

© Волянський Ю.Л., 2004  
УДК 579.61:616-078

Ю.Л. Волянський

## НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНИЙ СТАН АСПОРОГЕННИХ БАКТЕРІЙ: ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ПРОБЛЕМИ ТА ЇЇ ПРАКТИЧНА ЗНАЧУЩІСТЬ

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

*Розглянуто результати деяких робіт, присвячених дослідженню феномену некультурабельного стану (НС) бактерій, їх біологічних властивостей, впливу довкілля на індукцію такого стану і чинників, що відновлюють вегетативні кондиції бактерійної клітини. Серед розмаїтості методологічних і концептуальних підходів до цієї проблеми, у сучасній медичній бактеріології та інфектології очевидний пріоритет екологічних аспектів.*

Некультурабельним називають стан бактерійних клітин, що хоч і активні метаболічно, але не здатні до стабільного клітинного поділу, необхідного для росту на рідких або твердих живильних середовищах, зазвичай використовуваних для їх культивування [1-3].

Необхідність дослідження НС бактерій виникла як одна з можливих відповідей на питання про відносну стабільність популяцій бактерій при несприятливих умовах протягом тривалого часу, епідемічного і/або спорадичного поширення деяких захворювань і ряду інших мікробіологічних та епідеміологічних аспектів, таких як боротьба з інфекційними і гнійно-запальними хворобами, антисептика й дезінфекція, контроль мікробіологічної чистоти фармацевтичних препаратів.

Проблемі НС аспорогенних бактерій присвячено багато робіт, а вперше термін VBNC (*viable but nonculturable*) – життєздатний, але некультурабельний – був запроваджений на початку 1980 р. Концепція НС значною мірою розроблена Colwell R.R. зі співавт. [4], що досліджували збереження життєздатності *V. cholerae* та *E. coli* при тривалій інкубації в морській воді й дійшли до аргументованого висновку про здатність копіотрофних бактерій тривало існувати в несприятливих умовах, однак, на відміну від спор, проростати не відразу ж після висіву на живильні середовища, а тільки після спеціальної процедури «пробудження».



Вже нагромаджено досить велику кількість експериментальних даних з проблеми некультурабельності бактерій, проте й сьогодні ще чітко не позначені конкретні параметри умов або їх комбінацій, що ініціюють перехід бактерій у НС і їх рекультивацію.

У пробах, узятих з довкілля, загальне число життєздатних мікроорганізмів перевищує число КУО на декілька порядків. Щоб описати цей феномен, спеціально введений термін «*great plate count anomaly*» (велика аномалія визначення кількості бактерій посівом) [5]. Нині немає сумнівів, що більшість видимих під мікроскопом цих клітин життєздатна, але не завжди формує видимі колонії на чашках. Два різні типи мікроорганізмів роблять внесок у цю невловиму, але активну більшість. Це відомі види, для яких прикладні умови культивування не підходять або які набули НС. Але є ще й невідомі види, які раніше ніколи не культивувалися через відсутність адекватних методів [6]. Це означає, що досить велика кількість таких мікроорганізмів поки недоступна відомим технічним можливостям культивування *in vitro* і реєстрації їх здатності до репродукції – найбільш достовірного критерію життєздатності.

З еволюційної точки зору здійснення метаболічних процесів у мікробній клітині, НС як явище може залежати від найрізноманітніших умов. Деякі автори вважають, що в принципі не існує визначеної і стабільної організації бактерій у так званому НС, а є лише певна послідовність мінливих станів, що змінюються залежно від таксономічної приналежності мікроорганізму, його природної екології, початкового фізіологічного стану і природи чинників, які ініціюють процес переходу в НС [7].

## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

Відомі методи оцінки життєздатності клітин, які перебувають в НС, дуже різноманітні, кожен з них має свої нюанси, що нерідко стає об'єктом критики [8]. Однак навіть сам термін «життєздатність» мікроорганізмів адекватно досі не визначений. Але в медичній бактеріології, без сумніву, його необхідно пов'язувати зі здатністю мікроба до розмноження. Методи індикації НС щодо виявлення метаболічної активності не завжди високо-специфічні та високочутливі, особливо на пізніших стадіях існування мікробних клітин у НС [9]. Методи екстрагування ДНК бактерій звичайно гіперболізують результат, виявляючи іноді мертві й не здатні до «пробудження» клітини. Нерідко автори досліджень не обґрунтовують чіткими доказами сам факт «оживлення» або «пробудження» бактерійної популяції, що перебуває в НС. При цьому не виключають можливості розмноження небагатьох цілком життєздатних культурабельних клітин у складі початкової популяції [10].

