

І.П. Юдін

ФЕНОТИПІЧНОСОБЛИВОСТІ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ *ESCHERICHIA* С_к LI ATCC 25922

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України, м. Харків

У динаміці культивування досліджувалася здатність бактерій *Escherichia coli* ATCC 25922 до виживання і збереження репродуктивного потенціалу в умовах голодування при температурі $(18 \pm 5)^\circ\text{C}$. Бактерійні клітини інокулювали в стерильний фосфатний буферний розчин у початковій концентрації 5×10^7 кл/мл. Показник культурабельності (КУО) розраховували стандартизованими методами на щільних живильних середовищах. Після 9-го місяця інкубації бактерій у мікрокосмі він виявився нижче 10 КУО/мл. За цей же час загальне число мікробних клітин скоротилося лише на один порядок. Альтернативний метод, відмінний від стандартного температурою інкубації посівів, дозволив виявити фракцію некультурабельних клітин, що не ростуть при 37°C , але тривалий час (до 16 міс.) продовжують формувати колонії при нижчих температурах. Фенотип некультурабельних бактерій відрізнявся від початкового штаму морфологією і деякими біохімічними показниками. Високий рівень толерантності бактерій *E. coli* до тривалого стресу є доказом того, що можливість їх існування поза організмом хазяїна реальна.

Прийнято вважати, що явище некультурабельності бактерій пов'язано, насамперед, із неможливістю виявлення життєздатних бактерій стандартними методами культивування. Концепцію некультурабельного стану (НС) визначено як стан бактерійної клітини, що має метаболічну активність (яка визначається методами флуоресцентної мікроскопії), але не здатна підлягати безперервному клітинному поділу на середовищі, що у звичайних умовах підтримує ріст такої клітини [1]. У цьому зв'язку, відсутність видимого росту на живильному середовищі не завжди свідчить про відсутність у випробуваному зразку життєздатних бактерійних клітин. Феномен «життєздатного, але некультурабельного стану» [2, 3] обґрунтовано фактом виявлення в пробах з довкілля великого числа мікробних клітин, що демонструють дихаль-

ну активність [4] і реагують на субстрат [5], але при цьому не виявляють здатності до видимого росту на використовуваних живильних середовищах. З розвитком молекулярних методів і геноміки стало зрозуміло, що вищевказаний феномен пояснюється наявністю в природних екосистемах величезного генетичного мікробного розмаїття, поки що не систематизованого і не розпізнаного методами *ex situ* [6].

Проте, НС копіотрофних мікроорганізмів, тобто тих, що використовують для росту багаті субстрати (кажучи простіше, легко культивованих), продовжує викликати гарячі дискусії. Копіотрофи – це лише невелика частина мікробного світу планети, але багато видів цієї відомої «меншості» – патогенні, які можуть загрожувати здоров'ю людини й тварин. Уже доведено, що нерідко причиною помилково негативних результатів при бактеріологічному дослідженні є частина мікробної популяції, що перебуває в некультурабельному стані [7-9]. Вірулентність таких бактерій, за деякими повідомленнями, низька [10-13]. Однак, у випадку присутності некультурабельних патогенних бактерій у довкіллі (ґрунт, вода, харчові продукти і т.п.), вони можуть становити небезпеку, насамперед у силу своєї прихованості [14, 15]. Не виключено, що їх реверсія супроводжується і поверненням патогенних властивостей.

НС індукується так званими стресовими факторами. У цьому випадку «стресом» є несприятливі умови довкілля, що, у випадку перевищення деяких кількісних і часових граничних рівнів, у принципі приводить до загибелі бактерій. Вивчення цих факторів показало, що вони одночасно є й чинниками некультурабельності, а їх різноманітність пояснюється впливом великого спектра екологічних параметрів. Звичайно, у цих випадках простежуються наступні закономірності: залежність від початкових умов росту, тобто «історія метаболізму», і часовий фактор перебування в нових умовах.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Індукція некультурабельності під дією різної температури досить добре вивчена. Перші результати реверсії бактерій із НС одержано саме методами «*temperature upshift*», тобто підвищенням температури випробуваного зразка [16]. Проте, концептуальний недолік цього підходу полягає в тому, що не враховується фракція клітин, які виявляють оптимальний ріст при нижчих температурах. У цій роботі представлено результати вивчення впливу температури й голодування на деякі фенотипічні показники і культурабельність *E. coli* як величину здатності популяції бактерій до репродукції на стандартних середовищах загальноприйнятими методами.

