

НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ПРИРОДЕ, ИНДУКТОРЫ НЕ КУЛЬТИВИРУЕМОГО СОСТОЯНИЯ И РЕВЕРСИИ

Соколенко А.В.
ФГУЗ РостНИПЧИ

В обзоре литературы анализируются данные последнего десятилетия по изучению некультивируемых форм бактерий. Приведены факты обнаружения НФ в водных и почвенных объектах окружающей среды, в продуктах питания, в организме человека и животных. Рассмотрены физические, химические и биотические индукторы некультивируемого состояния, подавляющее большинство из которых является источником свободных радикалов. Приведены данные об индукции реверсии НФ, в том числе в присутствии антиоксидантов. Анализ данных литературы позволяет высказать мнение о том, что НФ имеют социально-экономическое и санитарно-гигиеническое значение.

Некультивируемыми (НФ) называют такие формы микроорганизмов, которые в ответ на действие неблагоприятных факторов прекращают рост на питательных средах, но сохраняют жизнеспособность, а при улучшении условий культивирования возобновляют пролиферацию. Некультивируемое состояние (НС) обнаружено у многих патогенных видов. В связи с тем, что рутинные бактериологические методы не эффективны для обнаружения НФ, истинные размеры распространения феномена в объектах окружающей среды остаются мало изученными. С целью решения вопроса о значении феномена в эпидемиологии интенсивно изучаются индукторы НС и реверсии. Ежегодно публикуется большое количество работ на эту тему. Анализ литературы посвящен данный обзор.

В настоящее время известно около 45 видов микроорганизмов, относящихся к 30 родам, у которых обнаружено НС. 30 видов патогенны для человека, 15 видов условно-патогенны или являются эубионтами человека, животных или растений. Среди бактерий, у которых обнаружено НС, есть возбудители таких грозных инфекций, как чума [9], холера [17], тулеремии [3], легионеллез [32]. Более 60% видов, образующих НФ, грамотрицательны. Около 40% составляют бактерии, относящиеся к трем другим отделам царства Procarioratae: грамположительные бактерии, микоплазмы и архебактерии. Эти факты указывают на универсальность некультивируемого состояния как общебиологического явления, расширяют первоначально сложившееся представление о спороподобном состоянии НФ и наглядно демонстрируют широкое распространение феномена в природе.

Распространение НФ в природе. Данные литературы о скрининговых исследованиях окружающей среды, клинического материала на предмет присутствия в них НФ немногочисленны и противоречивы. Для выявления НФ в организме или клиническом материале наиболее широко используются молекулярно-генетические методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее различные модификации, лигазная цепная реакция (ЛЦР), техника гибридизации тотальной клеточной РНК, ПЦР с обратной транскриптазой. Преимущество указанных методов является их высокая чувствительность и специфичность. Белки-шапероны, которые связываются с ДНК в процессе перехода в НС, могут препятствовать выявлению НФ в ПЦР [35].

В водных объектах окружающей среды НФ можно обнаружить с помощью флуоресцирующих моноклональных антител (МКА), что позволяет определить видовую принадлежность бактерий, но неинформативно в отношении жизнеспособности клеток. Применение магнитных сорбентов повышает чувствительность метода, а использование набора специфических моноклональных антител к стабильным и лабильным эпитопам липополисахарида дает возможность судить о потенциальной жизнеспособности НФ [7].

Перечисленные методы позволили выявить присутствие НФ патогенных бактерий в организме человека и животных [27], [18], в продуктах питания [23], [16], [20], в объектах окружающей среды: в воде [33], [15], в почве [1].

Экспериментальные и гипотетические сведения об обнаружении НФ в окружающей среде дополняют работы об индукторах НС и реверсии.

