

УДК: 612.017.1:611-8.73:616.211-002

Ю.Д. ПАХОМОВ², Л.П. БЛИНКОВА², Л.Г. СТОЯНОВА^{1,*}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, 105064

e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Влияние инокулята на жизнеспособность некультивируемых клеток бактериоцинопродуцирующих штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Проведены сравнительные исследования по получению жизнеспособных некультивируемых клеток (ЖНК) двух штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* разного происхождения и с разным уровнем бактериоцинопродуцирующей активности в условиях углеводного голодания. Использованы два варианта инокулятов из популяции клеток лактококков: П1 — не отмытые от культуральной жидкости и П2 — дважды отмытые физиологическим раствором. Клетки инокулята П1 переходили в состояние ЖНК быстрее, чем П2. В течение инкубации изучены изменения следующих параметров популяций: общее число клеток, общее число жизнеспособных клеток (ОЧЖК), число колониеобразующих единиц, число ЖНК (по способности продуцировать бактериоцин низин), а также соотношение численности живых и мертвых клеток (с применением набора красителей Live/Dead®). За 1 год инкубации число ОЧЖК в популяциях снизилось на 3–6 порядков, причем ЖНК, полученные из П1, уменьшились в размере. Спустя 1 год бактериоцинопродуцирующая активность клеток из П2 в 19 раз превосходила активность клеток из П1.

Ключевые слова: активность, бактериоцин низин, жизнеспособные некультивируемые клетки, колониеобразующие единицы, общее число жизнеспособных клеток, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Под воздействием стрессовых факторов бактерии могут терять способность расти на питательных средах, оставаясь при этом жизнеспособными [1, 2]. Такие бактерии получили название жизнеспособных некультивируемых клеток (ЖНК). При переходе в некультивируемое состояние (НС) многие микроорганизмы претерпевают морфологические и физиологические изменения — значи-

тельное уменьшение размеров, замедление метаболизма, изменение состава мембраны и т.д. [3].

Наличие ЖНК в различных экосистемах объясняет трудности выделения возбудителей заболеваний с применением культуральных методов [1, 4]. Возникают проблемы при оценке микробной обсемененности биологических объектов, пищевых продуктов, биотехнологических объектов [5–7].

Пахомов Юрий Дмитриевич, Блинкова Лариса Петровна, Стоянова Лидия Григорьевна.

Список сокращений: ЖК — живые клетки; ЖНК — живые некультивируемые клетки; КЖ — культуральная жидкость; КОЕ — колониеобразующая единица; НС — некультивируемое состояние; ОП — оптическая плотность; ОЧЖК — общее число жизнеспособных клеток; ОЧК — общее число клеток.

* Автор для переписки.

Физиологическим свойством бактерий *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* является их способность синтезировать бактериоцин низин, используемый как биоконсервант для пищевого сырья и продуктов питания [8]. Данные об изучении ЖНК низин-продуцирующих лактококков авторам неизвестны.

В связи с этим цель исследования состояла в изучении образования ЖНК и синтеза низина лактококками *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* во время длительного углеводного голодания (условие образования некультивируемых клеток лактококка) и зависимость этого процесса от свойств инокулята.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В исследовании использовали два бактериоцинпродуцирующих штамма *L. lactis* ssp. *lactis* из коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова: природный низинсинтезирующий штамм (МГУ) и рекомбинантный штамм (F-116), полученный методом слияния протопластов [9]. Нуклеотидные последовательности этих штаммов депонированы в GenBank (DQ255952 и EF100777, соответственно) [10]. Бактерии хранили в полужидкой среде Элликера (Sigma) при температуре -80° .