Матеріали і методи

Штам *E. coli* ATCC 25922 отримано з музею патогенних для людини мікроорганізмів Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України.

Параметри мікрокосмів та їх приготування

Для нагромадження культури й виміру культурабельності використовували у вигляді бульйону або з додаванням 2 % агар-агару, відповідно, багате живильне неселективне середовище Лерія-Бертані (LB) (триптон 10 г, дріжджовий екстракт 5 г, NaCl 10 г на 1 літр дистильованої води, рН 7,5) [17]. Для порівняння реверсії некультурабельних клітин на селективному середовищі застосовували агар Ендо (ГОСТ 18963-73). Мікрокосми голодуючих культур бактерій готували з використанням класичної лабораторної моделі [18] в авторській модифікації. Середовищем мікрокосму, обмеженим від зовнішніх впливів та зі стабільними якостями, був фосфатний буфер, рН 7,2. Він був профільтрований через мембранний фільтр «Millipore» SLGS, діаметр пор 0,22 μm , проавтоклавований і розлитий у стерильні скляні пляшки з ватно-марлевими пробками й ковпаками з фольги місткістю 500 мл по 400 мл у кожну. Культура вирощувалася в LB-бульйоні 18-20 год при 37 °С, потім зібрана центрифугуванням при 6 000 об./год і двічі відмита в стерильному фосфатному буфері. Бактерії були ресуспендовані до стандарту оптичної щільності і потім інюльовані в мікрокосми таким чином, щоб кількість бактерій становила близько 10^7 кл/мл. Мікрокосми утримувалися в темряві при кімнатній температурі, із сезонними коливаннями 13-23 °С. Проби відбиралися регулярно для визначення культурабельності, загального числа бактерій і кількості бактерійних клітин, що виявляють дихальну активність.

Визначення культурабельності

Проби відбирали з мікрокосмів із дотриманням правил асептики й висівали в необхідному розведенні на поверхню агару в чашки Петрі скляним шпателем. Чашки інкубувалися 18-24 год при 37 °С, колонії підраховували стандартним методом. Культурабельність визначали в КУО/мл. Паралельно

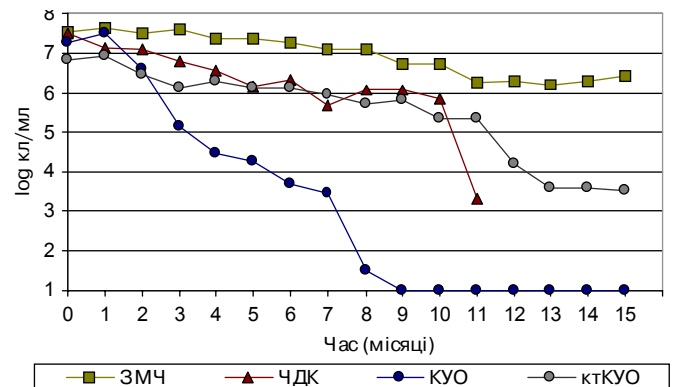
враховували колонії, що виростили при кімнатній температурі (кТКУО/мл), що становила, залежно від сезону, 13-23 °С.

Визначення загальної кількості мікробних клітин і клітин, що виявляють дегідрогеназну активність

Загальне мікробне число (ЗМЧ) і число дихаючих клітин (ЧДК), тобто тих, що виявляють дегідрогеназну активність, визначали методом *Zimmermann* у модифікації [19]. Клітини, що виявляють дихальну активність, підраховували мікроскопічно, використовуючи ІНТХ (дериват фенілтетразолію хлориду), що в реакції відновлення за участю внутрішньоклітинних дегідрогеназ формує усередині метаболічно активних клітин темно-червоні кристали формазану. Ця особливість свідчить про активність електронної транспортної системи бактерій і властива лише життєздатним клітинам. В одному полі зору спочатку в синьо-фіолетовому світлі підраховували загальну кількість клітин, після чого в позитивному фазовому контрасті – клітини, що мають включення формазану.

Результати досліджень та їх обговорення

Культурабельність, підрахована стандартним методом (при 37 °С), знизилася з 3×10^7 КУО/мл (початкова концентрація поміщених у мікрокосм бактерійних клітин) до величини межі вірогідності чашкового методу (менш 10 КУО/мл) після 9 міс. голодування (мал. 1).