Индукторы НС. При создании экспериментальных систем, получивших название микрокосмов, моделируются факторы естественной среды обитания (температура, вода различного состава и солености, аэрация, видимый свет). Высказано предположение, что температура +0,5-+7°C является основным фактором, индуцирующим образование НФ, как это было показано для *Campylobacter jejuni* [19], *V. cholerae* [6]. Переход в НС зависит не только от температуры культивирования, но и от вида микроорганизма, его физиологического состояния, сопутствующих факторов. *V. cholerae* eltor переходили в НС при благоприятной температуре (25°C), но в присутствии высокой концентрации солей [10].

Даже незначительные вариации химического состава среды при оптимальной температуре могут индуцировать переход в НС. Так, например, при сравнении двух образцов питьевой воды, один из которых индуцировал образование НФ *Agrobacterium tumefaciens* и *Rhizobium meliloti*, было обнаружено, что образцы совпадали по 39 химическим элементам и отличались только содержанием меди. В пробе, которая положительно влияла на образование НФ, концентрация меди была в несколько раз выше [14].

Среди химических индукторов НС в отдельную группу следует выделить антибиотики, так как эти сведения имеют практическое значение. В модельных экспериментах *in vivo* показан переход в НФ *E. coli* в присутствии ципрофлоксацина [22], *M. tuberculosis* - рифализила в комбинации с изониазидом, [30]. Пролиферация может быть обратимо утрачена под влиянием концентраций хлора, применяемых для обеззараживания воды, в связи с чем предлагается пересмотреть бактериологические критерии оценки качества питьевой воды [29].

Приведенные сведения указывают на необходимость коррекции традиционных схем антибиотикотерапии с учетом новых знаний об индукции НС, на необходимость проведения лечения под контролем молекулярно-генетических методов диагностики. Решению этой задачи способствует выявление общих и видоспецифических маркеров НС. Получены первые обнадеживающие результаты в этом направлении. Протеомный анализ *E. faecalis* в НС, вегетативных клеток, и клеток, находящихся в состоянии стресса (старвирующих) показал существенное отличие их белковых профилей. Обнаружена значительная экспрессия двух стрессовых белков с высокой молекулярной массой (GroEL и DnaK). Экспрессия генов фруктозо-дифосфат альдолазы и EF-Ts наблюдалась через 14 суток НС, РНК EF-Tu присутствовала только в переходных популяциях, ген *rpf5* обнаруживался в

течение трех месяцев НС и был использован в качестве положительного контроля [21]. Приведенные данные подтверждают наличие специфических маркеров НС, которые могут использоваться для разработки диагностических тестов.

Не менее значимыми, чем химические, являются физические факторы индукции НС. Сообщается о влиянии γ -лучей [28], аэрации [12], кратковременного воздействия солнечной радиации в естественных условиях и в экспериментальных микрокосмах [25]. Чередование световой и темновой фазы индуцировало переход в НС *S. typhimurium* [5].

Долгое время биологические индукторы НС оставались не известны. Но появились немногочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие о важной роли биотических факторов в образовании НФ. *L. monocytogenes* в ассоциации с зелеными водорослями или в присутствии их экзометаболитов значительно быстрее переходили в НС, чем в контроле [2]. Синезеленые водоросли и их экзометаболиты ускоряли образование НФ *Y. pseudotuberculosis* [8]. В экспериментах живые клетки *Scenedesmus quadricauda* и их экзометаболитов инициировали образование НФ *V. cholerae* O1 и O139. Разрушенные зеленые водоросли, культура *Spirulina platensis*, напротив, продлевали вегетативную фазу холерных вибрионов [11]. Экспериментальное получение НФ бактерий в микрокосмах, содержащие биотические компоненты, подтверждает гипотезу о возможности сохранения различных возбудителей в объектах окружающей среды, в том числе, в ассоциации с фито- и зообионтами [31].

Поиск индукторов НС ведется параллельно с поиском стимуляторов реверсии, так как именно восстановление культивируемости является бесспорным доказательством жизнеспособности НФ.