Для получения посевной культуры клетки дважды рекультивировали на бульоне Элликера в течение 24 ч, затем пересеивали культуру и выращивали ее в течение еще 18 ч. ЖНК лактококков получали на среде, создающей условия длительного углеводного голодания [11]. опыты проводили с двумя вариантами инокулята 18-часовой культуры (5 об.%): 1 — неотмытая от метаболитов (П1); 2 — дважды отмытая физиологическим раствором культура (П2); оба затем были ресуспендированы в исходном объеме физраствора. Начальная концентрация клеток в обоих случаях была $(0,6—1) \cdot 10^8$ кл/мл, (ОП $0,1 \pm 0,01$).

Колониеобразующие единицы (КОЕ/мл) и общее содержание клеток (ОЧК/мл) определяли на среде Элликера и в счетной камере (Горяева или Тома). Соотношение числа живых (ЖК, зеленое окрашивание) и мертвых (красное окрашивание) клеток определяли в люминесцентном микроскопе OPTON (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 320 раз после обработки Live/Dead® (BacLight™). ЖНК выявляли по различию между содержанием в культуре КОЕ/мл и общим содержанием жизнеспособных клеток (ОЧЖК/мл). ОП измеряли на спектрофотометре КФК-3 при длине волны 450 нм.

Продукцию бактериоцина определяли методом диффузии в агар с использованием тест-куль-

туры *Bacillus coagulans* 429 [9]. Удельную активность бактериоцина (МЕ/кл) рассчитывали на одну продуцирующую единицу биомассы лактококков (как отношение активности МЕ/мл к 10^9 кл/мл).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С первых суток инкубации бактерий была видна разница в динамике роста между популяциями обоих штаммов из П1 и П2 (рисунок). Клетки из П1 в течение 1—5 дней прошли стадию активного роста и увеличили численность от $(0,6—1) \cdot 10^8$ до $(1,5—1,6) \cdot 10^9$ ОЧК/мл (см. рисунок, а) (на этой стадии величины ОЧЖК и ОЧК практически совпадают). Количество же клеток из П2 в течение 5 сут не увеличилось (см. рисунок, б). Такая разница, очевидно, связана с внесением с неотмытыми клетками метаболитов, стимулирующих рост лактококков [12].

