

# ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ И САПРОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

**Исследована динамика сохранения жизнеспособности культур условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов в искусственной среде обитания с лимитом по азоту. Выявлены особенности динамики численности живых бактерий в зависимости от таксономической принадлежности, установлено образование некультивируемых форм бактерий при длительной инкубации.**

## Введение

Некультивируемые формы образуются в ответ на неблагоприятные изменения условий окружающей среды [1]. Особенно актуально изучение условий формирования и реактивации некультивируемых форм патогенных и условно патогенных для человека микроорганизмов и свойств после их восстановления, поскольку культуральными методами часто не удаётся выявить источник инфекции [2]. Как правило, учёные изучают динамику потери культивируемости в стрессовых условиях, характерных для естественной и искусственной среды обитания микроорганизмов. Виды стресса включают в себя трофический и/или осмотический (морская и пресная вода, минимальное содержание питательных веществ в субстрате и др.) [3-7], температурный (инкубация при пониженных температурах) [8, 9], химический (хлор водопроводной воды, различные промышленные загрязнения и др.) [10] и биологический (биологически активные вещества окружающей микрофлоры и т.д.) [11, 12] стрессы. Цель нашего исследования – изучение динамики жизнеспособности некоторых условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов при длительной инкубации в экспериментально созданных условиях трофического стресса.

## Материалы и методы исследования

В качестве модельных микроорганизмов использованы штаммы бактерий *Alcaligenes faecalis* 415, *Enterobacter aerogenes* ГИСК 418, *Proteus vulgaris* НХ 19222, *Klebsiella pneumoniae* 1954. Культуры выращивали во флаконах объёмом 500 мл, содержащих 300 мл мясопептонного бульона, в течение суток без перемешивания при  $37 \pm 1$  °С, с пересевом на среду следующего состава (г/л): малаг – 3,0; дрожжевой экстракт – 0,1;  $K_2HPO_4$  – 3;  $KH_2PO_4$  – 2;  $NH_4Cl$  – 1,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2;  $MnSO_4 \times H_2O$  – 0,1;  $CaCl_2$  – 0,02;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,02,  $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$  – 0,002; pH 7,0. После 24 ч культивирования в тех же условиях для создания трофического стресса микроорганизмы пересеивали на среду того же состава с пятикратным уменьшением количества источника азота (0,3 г/л  $NH_4Cl$ ). Полученную культуру выращивали в течение суток при  $37 \pm 1$  °С, после чего помещали для дальнейшей инкубации в условия комнатной температуры. Жизнеспособность бактерий оценивали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ/мл), периодически отбирая пробы для высева на мясопептонный агар. Общее количество клеток, в расчёте на 1 мл, подсчитывали в камере Горяева. Соотношение живых (включая некультивируемые) и мёртвых бактерий определяли методом люминесцентной микроскопии с помощью набора красителей Live/Dead (Baclight™). Количество жизнеспособных некультивируемых клеток рассчитывали по разнице между общим количеством живых клеток и величиной КОЕ/мл.

Для облегчения прорастания длительно голодавших клеток и возможного повыше-

**Ю.Д. Пахомов\***,  
младший научный  
сотрудник, ФГБУ  
Научно-исследовательский  
институт вакцин  
и сывороток  
им. И.И. Мечникова  
Российской академии  
медицинских наук

**Л.П. Блинкова**,  
доктор биологических  
наук, профессор,  
заведующий  
лабораторией  
микробиологических  
питательных сред,  
ФГБУ Научно-исследовательский  
институт вакцин  
и сывороток  
им. И.И. Мечникова  
Российской академии  
медицинских наук

\* Адрес для корреспонденции: yury-pakhomov@yandex.ru

ния высеваемости культур изучаемых микроорганизмов использовали щадящие по питательным веществам условия (мясопептонный бульон, разведённый в пять раз, но обогащённый двадцатью аминокислотами в количестве по 0,05 г/л каждой).

## Результаты и их обсуждение

**В** качестве основного стрессового воздействия был выбран трофический фактор (выращивание на скудной синтетической среде, испытанной другими авторами с целью образования форм покоя – цист у *Azospirillum brasilense*) [13]. Параметры инкубации (температура, оксигенация, величина рН и др.), в основном, соответствовали естественным условиям.