Индукторы реверсии НФ. Накоплен экспериментальный материал, демонстрирующий способность НФ возобновлять рост в благоприятных условиях. Условия реверсии включают использование различных индукторов реверсии (физических, химических, биотических), но могут заключаться и только в отмене неблагоприятных воздействий, как, например, показано для микроорганизмов, подвергнутых воздействию гамма-лучей [28].

Среди физических факторов наиболее часто к реверсии *in vitro* приводит повышение температуры с 0,5-6°C до 20-22° С или до 37°C, кратковременный прогрев до 45°C. Быстрое увеличение КОЕ в микрокосмах рассматривается как подтверждение реверсии, а не возобновление роста нескольких выживших клеток [34].

В ряде случаев оптимизацией температуры не удается стимулировать реверсию. *V. parahaemolyticus* реверсирует при повышении температуры до 25°C в сочетании с использованием минимальной солевой среды. НФ *V. harveyi* and *V. fischeri* возобновляют рост при добавлении органических или неорганических источников азота, углерода или деструкторов перекиси водорода [29].

Среди химических индукторов реверсии НФ известна группа соединений, разрушающих перекись водорода (антиоксиданты). К таким соединениям относят пируват натрия, каталазу, витамин Е [24]. Их вводят непосредственно в микрокосмы в качестве протекторов или в состав питательных сред, предназначенных для реверсии. Это позволило получить реверсию *E. coli*, *V. parahaemolyticus*. На эффективность реверсии влияет химический состав среды и ее агрегатное состояние (предпочтительнее жидкие питательные среды) [13].

Для реверсии НФ в питательные среды добавляют ростовые биотические факторы: фетальную сыворотку, супернатант растущей культуры или выделенный из нее рекомбинантный белок Rpf, [9], [13], [26]. Сообщается о влиянии цитокинов на реверсию НФ. Некультивируемые вирулентные штаммы сальмонелл реверсировали *in vitro* и *in vivo* в присутствии фактора некроза опухоли (ФНО) [4].

Иногда единственно эффективный способ реверсии - это пассаж через восприимчивый организм. Так, например, рекультивация НФ патогенных штаммов сальмонелл при введении в организм чувствительных животных всегда приводила к положительному результату. Параллельная рекультивация тех же суспензий *in vitro* не давала положительных результатов [4].

Истинность реверсии, а не возобновление роста выживших клеток, остается наиболее дискуссионным вопросом. В качестве доказательства реверсии используют рост из небольшого инокулюма. Рост культуры из маленького количества у вегетативных клеток происходит гораздо медленнее, чем в вариантах с НФ. [13].

Таким образом, анализ данных литературы показал широкое распространение феномена некультивируемости в природе. К образованию НФ могут приводить разнообразные воздействия, как биотические, так и абиотические. Огромное влияние имеют факторы окружающей среды: температура, солнечная радиация, химический состав воды, наличие фито- и зообионтов. Характер и интенсивность этих воздействий определяют возможность реверсии НФ. Среди индукторов НС практически все абиотические факторы являются источниками свободных радикалов, которые обладают цитотоксическим действием. Вероятно, этим объясняется положительное действие анти-