Мал. 1. Динаміка змін показників життєздатності голодуючої популяції *E. coli* ATCC 25922.

У той же час, ЗМЧ, за даними прямого мікроскопічного підрахунку, змінювалося незначно. У цьому експерименті середовище мікрокосмів виключало яке-небудь осмотичне навантаження, а буферний потенціал дозволяв утримувати рН на рівні 7,2-7,0. Такі умови інкубації позитивно впливають на стабільність мембран, а нежиттєздатні бактерії залишаються інтактними, що дозволяє, нехтуючи неминучою адгезією клітин, одержати достовірний кількісний результат ЗМЧ. У більш пізній термін, при

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

прямому мікроскопічному спостереженні, мікробні клітини, що голодують, на порядок зменшувалися в розмірі, а форма їх ставала кокоїдною.

Величини ктКУО на чашках, інкубованих при кімнатній температурі (температурі мікрокосмів), знижувалися набагато повільніше і позитивно корелювали з ЧДК як непрямим показником їх життєздатності. Облік результатів ктКУО ставав можливим через 48 год при температурі 18-25 °С і через 72 год при температурі нижче 18 °С.

Більшість авторів публікацій на тему НС нерідко обмежують методологію відновлення некультурабельної фракції бактерійних клітин оптимальною для мезофілів температурою, не враховуючи їх можливий ріст при нижчій температурі. В одній з робіт із використанням альтернативного підходу [20] вивчали культурабельність *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* і *Yersinia enterocolitica* у морській воді полярних регіонів з екстремальною температурою -1,8 °С. Після 54 днів інкубації всі задіяні в досліді бактерії різних видів стали некультурабельними при 37 °С із зсувом оптимуму росту до 0-8 °С. Цей приклад показує, що некоректно було б не використовувати паралельно зі стандартними методами культивування і нестандартні, доцільність яких у подібних експериментах теоретично обґрунтована. Мал. 1 демонструє, що ріст при знижених температурах продовжується до 16 міс. (період спостереження).

Поняття оптимальної температури росту бактерій традиційно пов'язується з найбільш високою швидкістю генерації клітин. У контексті патогенних мікроорганізмів вважається, що, оскільки той або інший мікроорганізм здатний викликати захворювання у теплокровних організмів, отже, і вивчати характер його росту, фізіологічні й біологічні властивості необхідно лише при відповідній температурі. Однак, як встановлено, найвищий вихід мікробної маси за умовами росту в рівній кількості субстратів дає ріст при низьких температурах, що пояснюється більш економічними енергетичними витратами при роботі «холодових» ізоферментів.

Бактерії при виведенні з теплокровного організму, в якому температура підтримується в межах 37-39 °С, попадають у середовище (ґрунт, воду), де температура значно нижча. Перепад її для бактерій може досягати 30-35 °С. Ферменти, представлені тільки одною формою, не змогли б здійснювати каталіз при таких змінах діапазону температури, і життя бактерій не змогло б продовжуватися. Щоб уникнути цього, природа надала можливість ектотермним організмам синтезувати кілька форм ферментів, подібних за

функціями, але таких, що відрізняються молекулярною масою й пристосованістю до різних температур. Синтез цих форм може кодуватися різними генними локусами, це так звані ізоферменти. Вони здатні працювати при різних температурних умовах і одержали назву «холодові» й «теплові» [21].

Паралельно з культурабельністю визначалося число клітин з активною електронно-транспортною системою, т.зв. «дихаючих» клітин. Такі клітини мають візуалізовану за допомогою флуоресцентної мікроскопії дегідрогеназну активність, що вважається ознакою їх життєздатності. Цей показник (мал. 1) на значному часовому відрізку збігається з ктКУО. В останні місяці експерименту відтворюваність методу істотно падає, що пов'язано з розмірами некультурабельних бактерійних клітин, які зменшуються в масі на порядок і набувають кокоїдної форми. Показники культурабельності для селективного середовища Ендо були подібні, з різницею близько 1 lg КУО і 1,5 lg ктКУО у бік зменшення.

Результати тестування основних біологічних властивостей некультурабельної фракції *E. coli* демонструють зміни фенотипу випробуваного штаму порівняно з його початковим фенотипом (табл. 1). Оптимальна температура росту після 2 міс. інкубації знижується, а після 9 міс. уся випробувана популяція стає некультурабельною при використанні стандартної процедури індикації. Відновлення початкових властивостей випробуваного штаму відбувалося протягом 5-6 пересівань на скошений агар з інкубацією при кімнатній температурі.