Для всех культур был отмечен рост численности популяции с максимумом на 7 сут (кроме *Alcaligenes faecalis* 415, у которого максимум обнаружен через месяц). Наибольшая численность микроорганизмов составила (в зависимости от вида)  $10^7$ – $10^9$  КОЕ/мл. Дальнейшая динамика жизнеспособности характеризовалась сукцессионной сменой популяций микроорганизмов, выражающейся в чередующихся периодах отми-

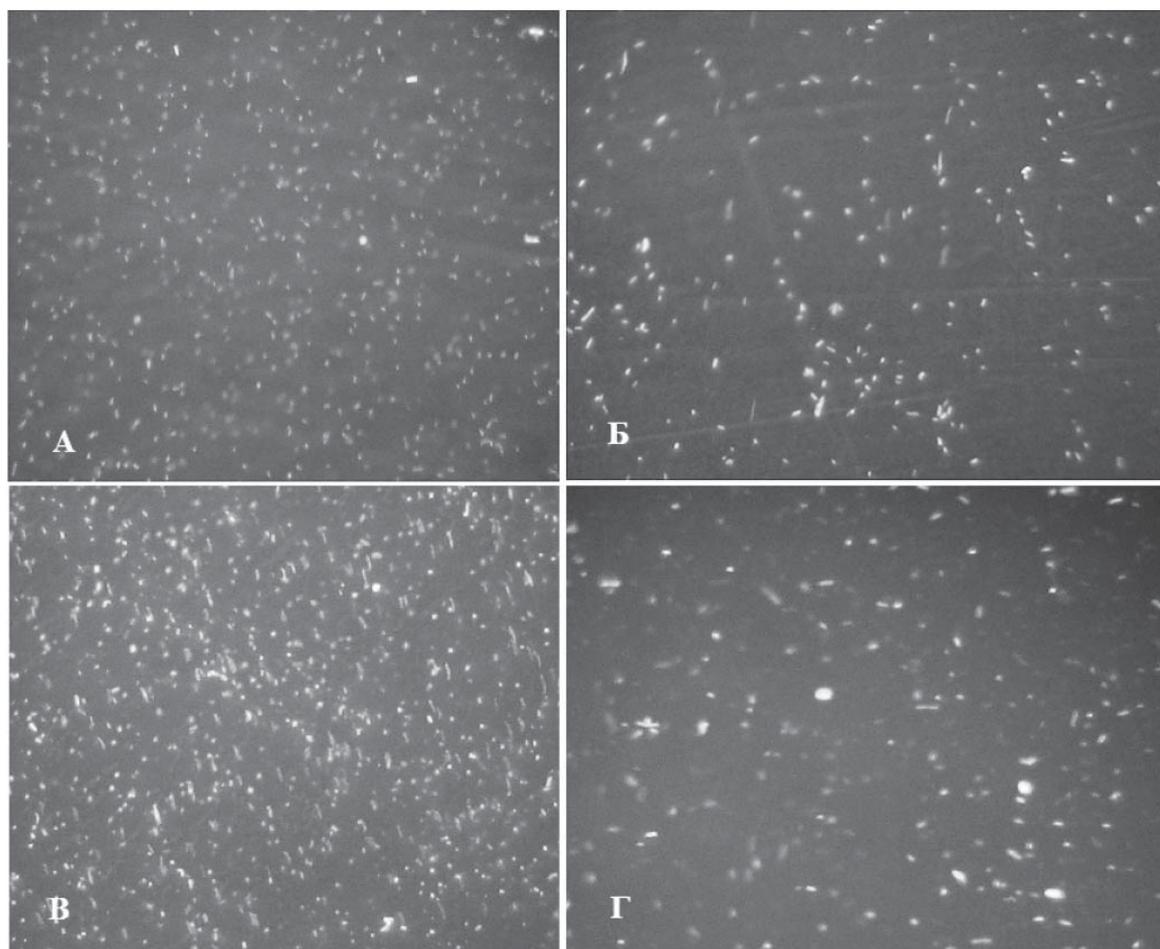
**О.В. Никифорова,**  
лаборант-исследователь,  
ФГБУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова  
Российской академии медицинских наук

рания большей части популяции и следующего за этим роста. Вероятно, в культуре, находящейся в постстационарной фазе, появляются клетки, которые в результате мутации или геномной перестройки получают преимущество перед остальными и оказываются способными к активному росту и размножению с использованием отмерших клеток в качестве питательного субстрата, образуя сменяющие друг друга субпопуляции. Подобная динамика подробно описана для *Escherichia coli* [14].

