterborne) bacteria is characterized from the ecological point of view. The characteristic feature of soilborne, waterborne pathogens is an ability to exist autonomously in the environment. This analytical review is focused on crops as alternative hosts for a number of soilborne and waterborne pathogenic bacteria (*Vibrio*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, etc). Published experimental results indicate capabilities of human and animal pathogens to colonize plant tissues. Novel approaches are discussed to minimize risks of infection spreading with crops. These approaches include analysis of wild plant natural resistance to pathogenic bacteria and a construction of transgenic plant crops expressing antimicrobial peptides. Numerous studies that have established wild plants used in traditional medicine as a source for producing molecules effective against resistant pathogens are presented. The review includes recent author results on activity of wild plant extracts against *Listeria* and toxin-producing *Echerichia*.

**Keywords:** bacterial pathogens, sapronoses, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7(H4), plants, biological activity, food safety, antimicrobial peptides