Висновки

1. Існує вірогідність тривалого перебування бактерій *E. coli* у НС із збереженням їх життєздатності.
2. Зміни морфології та біохімічних показників бактерійної популяції свідчать про зворотні перебудови в організації метаболічних процесів, сигналами до яких стали голодування й зміна температури.
3. Проби, узяті з довкілля, можуть містити бактерії в НС, у тому числі патогенні ентеробактерії. Доцільно проводити аналіз таких проб з інкубацією посівів при температурах, близьких до тих, при яких узято матеріал для дослідження.
4. Упровадження та удосконалення методології і методичних підходів (наприклад, молекулярно-генетичний аналіз, аналіз на рівні окремої клітини) приведе до підвищення інформативності бактеріологічного дослідження. Об'єктивний погляд на вищезгадане вимагає подальшого пошуку й модифікації методів дослідження.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Зміни деяких фенотипічних ознак після переходу всієї популяції *E. coli* в НС

| Фенотипічна ознака | Випробуваний штам <i>E. coli</i> ATCC 25922 | |
|--------------------------------|---|---|
| | Контрольний штам (ріст при пересівах на агарі LB) | Некультурабельна популяція (9 міс. голодування) |
| Морфологія колоній на агарі LB | Мутнуваті, злегка слизисті | Нерівномірно мутні, більш водянисті |
| Розмір бактерійних клітин | 2,5-3 × 0,7-0,8 μm | 0,8 × 0,5 μm |
| Ріст при температурі 37 °C | є | немає |
| Ріст при кімнатній температурі | є | є |
| Рухливість | + | - |
| Індол | + | - |
| Цитрат Сімонса | - | - |
| Сечовина | - | - |
| Ацетат Na | + | - |
| Лізин | + | - |
| Лактоза | к | к |
| Глюкоза | кГ | к |
| H ₂ S | - | - |

Література

1. Oliver J.D. Formation of viable but non-culturable cells // Kjelleberg S. Starvation in bacteria. – New York, 1993. – P. 239-272.
2. Colwell R.R. Bacterial death revisited // Colwell R.R., Grimes K.J. Nonculturable microorganisms in the environment. – Washington, 2000. – P. 325-342.
3. Roszak D.B., Colwell R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment // Microbiol. Rev. – 1987. – V. 51. – P. 365-379.
4. Zimmermann R., Iturriaga R., Becker-Birck J. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration // Appl. Environ. Microbiol. – 1978. – V. 36. – P. 926-935.
5. Kogure K., Simidu U., Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria // Can. J. Microbiol. – 1979. – V. 25. – P. 415-420.
6. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. – 1995. – V. 59. – P. 143-169.
7. Головлев Е.Л. Другое состояние неспорулирующих бактерий // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 6. – С. 725-735.
8. Волянський Ю.Л. Некультурабельний стан аспорогенних бактерій: теоретичні аспекти проблеми та її практична значущість // Інфекційні хвороби. – 2004. – № 1. – С. 5-9.
9. McDougald D., Rice S., Weichart D., Kjelleberg S. Nonculturable: adaptation or debilitation? // FEMS Microbiol. Ecol. – 1998. – V. 25. – P. 1-9.
10. Caro A., Got P., Lesne J. et al. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium* // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 3229-3232.
11. Pommeroy M., Butin M., Derrien A. et al. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight // Ibid. – 1996. – V. 62. – P. 4621-4626.
12. Smith R.J., Newton A.T., Harwood C.R., Barer M.R. Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium do not infect or colonize mice // Microbiology. – 2002. – V. 148. – P. 2717-2726.
13. Winfield M.D., Groisman E.A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69, N 7. – P. 3687-3694.
14. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J. et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms // Bio/Technology. – 1985. – V. 3. – P. 817-820.
15. Sylvester D.M., Taylor R., LaHann T.R. Viable but nonculturable bacteria: a public health threat? // Infect. Dis. Rev. – 2001. – V. 3. – P. 70-82.
16. Whitesides M.D., Oliver J.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – P. 1002-1005.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Под ред. Баева А.А., Скрыбина К.Г. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
18. Романова Ю.М., Терехов А.А., Гинцбург А.Л. Выделение и характеристика мутантов *Salmonella typhimurium* с нарушенным процессом образования некультивируемых форм // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 8. – С. 1073-1078.
19. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов: Методы диагностики живых клеток по их метаболической активности / Ред. В.К. Ерошин. – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
20. Smith J.J., Howington J.P., McFeters G.A. Survival, physiological response, and recovery of enteric bacteria exposed to a

ОГЛЯДИ ТА ЛЕКЦІЇ

polar marine environment // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60. – P. 2977-2984.