Нами показано, что к седьмому месяцу инкубации уровень жизнеспособности всех культур, кроме *Alcaligenes faecalis* 415 (78% живых при общей численности в пределах  $1 \times 10^8$ /мл и величине КОЕ/мл  $1 \times 10^3$ ), снизился до уровня, не выявляемого с помощью люминесцентного микроскопа, т.е. численность живых клеток составляла не более 1% от их общего числа.

Что касается колониеобразующих свойств, то *Enterobacter aerogenes* ГИСК 418 в этот пери-

**Рис. 1.** Живые (зелёные) и мёртвые (красные) клетки исследованных микроорганизмов после 1 года инкубации, окрашенные набором Live/Dead. А) *Enterobacter aerogenes* ГИСК 418; Б) *Klebsiella pneumoniae* 1954; В) *Alcaligenes faecalis* 415; Г) *Proteus vulgaris* НХ 19222.



од времени полностью потерял способность образовывать колонии. Для *Proteus vulgaris* НХ 19222 и *Klebsiella pneumoniae* 1954 значения КОЕ/мл составили  $2,85 \pm 0,31 \times 10^6$  и  $2,2 \pm 0,24 \times 10^6$ , соответственно. Эти величины коррелируют с общим количеством живых клеток в 1 мл культуры.

После 1 года наблюдений жизнеспособность у этих микроорганизмов составила  $10^3$ – $10^6$  КОЕ/мл (данные по сохранению жизнеспособности культур представлены в табл. 1). Общее число клеток, подсчитанное в камере Горяева, составило  $10^7$ – $10^8$  кл./мл, а численность живых – более 99 % от общего числа клеток. Наиболее жизнеспособной к этому сроку оказалась культура *Enterobacter aerogenes* (рис. 1). Количество полученных нами некультивируемых клеток к 12 месяцам культивирования составляло от 97,1 % для *Klebsiella pneumoniae* 1954 до более чем 99,99 % для *Proteus vulgaris* НХ 19222. Показано, что клетки изученных микроорганизмов, находясь длительное время в условиях трофического стресса, переходят в некультивируемое состояние. При этом часть некультивируемых клеток может спон-

танно восстанавливать способность к делению, вероятно, за счёт высвобождающихся из разрушенных клеток стимулирующих факторов.

Основная причина перехода микроорганизмов в некультивируемое состояние – необходимость максимального замедления обмена веществ для экономии ресурсов, что обеспечивает более успешное переживание неблагоприятного периода. Однако причиной потери способности к образованию колоний на традиционных средах могут быть также особенности обмена веществ микробов, приспособившихся к росту в условиях недостатка питания. Длительное пребывание микроба в олиготрофных условиях приводит к замедлению метаболизма, а также к появлению более высокоаффинных транспортных белков для лучшего поглощения оставшихся субстратов из окружающей среды [15]. При попадании на богатые среды в такой клетке после индукции метаболизма происходит накопление питательных веществ в концентрациях, которые нарушают жизнедеятельность микроорганизма. Это явление описано в литературе под термином субстрат-ускоренная гибель клеток [16–18]. Кроме того, как упоминалось выше, длительно находящиеся в постстационарной фазе микроорганизмы могут адаптироваться благодаря

**Таблица 1**

Сохранение жизнеспособности изученных культур микроорганизмов после 1 года инкубации