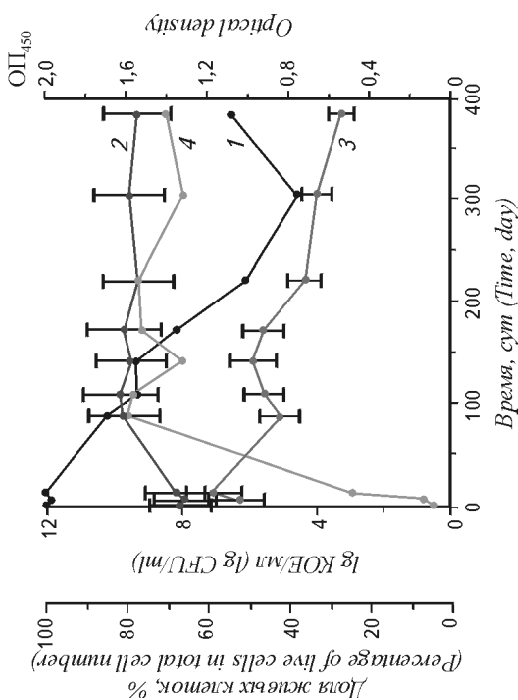
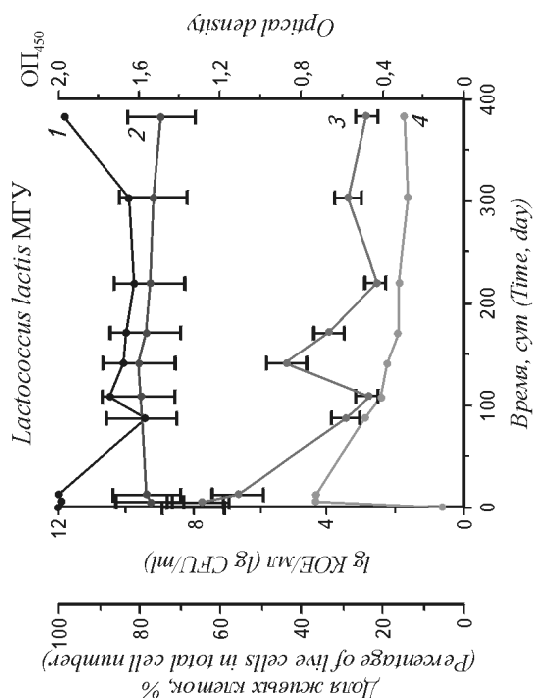
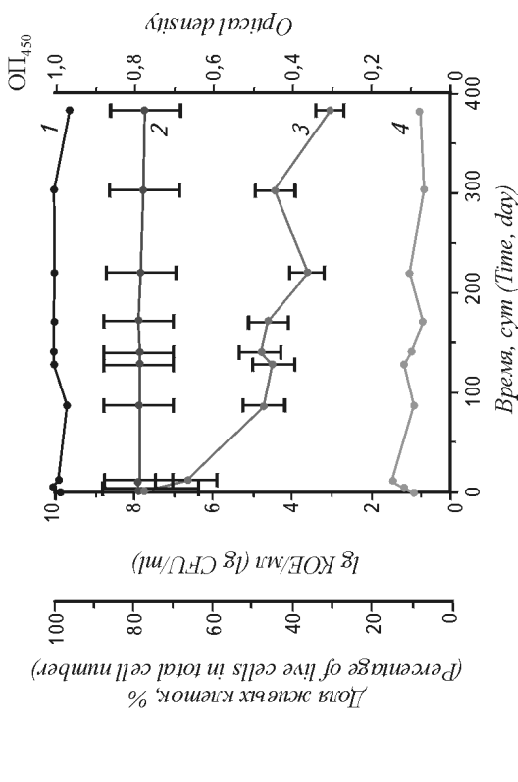
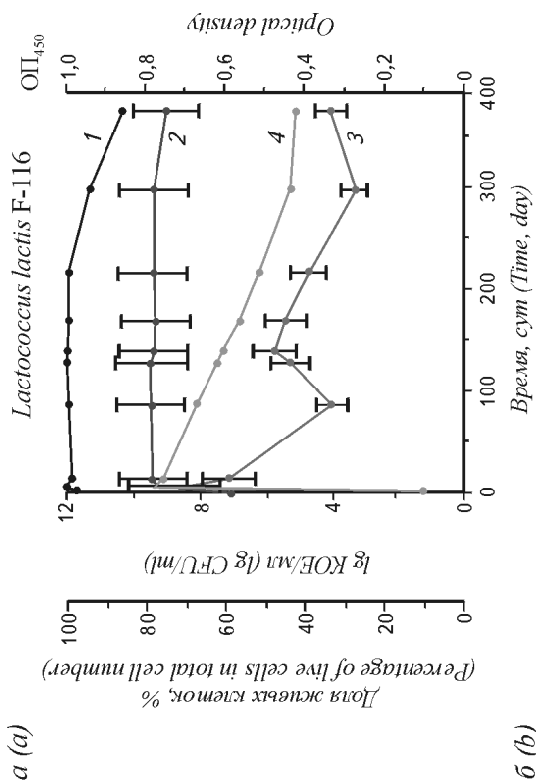
Для популяции из П2 штамма МГУ (см. рисунок, левая часть) при посевах на среду наблюдали фенотипическую диссоциацию культуры на две субпопуляции — образующую колонии нормального размера (диаметром 3—4 мм) и формирующую микроколонию диаметром менее 0,1 мм. Последние к 12-м суткам инкубации перешли в фазу активного роста. К этому моменту количество микроколоний в 5,5 раз превышало число нормальных колоний, а ОЧК/мл составляло $(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$ при исходной концентрации $(9 \pm 1) \cdot 10^7$. Затем (к 3 мес культивирования) значение ОЧК/мл возросло до $(5,2 \pm 0,6) \cdot 10^9$ /мл (разница в 63,5 раза).