21. Сомов Г.П., Варвашевич Т.Н., Тимченко Н.Ф. Психрофильность патогенных бактерий: Адаптация эктотермных организмов к изменению температуры / Отв. ред. Бочаров Е.Ф. – Новосибирск: Наука, 1991. – 204 с.

PHENOTYPE PECULIARITIES OF NONCULTURABLE FRACTION OF ESCHERICHIA COLI ATCC 25922

I.P. Yudin

SUMMARY. In dynamics of cultivation it was investigated the capacity of bacteria Escherichia coli ATCC 25922 to surviving and maintenance of reproductive potential under conditions of starvation at temperature 18±5 °C. Bacterial cells were

inoculated into sterile phosphatic buffer solution in initial concentration 5x10⁷ cells/ml. The index of culturability (CFU, colony-forming units) was calculated by standardized methods on dense nutrient mediums. After the ninth month of bacteria incubation in a microcosm it was lower than 10 CFU/ml. For same time the total number of microbial cells was reduced only by one order. The alternative method which differs from standard temperature of platings incubation, has allowed to reveal but for a long time (till 16 months) continue to form colonies a fraction of nonculturable cells which do not grow at 37 °C, at lower temperatures. Phenotype of nonculturable bacteria differed from initial strain by morphology and some biochemical indices. The high level of bacteria E. coli tolerance to a long stress proves that the opportunity of their existence outside the host organism is real.

© Колектив авторів, 2005
УДК 616.36.-022.6-07:612.017.1

Є.В. Нікітін, К.Л. Сервецький, К.М. Усиченко, Г.Л. Роганкова, Т.В. Чабан **СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕХАНІЗМ ДІЇ ВИКОРИСТАННЯ** **ІНТЕРФЕРОНІВ ТА ІНТЕРФЕРОНОГЕНІВ ПРИ ХРОНІЧНИХ** **ГЕПАТИТАХ**

Одеський державний медичний університет

Розвиток імунної відповіді визначається комплексом міжмолекулярних і міжклітинних взаємодій, які виникають як в процесі представлення антигену, так і при реалізації імунної відповіді – ефекторних реакцій [1, 2]. При цьому основними є контактні взаємодії мембранними молекулами та взаємодія за допомогою цитокінів [3, 4].

Інтерферони належать до родини регуляторних цитокінів і мають ряд властивостей біологічних ефектів: противірусний, антипроліферативний, імуномодулювальний та антибактерійний [5].

Інтерферони 1-го (α - і β - інтерферон) і 2-го (γ - інтерферон) типу схожі за головною функціональною ознакою – наявністю противірусного ефекту. Інтерферони 2-го типу виконують функції регуляторів імунної системи. Однією з відомих дій інтерферонів є індукція ними синтезу специфічних для інтерферонів ферментів олігоаденілатсинтетази, протеїнкінази та рибонуклеази-L. Фермент оліго-

аденілатсинтетаза полімеризує АТФ в 2'-5' олигомери. Аномальні 2'-5' олигонуклеотиди активують ендорибонуклеази, які розщеплюють РНК, у тому числі й вірусну [5, 6].

Інтерферони не впливають на внутрішньоклітинні процеси. Подібно до інших медіаторів міжклітинної взаємодії (фактори росту, гормони), інтерферони взаємодіють з рецепторами, що розташовані на поверхні мембран клітин. Зв'язування інтерферону з рецепторами ініціює активацію транскрипції генів, що відповідають на інтерферон. Транскрипція генів і синтез відповідних білкових продуктів приводять до реалізації внутрішньоклітинних ефекторних механізмів, основним з яких є пригнічення реплікації вірусу в інфікованих клітинах [7].

Передача сигналу від рецепторів інтерферону відбувається за участі специфічних ланцюгів фосфорилування відповідних клітинних білків. Рецептори для інтерферону, як і всі рецептори для