Микроорганизм	Метод анализа	Результат
<i>Alcaligenes faecalis</i> 415	Максимальное значение КОЕ/мл (1 месяц)	$7,1 \pm 0,78 \times 10^7$
	КОЕ/мл	$5,09 \pm 0,56 \times 10^5$
	Общее число клеток/мл	$1,10 \pm 0,12 \times 10^8$
	% живых клеток	68,6
	% клеток формирующих колонии	0,67
<i>Proteus vulgaris</i> НХ 19222	Максимальное значение КОЕ/мл (7 дней)	$4,77 \pm 0,52 \times 10^8$
	КОЕ/мл	$2,10 \pm 0,23 \times 10^3$
	Общее число клеток/мл	$5,80 \pm 0,64 \times 10^7$
	% живых клеток	99,4
	% клеток, формирующих колонии	0,0036
<i>Enterobacter aerogenes</i> ГИСК 418	Максимальное значение КОЕ/мл (7 сут.)	$4,9 \pm 0,54 \times 10^8$
	КОЕ/мл	$2,15 \pm 0,24 \times 10^6$
	Общее число клеток/мл	$2,58 \pm 0,25 \times 10^8$
	% живых клеток	99,6
	% клеток формирующих колонии	0,84
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1954	Максимальное значение КОЕ/мл (7 сут.)	$2,35 \pm 0,26 \times 10^8$
	КОЕ/мл	$5,42 \pm 0,6 \times 10^6$
	Общее число клеток/мл	$2,76 \pm 0,3 \times 10^8$
	% живых клеток	66,4
	% клеток формирующих колонии	2,9

генетическим изменениям к питанию веществами, которые высвобождаются из лизированных клеток. В литературе для *Escherichia coli* показано, что клетки субпопуляций, образующиеся в постстационарной фазе, имеют генетические детерминанты, усиливающие метаболизм аминокислот [19]. В этих условиях микроорганизмам для восстановления способности к росту на полноценной богатой среде необходима перестройка структурных компонентов мембраны, а также, по-видимому, реверсия произошедших ранее изменений в геноме. Можно предположить, что в нашем эксперименте возникла аналогичная ситуация. Об этом, кроме того, может свидетельствовать снижение скорости роста, выражающееся в задержке появления колоний. Так, колонии *Enterobacter aerogenes* ГИСК 418 на плотной среде появлялись после засева только на 2–5 сут инкубации.

В следующих опытах мы постарались учесть возможную генетическую адаптацию популяции клеток к существованию в длительно инкубируемых культурах, а также то, что среда в таких условиях крайне бедна питательными веществами. Принимая во внимание эти факты, нами была сделана попытка реанимации некультивируемых форм путём высева на традиционный питательный бульон, разведённый в пять раз, с добавлением смеси из двадцати основных аминокислот. При указанной методике повышения высеваемости (т.е. выхода микроорганизмов из некультивируемого состояния) для четырёх исследованных видов эффект отмечен только у *Proteus vulgaris* НХ 19222. Количество культивируемых клеток этого вида достоверно увеличилось на два порядка, с  $2,10 \pm 0,23 \times 10^3$  до  $2,50 \pm 0,28 \times 10^5$ , что составляло примерно 0,1 % от общего числа живых клеток, визуализируемых с помощью микроскопа.

## Заключение

Таким образом, для ряда условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов изучена динамика изменения жизнеспособности бактерий при длительной инкубации в условиях стресса, приближенных к природным, и сделана попытка пробуждения некультивируемых клеток в шадящих условиях. Показано, что формирование некультивируемых форм происходит в ответ не только на наиболее распространённые стрессовые факторы, но и на другие условия, отличающиеся длительностью воздействия, которые можно обнаружить, например, в стоячих олиготрофных водоёмах.

## Ключевые слова:

жизнеспособность,  
некультивируемые  
формы,  
стресс,  
длительное  
культивирование