Проте результати численних експериментів у цьому напрямку можна вважати цілком переконливими. Є повідомлення про перехід у НС більше 30 видів грамнегативних і деяких видів грампозитивних мікроорганізмів [1].

Фактори довкілля, які індукують перехід бактерій у НС, мають видові розбіжності. Найбільш вивченими з них є температурний режим, фізіологічний вік культури, рН, концентрація солей, інтенсивність освітлення, аерація, наявність живильних речовин.

Різка зниження температури середовища проживання, так званий «холодовий шок», не для усіх бактерій є чинником індукції НС. Так, клітини *E. coli* і *S. typhimurium* при 0-5 °С протягом тривалого часу (до року спостереження) зберігають здатність до видимого росту на твердих живильних середовищах, а культура *V. vulnificus*, навпаки, переходить у НС при температурі до 5 °С [11].

Фізіологічний вік культури також суттєво позначається на швидкості переходу клітин у НС. Наприклад, тим же *V. vulnificus* у стаціонарній фазі необхідно як мінімум у два рази більше часу для переходу в НС, ніж клітинам у логарифмічній фазі [11].

Концентрація солей як звичайного компонента багатьох природних джерел відіграє важливу роль в якості індуктора НС бактерій. Епідемічний спалах, зумовлений забрудненою ентерогеморагічним штамом *E. coli* O157 солоною ікрою лосося, зареєстрований в Японії у 1998 р. [12]. Після 72 год інкубації в 13 % розчині хлориду натрію, клінічні штами *E. coli* не росли на чашках з агаром, але

були реанімовані в бульйоні дріжджового екстракту. При цьому більше 90 % клітин виявилися життєздатними, що демонстрував метод флуоресцентного забарвлення. Цей факт свідчить, що майже усі з цих клітин у розчині солі перебували в НС. Відомо, що підвищення концентрації солі до 6-10 % призводить до швидшого переходу ентеротоксигенних штамів *E. coli* у НС. Видиме світло по різному впливає на перехід бактерій у НС. Так, якщо для переходу *V. salmonicida* і *V. anquilarum* у НС воно особливого значення не має, то для *E. coli* висока освітленість пригнічувала перехід в НС. Для *S. typhimurium* оптимальний результат переходу в НС досягався за допомогою чергування темного і світлого часу доби [13].

Класичним методом індукції трансформації в НС бактерій вважається створення умов стресу, викликаного лімітом живильних речовин у середовищі. Лабораторною моделлю для індукції некультурабельного стану більшості аспорогенних бактерій є занурення їх культур у кількості 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> КУО/мл у прісну або морську воду. При цьому створюються оліготрофні умови, найближчі до природних.

В останні роки набагато більше уваги приділяється вивченню ролі хімічних і біологічних чинників як індукторів НС бактерій [14]. Встановлено факти одержання некультурабельних популяцій клітин під дією перекисів, кислот, хлору, міді [15], що вказує на можливість впливу широко використовуваних у практиці дезінфектантів і антисептиків на перехід вегетативних форм бактерій у НС.

Виходячи з такої концепції, можна пояснити факт, що численні обстеження об'єктів довкілля й осередків інфекції при пошуку етіологічних агентів тільки класичними бактеріологічними методами нерідко несправжньонегативні [16].

Не менш цікавими є наукові дослідження, присвячені вивченню в якості індукторів НС і/або індукторів рекультивації біологічних чинників організму хазяїна (інтерферонів, цитокинів, гормонів і подібних біомолекул) [2], ролі лікарських препаратів і харчових добавок, алкоголю й ін. Адже досі немає чіткого наукового пояснення механізму тривалого носійства патогенних бактерій, формування епідемічно значущих популяцій збудника й умов його виживання в міжепідемічний період.

Завдяки сучасним молекулярно-генетичним дослідженням ученими різних країн показано, що процес переходу бактерій у НС безпосередньо підпорядкований генетичному контролю. Так, у лабораторії генної інженерії патогенних бактерій НДІЕМ ім. М.Ф. Гамалії ПАМН на моделі *S. typhimu-*

## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

*rium* методом транспозонного мутагенезу за допомогою транспозону *TnPho* отримана колекція інсерційних клонів, серед яких є мутанти зі зміненими параметрами процесу переходу в НС (порівняно з початковим штамом) [17].