Значение ОЧК/мл для культур, достигших максимальных концентраций $((1,5—5,2) \cdot 10^9$ кл/мл) и прошедших стадию активного роста $((0,7—1) \cdot 10^8$ /мл) оставалось относительно постоянным или уменьшалось не более, чем на порядок. Величина же ОЧЖК/мл зависела от природы штамма и условий эксперимента.

У штамма F-116 процент ЖК/мл в обеих популяциях (см. рисунок, правая часть) был близок к 100% в течение всего эксперимента.

После года наблюдений доля ЖК из популяции П1 штамма МГУ восстановилась до 100%, что сопровождалось уменьшением ОЧК/мл (см. рисунок). По-видимому, это произошло за счет лизиса мертвых клеток. Наименьшая жизнеспособность клеток штамма МГУ отмечена для П2: количество ЖК в популяции постепенно снижалось и к 10-му месяцу составило 38,1% при ОЧК/мл $3,3 \cdot 10^9$ /мл, а через год — 54,2% при ОЧК/мл, равном $2 \cdot 10^9$ /мл.

ЖНК формировались у обоих штаммов в обоих вариантах сразу после инокуляции, что



Изменение жизнеспособности *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, штаммы МГУ и F-116, в течение 1 года наблюдения: а — популяция ЖНК из инокулята, не отмытого от культуральной жидкости (тип П1), б — популяция ЖНК из инокулята, дважды отмытого физиологическим раствором (тип П2); 1 — доля живых клеток (% от общего содержания клеток); 2 — общее содержание клеток (ОЧК/мл); 3 — КОЕ/мл; 4 — оптическая плотность

Changing of viability of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, MGU and F-116 strains, during 1-year observation: а, population of live nonculturable cells (LNC) unwashed from culture liquid (P1 type); б, LNC population from inoculate that was washed twice by saline (P2 type); (1), percentage of viable cells (% of total cell content); (2), total content of cells; (3), CFU/ml; and (4), optical density

видно из разницы между величиной ОЧЖК/мл (которая практически совпадает с кривой, отражающей ОЧК/мл) и lgКОЕ (см. рисунок). К 24-му часу культивирования 60—80% клеток, а к 5-м суткам инкубации в условиях углеводного стресса уже 82,1—99,6% не формировали колонии (что видно при расчете ОЧЖК/мл как произведение ОЧК/мл на % живых клеток). Для популяций из П1 наблюдали большее снижение значения КОЕ/мл, чем для параллельной культуры. По-видимому, клетки, использовавшие ресурсы среды для роста стали в процессе культивирования более чувствительны к стрессам углеводного голодания. К трем месяцам инкубации популяции содержали 10^3 — 10^4 культивируемых клеток в 1 мл. Разница между величиной КОЕ/мл и ОЧЖК/мл составляла 5—6 порядков. К 10 мес в популяциях из П1 выявлено $(2,2—2,7) \cdot 10^3$ /мл культивируемых клеток. Таким образом, способность к культивированию снизилась на 6 порядков. Для популяции П2 через 1 год инкубации количество КОЕ/мл было $(1,0—2,7) \cdot 10^4$, что было на 4 порядка ниже ОЧЖК/мл. Большой процент ЖНК по сравнению с рекомбинантным F-116 наблюдали в популяции П1 природного штамма МГУ: число КОЕ/мл во втором случае было $(7,9 \pm 0,9) \cdot 10^2$ /мл, а разница между значением КОЕ/мл и ОЧЖК/мл составляла 6 порядков.

Увеличение численности культивируемых клеток после 120—150 сут инкубации (см. рисунок) можно объяснить вторичным ростом, который не регистрируется счетной камерой, но выявляется при анализе величины КОЕ/мл, или спонтанным восстановлением части ЖНК эндогенными стимулирующими факторами. Некоторые клетки, сохранившие способность формировать колонии, способны расти в условиях жесткого лимита по питательным веществам за счет веществ из лизированных клеток [2, 5]. Эта способность могла позволить некоторым клеткам быстро реагировать на поступление в среду питательных веществ, увеличивая число КОЕ/мл после активного роста. Подъем численности культивируемых клеток к 5-му месяцу в исследуемых популяциях составил 1—2 порядка. Естественная гетерогенность клеток в плане способности к образованию колоний возрастает в условиях стресса, по-видимому, за счет адаптивных мутаций [1, 3].