## Литература

1. Oliver J.D. The viable but nonculturable state in bacteria // J. Microbiol., 2005., V. 43, № 5, p. 93-100.
2. Aulet O. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina / Aulet O., Silva A., Fraga S.G., Pichel M., Cangemi R., Gaudio C., Porcel N., Jure M.A., de Castillo M. C., Binsztein N. // Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2007. V. 40. № 4. P. 385-390.
3. Signoretto C. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state / Signoretto C., Lleo` M.M., Tafi M.C., Canepari P. // Appl. Environ. Microbiol., 2000. V. 66. № 5. P. 1953–1959.
4. Masuda Y. Resuscitation of *Tenacibaculum* sp., the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, from the viable but non-culturable state / Masuda Y., Tajima K., Ezura Y. // Fisheries Science., 2004. V. 70. P. 277–284.
5. Bjergbæk L.A. Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water / Bjergbæk L.A., Roslev P. // J. Appl. Microbiol., 2005. V. 99. P. 1090–1098.
6. Sachidanandham R. A dormancy state in nonspore-forming bacteria / Sachidanandham R., Gin K.Y.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009. № 81. P. 927–941.
7. Ganesan B. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis* / Ganesan B., Stuart M.R., Weimer B.C. // Appl. Environ. Microbiol., 2007. V. 73. №. 8. P. 2498–2512.
8. Whitesides M.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state / Whitesides M.D., Oliver J.D. // Appl. Environ. Microbiol., 1997. V. 63. № 3. P. 1002-1005.
9. Leriche V. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment / Leriche V., Carpentier B. // J. Food Protect., 1995. V. 58. № 11. P. 1186-1191.
10. Awais R. A recombinant bacteriophage-based assay for the discriminative detection of culturable and viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 / Awais R., Fukudomi H., Miyana K., Unno H., Tanji Y. // Biotechnol. Prog., 2006. V. 22. №. 3. P. 853-859.
11. Диденко Л.В. Ультраструктура *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе обратимого перехода в покоящееся (некультивируемое) состояние в ассоциации с сине-зелеными водорослями / Л.В. Диденко, Н.Д. Константинова, Л.В. Солохина, В.И. Пушкарёва, В.Ю. Литвин // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол., 2002. № 1. С. 17-23.

12. Солохина Л.В. Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зеленых водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов / Л.В. Солохина, В.И. Пушкарева, В.Ю. Литвин // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол., 2001. № 3. С. 17-22.
13. Mulyukin A.L. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in *Azospirillum brasilense* / Mulyukin A.L., Suzina N.E., Pogorelova A.Yu., Antonyuk L.P., Duda V.I., El-Registan G.I. // Microbiology, 2009. V. 78. №. 1. P. 33–41.
14. Finkel S.E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. / Nature Rev. Microbial. 2006. V. 4. P. 113-120.
15. Albertson H.N. Starvation-induced modulations in binding protein-dependent glucose transport by the marine *Vibrio* sp. S14 / Albertson H.N., Nyström N., Kjelleberg S. // FEMS Microbiol. Let., 2005. V. 70. № 2. P. 205–209.
16. Postgate J.R. Accelerated death of *Aerobacter aerogenes* starved in the presence of growth-limiting substrates / Postgate J.R., Hunter J.R. // J. Gen. Microbiol., 1964. V. 34. P. 459-473.
17. Strange R.E. Substrate – accelerated death' of *Aerobacter aerogenes* / Strange R.E., Dark F.A. // J. Gen. Microbiol., 1965. V. 39. P. 215-228.
18. Мулюкин А.Л. Покоящиеся формы *Micrococcus luteus* и *Arthrobacter globiformis*, не прорастающие на стандартных средах // А.Л. Мулюкин, Е.В. Дёмкина, Н.А. Кряжевских, Н.Е. Сузина, Л.И. Воробьева, В.И. Дуда, В.Ф. Гальченко, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология, 2009. Т. 78. № 4. С. 456-468.
19. Vulić M. *Evolutionary cheating* in *Escherichia coli* Stationary phase cultures / Vulić M., Kolter R. // Genetics, 2001. V. 158. P. 519–526.



Yu.D. Pakhomov, L.P. Blinkova, O.V. Nikiforova

## VIABILITY OF OPPORTUNISTIC AND SAPROTROPHIC MICROORGANISMS UNDER STRESS CONDITIONS

**A** dynamics of viability conservation of opportunistic and saprotrophic microorganisms in nitrogen limited artificial habitat was studied. It was shown that taxonomic status influences on dynamics peculiarities of bacterial number and formation of nonculturable forms takes place during long-term incubation.

**Key words:** viability, nonculturable forms, stress, long-term incubation