Клонування ряду мутантних генів у плазмідному векторі і визначення нуклеотидних послідовностей їх фрагментів дозволило ідентифікувати декілька генів, що контролюють певні стадії переходу клітин *S. typhimurium* у НС. Одним з них є ген *Pqi*, що кодує синтез трансмембранного білка, який виконує як сенсорну, так і регуляторну функцію при індукції НС. Індукція цього гена відбувається як при переході сальмонел у НС, так і при попаданні їх у макрофаги організму хазяїна на ранніх стадіях інфекційного процесу [18]. Автори припускають, що залежно від конкретного індуктора (фактор доквілля або сироватки крові) білок *Pqi* може індукувати експресію генів, відповідальних за перехід вегетативних клітин у НС або, навпаки, за вихід з нього й зворотний перехід у вегетативний стан з одночасною активізацією генів-факторів патогенності, необхідних для виживання бактерій і колонізації в організмі хазяїна. Інший ідентифікований ген *lpf* кодує синтез невідомих раніше в *S. typhimurium* довгих полярних пілів. Третій ген *glg* кодує синтез ферменту ADP-глюкозопірофосфорилази, що бере участь у синтезі основної запасної речовини клітини – глікогену. Таким чином, достатньо чітко підтверджене припущення про генетичний контроль перебудови метаболізму мікроорганізмів адекватно до умов існування.

У НДІЕМ ім. М.Ф. Гамалії РАМН також уперше позначена ультраструктурна організація клітин *S. typhimurium* при тривалому голодуванні й переході в НС. Для цього культуру сальмонел засівали в мікрокосми з деіонізованою водою та культивували при 20 °С протягом 8 міс. в умовах голодування. Щомісяця проводили кількісний підрахунок клітин у вегетативному стані й таких, що перейшли у НС (шляхом висіву й підрахунку КУО/мл і детекції сальмонел за допомогою ПЛР). Проби, інкубовані протягом 1, 4, 5, 7 і 8 міс., досліджували також електронно-мікроскопічним та імуноцитохімічним методами [19]. Результати проведених досліджень показали, що при тривалому голодуванні й переході в НС бактерії втрачають типову структурну організацію, що забезпечує нормальне фізіологічне функціонування клітини. Морфологічні зміни бактерій послідовні: спочатку утворювалися форми з дефектною клітинною стінкою (клітини протопластного і сферопластного типів).

Цитоплазма цих клітин містила рибосоми і нитки ДНК, клітини нагадували L-форму *S. typhimurium*, проте ця подібність була лише зовнішньою, оскільки для утворення останніх необхідним був вплив L-трансформувальних факторів, а крім цього, обов'язковою умовою існування L-форм є багате білками живильне середовище. При тривалішому голодуванні (4-6 міс.) у клітинах відзначалося фрагментування цитоплазми з високою електронною щільністю, що не дозволило виявляти окремі рибосоми, а в більшості клітин не виявлялися й нитки ДНК. На думку авторів, утворення конгломератів цитоплазми з рибонуклеотидним комплексом може мати захисний характер, що перешкоджає uszkodженню бактерійної ДНК.

У препаратах мікробних культур при голодуванні протягом 7-8 міс. клітини нагадували дрібні сферопласти з чітким підвищенням електронної щільності цитоплазми в центрі клітини. Дрібні фрагменти цитоплазми виявлялися як по периферії клітин, так і за ними, серед окремих фрагментів клітинних стінок. Такі клітини різко відрізнялися морфологічно від вегетативних клітин. На підставі даних електронно-мікроскопічного дослідження, автори вважають, що зберігання нуклеопротеїдних комплексів створює можливість реверсії голодуючих клітин при зміні стресових умов культивування на сприятливі.

Методом електронної імуноцитохімії вивчалось збереження антигенних властивостей бактерій у процесі переходу їх у НС, зокрема, наявність основного фактора патогенності сальмонел – O-антигену.