Субпопуляции штамма МГУ из П2 имели различные характеристики. К 3-му месяцу инкубации микроколонии выявить не удалось, поскольку субпопуляция полностью перешла в НС. Субпопуляция с нормальными колониями (вариант П2

МГУ) теряла способность к образованию колоний медленнее по сравнению с П2 штамма F-116 (после 3 мес инкубации значение КОЕ/мл оставшейся субпопуляции было выше, чем у П2 F-116). В связи с этим предполагается, что субпопуляция с нормальными колониями МГУ П2 аналогична F-116 П2.

Таким образом, две субпопуляции, воздействуя друг на друга, увеличивали устойчивость минорной субпопуляции к стрессу, возможно, за счет синтеза полисахаридов/полипептидов. Это видно по более высокому значению КОЕ/мл для МГУ П2 по сравнению с П2 F-116 при том, что все вырастающие колонии имели нормальные для лактококка размеры, т.е. все клетки субпопуляции, образующей микроколонии, перешли в НС.

Разделение гомогенной культуры на две субпопуляции сохраняло пролиферативный потенциал бактерий дольше за счет «альтруистической» гибели большей части клеток, создавая остальным микроэкологические преимущества. Клетки популяций из П2 уменьшались в размерах в меньшей степени, чем клетки параллельных популяций. Известно, что измельчание клеток — одна из характерных черт их перехода в НС [1, 3].

Изучение бактериоцинопродуцирующей активности лактококков при длительном углеводном голодании показало, что бактериоцин синтезируется в первые сутки после посева (таблица). Однако не было выявлено значительных различий в конечной активности низина в популяциях штаммов в разных условиях эксперимента (2450—3000 МЕ/мл). В течение года наблюдений активность по синтезу бактериоцина изменялась мало.

Различие в удельной активности низина между двумя вариантами опыта П1 и П2 было отмечено с первых дней инкубации. Клетки популяции из П2 (дважды отмытые физиологическим раствором) более продуктивны, чем в параллельных популяциях: после 24 ч инкубации удельная активность различалась в 20—40 раз в зависимости от использованного штамма. Можно предположить, что в качестве реакции на стресс лактококки накапливали в среде определенную защитную концентрацию бактериоцина. Характеристикой постепенно затухающего синтеза бактериоцина являлось наличие трех максимумов удельной активности за 1 год наблюдений: для штамма МГУ — это 2-е и 7-е сутки, а для F-116 — 2-е и 10-е сутки культивирования. Третий максимум наблюдался через год наблюдений. Наибольшая удельная активность низина отмечена на 2-е сутки культивирования обоих штаммов и обеих популяций.

Динамика бактериоцинпродуцирующей активности в популяциях *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* штаммов МГУ и F-116 при углеводном голодании
Dynamics of bacteriocin-producing activity in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MGU and F-116 strains populations during carbohydrate starvation

Время инкубации Time of incubation	Тип инокулята Type of inoculum	Общее число клеток в 1 мл Total number of cells in 1 ml		Удельная продуктивность по низину, МЕ/10 ⁹ кл Specific nisin productivity, IU/10 ⁹ cell		Кратность различий удельной активности между вариантами П2 и П1 Multiplicity of differences in specific activity between P2 and P1 variants	
		МГУ	F-116	МГУ	F-116	МГУ	F-116
1 сут 1 day	П1	(1,5 ± 0,2)·10 ⁹	(1,5±0,2)·10 ⁹	2069	1633	25,1	41,8
	П2	(4,7 ± 0,5)·10 ⁷	(4,3±0,5)·10 ⁷	51906	68287		
2 сут 2 days	П1	(1,6 ± 0,2)·10 ⁹	(1,4±0,2)·10 ⁹	2083	1713	35,3	55,4
	П2	(3,4 ± 0,4)·10 ⁷	(3,2±0,4)·10 ⁷	73529	94936		
3 сут 3 days	П1	(1,4 ± 0,2)·10 ⁹	(1,1±0,1)·10 ⁹	2097	3037	27,1	28,1
	П2	(4,4 ± 0,5)·10 ⁷	(3,3±0,4)·10 ⁷	56818	85365		
7 сут 7 days	П1	(1,8 ± 0,2)·10 ⁹	(1,2±0,1)·10 ⁹	1525	2379	41,7	26,7
	П2	(4,4 ± 0,5)·10 ⁷	(4,7±0,5)·10 ⁷	63636	63559		
10 сут 10 days	П1	(2,1 ± 0,2)·10 ⁹	(1,3±0,1)·10 ⁹	1322	1870	35,1	36,8
	П2	(5,3 ± 0,6)·10 ⁷	(3,6±0,4)·10 ⁷	46402	68820		
3 мес 3 months	П1	(3,4 ± 0,4)·10 ⁹	(3±0,3)·10 ⁹	794	755	1/1,5	40,5
	П2	(5,2 ± 0,6)·10 ⁹	(7,2±0,8)·10 ⁷	524	30556		
4,5 мес 4.5 months	П1	(4,2 ± 0,5)·10 ⁹	(2,6±0,3)·10 ⁹	480	784	1,6	46,6
	П2	(2,9 ± 0,3)·10 ⁹	(6,6±0,7)·10 ⁷	783	35152		
1 год 1 year	П1	(8,8 ± 1)·10 ⁸	(1,1±0,1)·10 ⁹	3111	2641	1/2,6	18,9
	П2	(2 ± 0,2)·10 ⁹	(4,9±0,5)·10 ⁷	1375	49796		

Суммируя экспериментальные данные, можно подтвердить, что в ответ на стресс в клетках штаммов *L. lactis* ssp. *lactis*, отличающихся по бактериоцинпродуцирующей активности, запускается механизм перехода в состояние ЖНК. Наличие метаболитов в инокуляте стимулирует рост и размножение *L. lactis* ssp. *lactis* на минимальной среде в условиях лимитирования по углеводам. Впервые описаны особенности динамики содержания бактериоцина в стрессовых условиях, когда более чем 99% клеток переходят в НС. Данные свидетельствуют о сохранении их биосинтетической активности.

Получено 9.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Oliver, J.D.* The Viable but Nonculturable State in Bacteria // *J. Microbiol.* — 2005. — V. 43(S). — P. 93—100.
2. *Aertsen, A.* Stress and how bacteria cope with death and survival / *A. Aertsen, C.W. Michiels* // *Crit. Rev. Microbiol.* — 2004. — V. 30(4). — P. 263—273.
3. *Блинкова Л.П.* Свойства некультивируемых и покоящихся форм микроорганизмов / *Л.П. Блинкова, Ю.Д. Пахомов, Л.Г. Стоянова* // *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* — 2010. — № 3. — С. 67—76.
Blinkova, L.P. Characteristics of Nonculturable and Resting Forms of Microorganisms / *L.P. Blinkova, Yu.D. Pakhomov, and L.G. Stoyanova* // *Immunopatologiya, Allergologiya, In-*