У паралельних експериментах з рекультивації з НС початково вірулентних штамів сальмонел шляхом внутрішньочеревного введення лабораторним тваринам мічених суспензій вдалося встановити факт розмноження сальмонел (реверсії у вегетативну форму) у печінці й селезінці. При цьому збереглися як аглютинабельні властивості (хоча й дещо слабші), так і вірулентність рекультивованих штамів [1].

Для того, щоб виключити можливе заперечення про те, що при додаванні до некультурабельних клітин живильного середовища починають рости і розмножуватися якісь одиничні життєздатні клітини, проведена серія експериментів з фільтрування культур у вегетативному і некультурабельному стані через фільтри «*Millipore*» різного діаметру [19]. Вегетативні клітини (свіжі культури) сальмонел не проходять крізь фільтр з розміром пор менше 0,45 мкм, а клітини сальмонел, що пе-

## ПЕРЕДОВА СТАТТЯ

ребувають в НС, унаслідок зменшення в розмірах, проходять крізь фільтри з порами меншого діаметру, причому здатність їх проходити крізь фільтри залежить від часу перебування в НС. Культури, що перебувають у НС біля 10 міс., дають позитивну відповідь у ПЛР як на фільтрах з розміром пор 0,22 мкм, так і у фільтратах.

Некультурабельні клітини сальмонел зберігають свої вірулентні властивості. Введення інокуляту суспензії зі змиву з фільтра викликало зараження і загибель мишей, з внутрішніх органів яких виділяли промарковані штами сальмонел.

Докази вірулентності патогенних бактерій у НС отримані при введенні інокуляту *V. cholerae* та ентеротоксигенних *E. coli* у перев'язану петлю кишок кроля [4]. Продемонстровано здатність до розмноження в кишечнику добровольців атенуйованого штаму, який перебував у НС з VD 101 *V. cholerae*. В інших випадках повідомляється про втрату вірулентності [20].

Вдалося також продемонструвати реверсію з НС лістерій та ерсиній шляхом збагачення живильних середовищ додаванням живих і відмерлих найпростіших (*Tetrahymena pyriformis*) і фітогормону ауксину [21].

Останнім часом у мікробіології з'явився новий напрямок досліджень, що одержав назву мікроендокринологія. У бактеріях виявлені речовини, схожі на гормони, і специфічні високоафінні білкові рецептори для багатьох гормонів [22]. Усе більше вчених підкреслюють важливість хімічно опосередкованих міжклітинних взаємодій, одним з проявів яких є експериментально підтверджений ефект стимуляції вторинними метаболітами росту «повільних» культур й оживлення бактерій, які перебувають в НС [14, 23].

Одночасне використання інших лабораторних прийомів рекультивації з НС більшості штамів, якот: перенесення їх у багате живильне середовище, підвищення температури інкубації до 37 °С, короткочасний тепловий шок, опромінення слабкими дозами ультрафіолетових променів, поки не дало позитивних результатів.

Наукові публікації з обговорюваної теми цілком переконливо свідчать про те, що концепцію некультурабельного стану бактерій доцільно розглядати як перспективний напрямок у сучасній науці, що потребує подальших досліджень. НС є невід'ємною частиною екології бактерій, а виявлення механізмів і факторів індукції цього зворотного процесу має не тільки науково-теоретичну, але й величезну практичну значущість, відкрива-

ючи нові можливості в питаннях лікування і профілактики інфекційних хвороб, а також для з'ясування природи хвороб невідомої етіології.

### Література

1. Романова Ю.М., Чегаева Е.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса // Молекула. генетика. – 1998. – № 3. – С. 3-8.
2. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий // Вестн. РАМН. – 2000. – № 1. – С. 13-17.
3. Bogosian G., Bourneuf E.V. A matter of bacterial life and death // EMBO Reports. – 2001. – V. 2, N 9. – P. 770-774.
4. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J. et al. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms // Bio/Technology. – 1985. – V. 3. – P. 817-820.
5. Staley J.T., Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // Annu. Rev. Microbiol. – 1985. – V. 39. – P. 321-346.
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, N 1. – P. 143-169.
7. Joux F., Lebaron P., Trousseller M. Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms // FEMS Microbiol. Ecol. – 1997. – V. 22. – P. 65-76.
8. Bloomfield S.F., Stewart G., Dodd C.E.R. et al. The viable but non-culturable phenomenon explained? // Microbiology. – 1998. – V. 144. – P. 1-3.
9. Lebaron P, Catala P, Pathuisot N. Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 2697-2700.
10. Bogosian G., Morris P.J.L., O'Neil J.P. A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. // Ibid. – 1998. – V. 64. – P. 1736-1742.
11. Oliver J.D., Nilsson L., Kjelleberg S. Formation of nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* and its relationship to the starvation state // Ibid. – 1991. – V. 57. – P. 2640-2644.
12. Makino S.I., Kii T., Asakura H. et al. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in Salted Salmon Roe? // Ibid. – 2000. – V. 66. – P. 5536-5539.
13. Романова Ю.М., Кириллов М.Ю., Терехов А.А., Гинцбург А.Л. Идентификация генов, контролирующих переход бактерий *Salmonella typhimurium* в некультивируемое состояние // Генетика. – 1996. – Т. 32, № 9. – С. 1184-1190.
14. Shleeva M.O., Bagramyan K., Telkov M.V. et al. Formation and resuscitation of «non-culturable» cells of *Rhodococcus*



## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

rhodochrous and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase // *Microbiology*. – 2002. – V. 148. – P. 1581-1591.

15. Chaveerach P., Huurne A.A.H.M., Lipman L.J.A., Knapen F. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 711-714.

16. Горобец О.Б., Блинкова Л.П., Батуро А.П. Влияние микроводорослей на жизнеспособность микроорганизмов в естественной и искусственной среде обитания // *Журн. микробиол.* – 2001. – № 1. – С. 104-108.

17. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий на модели *Salmonella typhimurium*: феномен и генетический контроль // Там же. – 1997. – № 4. – С. 35-41.

18. Chrisman M.F., Morgan R.W., Jacobson F.S., Ames B.H. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium* // *Cell*. – 1985. – V. 41. – P. 753-762.

19. Диденко Л.В., Константинова Н.Д., Романова Ю.М. и др. Ультраструктурная организация клеток *Salmonella typhimurium* при длительном голодании и переходе в некультивируемое состояние // *Молекул. генетика*. – 2000. – № 3. – С. 21-26.

20. 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.

21. Пушкарева В.И., Емельяненко Е.Н., Литвин В.Ю. и др. Патогенные листерии в почве и в ассоциации с водорослями: обратимый переход в некультивируемое состояние // *Журн. микробиол.* – 1997. – № 3. – С. 3-6.

22. Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Young D.I. et al. A bacterial cytokine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V. 95. – P. 8916-8921.

23. Bruns A., Nubel U., Cypionka H., Overmann J. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 1980-1989.

### **NONCULTURABLE STATE OF ASPEROGENIC BACTERIA: THEORETICAL ASPECTS AND A PROBLEM AND ITS PRACTICAL SIGNIFICANCE**

Yu.L. Voliansky

*SUMMARY. The results of some works, devoted to research of a phenomenon of nonculturable bacteria state, their biological properties, influence of an environment on an induction of such state and the factors recovering vegetative conditions of a bacterial cell, are considered in the review. Among the variety of methodological and conceptual approaches to the given problem, the priority of ecological aspects is obvious in modern medical bacteriology and infectology.*

© Колектив авторів, 2004

УДК 616.36-002-06:616.61-008.64]-08-036.869

**Д.Є. Телегін, П.С. Кондрат, Р.Ю. Грицко, С.В. Антоненко, Т.М. Абрагамович,  
І.Б. Тичка, М.Г. Люльчук, О.М. Кравченко, Р.Б. Савронь, О.В. Ворожбит,  
І.Д. Бойків**

## **КЛІНІЧНІ ФОРМИ ТА НАСЛІДКИ ВІРУСНИХ ГЕПАТИТІВ У ХВОРИХ З ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ, КОРИГОВАНОЮ СЕАНСАМИ ГЕМОДІАЛІЗУ**

Національний медичний університет ім. Данила Галицького (м. Львів),  
Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України (м. Київ),  
Львівська обласна клінічна лікарня

*Шляхом скринінгового серологічного обстеження 186 хворих на хронічний гломерулонефрит у термінальній стадії ХНН встановили, що 39,8 % пацієнтів діалізованої популяції інфіковані вірусами*

*гепатиту В, С або їх поєднанням. Частота гострих і хронічних форм ГВ у цій категорії хворих становить 21,5 %. Частота HCVAb-серопозитивних осіб – 18,3 %, з них 71,0 % – хворі на гострий або хроніч-*