- fektologiya (Immunopathology, Allergology and Infectology). — 2010. — N 3. — P. 67—76.
4. Asakura, H. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state / H. Asakura, K. Kawamoto, Y. Haishima // Res. Microbiol. — 2008. — V. 159(9—10). — P. 709—717.
 5. Oliver, J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria // FEMS Microbiol. Rev. — 2010. — V. 34(4). — P. 415—425.
 6. Pakhomov, Y.D. Nonculturable Forms of *Lactococcus lactis* / Y. D. Pakhomov, L.P. Blinkova, L.G. Stoyanova, O.V. Dmitrieva // Annals of Nutr. Metabol. — 2013. — N 62 (suppl. 2). — P. 22.
 7. Blinkova, L. Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparations / L. Blinkova, D. Martirosyan, Yu. Pakhomov, O. Dmitrieva, R. Vaughan, M. Altshuler // Functional Foods in Health and Disease. — 2014. — V. 4(2). — P. 66—76.
 8. Стоянова Л.Г. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства / Л.Г. Стоянова, Е.А. Устюгова, А.И. Нетрусов // Прикл. биохим. микробиол. — 2012. — Т. 48(3). — С. 259—275.
Stoyanova, L.G. Antimicrobial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Diversity and Properties / L.G. Stoyanova, E.A. Ustiugova, and A.I. Netrusov // Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya (Appl. Biochem. Microbiol.). — 2012. — V. 48(3). — P. 259—275.
 9. Стоянова Л.Г. Получение низинпродуцирующих бактерий методом слияния протопластов двух родственных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, низкоактивных по синтезу низина / Л.Г. Стоянова, Н.С. Егоров // Микробиология. — 1998. — Т. 67(1). — С. 47—54.
Stoyanova, L.G. Obtaining of Nisin-Producing Bacteria by the Method of Protoplast Fusion of Two Related Strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with Low Activity of Nisin Synthesis / L.G. Stoyanova, and N.S. Egorov // Mikrobiologiya (Microbiology). — 1998. — V. 67(1). — P. 47—54.
 10. Стоянова Л.Г. Установление таксономического положения новых бактериоцинпродуцирующих штаммов *Lactococcus lactis* / Л.Г. Стоянова, Т.Д. Сульимова, А.И. Нетрусов // Вестник МГУ. Сер. Биология. — 2008. — № 4. — С. 154.
Stoyanova, L.G. Establishing of Taxonomic Position of New Bacteriocin-Producing Strains of *Lactococcus lactis* / L.G. Stoyanova, T.D. Sul'timova, and A.I. Netrusov // Vestnik MGU. Ser. Biologiya (J. Moscow State Univ. Ser. Biology). — 2008. — N 4. — P. 154.
 11. Ganesan, B. Carbohydrate Starvation Causes a Metabolically Active but Nonculturable State in *Lactococcus lactis* / B. Ganesan, M.R. Stuart, B.C. Weimer // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — V. 73(8). — P. 2498—2512.
 12. Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболических бактерий // Микробиология. — 2006. — Т. 75(4). — С. 483—488.
Petrov, L.N. Regulatory Functions of Bacterial Exometabolites // Mikrobiologiya (Microbiology). — 2006. — V. 75(4). — P. 483—488.

Yu.D. PAKHOMOV², L.P. BLINKOVA²,
and L.G. STOYANOVA^{1,*}

¹The M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991, Moscow Russia

²The Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow Russia

e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Effect of Inoculum of Viability of Non-culturable Cells of Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Strains

The comparative studies on obtaining viable but nonculturable cells (VBNC) of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* of different origins and activity levels under carbohydrate starvation stress have been performed. Two different types of inoculum were applied: P1, unwashed from culture liquid cells, and P2, twice washed with normal 0.9% saline cells. The P1 inoculum shifted to non-culturability faster than P2. During the whole experiment we studied changes in such strain population characteristics as total number of cells, total number of viable cells, number of colony-forming units, number of VBNC (from the nisin-producing activity), and ratio of viable to dead cells in population (using Live/Dead® (BacLight™) staining kit). After 1 year of incubation culturability decreased by 3—6 orders of magnitude in either of populations, and P1 inoculum VBNC demonstrated considerable reduction of cell size. After a year of culturing, the bacteriocin activity of P2 cells was up to 19 times higher than of P1 cells.

Key words: activity, bacteriocin nisin, colony-forming unit, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, total number of viable cells, viable but nonculturable cells (VBNC).

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 1, P.21—26.

* Author for correspondence.