оксидантов на возобновление деления. Иногда для реверсии требуется не только отмена неблагоприятного воздействия и добавление нейтрализаторов свободных радикалов, но и использование специфических индукторов реверсии: цитокинов, ростовых факторов. Одной из причин реверсии НФ бактерий в макроорганизме также могут быть антиоксидантные свойства его ферментов и наличие цитокинов. Но биотические индукторы реверсии имеют множественный характер стимуляции. Широкое распространение НФ в природе, способность патогенных и условно-патогенных бактерий переходить в НС, индукция НФ антибиотиками обуславливают социально-экономическое и санитарно-гигиеническое значение некультивируемых бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвин В.Ю. Механизм устойчивого сохранения возбудителя чумы в окружающей среде (новые факты и гипотезы). Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997, №4: 26-31.
2. Пушкарева В.И., Емельяненко Е.Н., Диденко Л.В. и др. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1998, №5: 9-13.
3. Романова Л.В., Мишанькин Б.Н., Пичурина Н.Л. и др. некультивируемые формы *Francisella tularensis*. Журн. Микробиол. 2000, №2, С.11-15.
4. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий. Вестник РАМН., 2000, №1: 13-18.
5. Романова Ю.М., Чегалева Е.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса. Молек. генет., микробиол. и вирусол. 1998, №3: 3-8.
6. Соколенко А.В. Морфология, ультраструктура, метаболизм некультивируемых форм холерных вибрионов. Автореф..... канд. биол. наук. 2000. Ростов-на-Дону, 21 с.
7. Соколенко А.В., Алексеева Л.П., Ломов Ю.М., Чемисова О.С. Изучение взаимодействия некультивируемых форм холерных вибрионов с моноклональными антителами к липополисахариду O1 и O1 серогрупп. Биотехнология. 2004, №3: 87-92.
8. Солохина Л.В., Пушкарева В.И., Литвин В.Ю. Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зеленых водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001, №3: 17-22.
9. Сучков Ю.Г., Худяков И.В., Емельяненко Е.Н. О возможности сохранения возбудителя чумы в почве в покоящейся (некультивируемой) форме. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997, №4: 42-46.
10. Тафельштейн Э.А., Голубинский Е.П., Марамович А.С., и др. Экспериментальное полу-

чение некультивируемых форм *Vibrio cholerae* eltor и характеристика их биологических свойств. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004, N1: 13-18.

11. Титова С.В., Соколенко А.В., Николеишвили Л.Р. и др. Образование некультивируемых форм холерных вибрионов при совместном культивировании с одноклеточными водорослями и продуктами их жизнедеятельности. Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник материалов проблемной комиссии. Ростов-на-Дону, 2004, Выпуск № 17: 37-41.

12. Четина Е.В. Влияние некоторых физиологических и генетических факторов на процесс перехода энтеротоксигенных штаммов *Escherichia coli* в некультивируемое состояние. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1997, №1: 8-14.

13. Шлеева М.О., Мукамолова Г.В., Телков М.В. и др. Образование «некультивируемых» клеток *Mycobacterium tuberculosis* и их оживление. Микробиология, 2003, 72(1): 76-83.

14. Alexander E, Pham D, Steck TR. The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65(8): 3754-6.

15. Binsztein N, Costagliola MC, Pichel M et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. Appl Environ Microbiol. 2004 Dec;70(12):7481-6.

16. Campbell M.S., Wright A.C. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69(12):7137-44.

17. Colwell R.R., Bryton P. R., Grimes D.J. et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for the release of genetically engineered microorganisms. // Bio/ Technology. – 1985. – V.3. – P.817-820

18. Curras M., Magarinos B., Toranzo A.E., Romalde J.L. Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. Dis. Aquat Organ. 2002, 52(2):129-36.

19. Ekweozor C.C., Nwoguh C.E., Barer M.R. Transient increases in colony counts observed in declining populations of *Campylobacter jejuni* held at low temperature. FEMS Microbiol. Lett. 1998, 158 (2):267-72.

20. T.S., Sorensen A., Attfield P.V. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68(4):1988-92.

21. Heim S., Lleo M.M., Bonato B. et al. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. J. Bacteriol. 2002, 184(23):6739-45.

22. Krausse R., Lorentzen T., Erttmann M., Ullmann U. Prevalence of *Helicobacter pylori* in gastrointestinal disorders and concentrations of ciprofloxacin in serum and gastric mucosa. Zentral. Bakteriол. 1993, 280(1-2): 286-96.

23. 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? Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66 (12): 5536-9.

24. Mizunoe Y., Wai S.N., Ishikawa T. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 186(1): 115-120.

25. Muela A., Garcia-Bringas J.M., Arana I.I., Barcina I.I. The Effect of Simulated Solar Radiation on *Escherichia coli*: The Relative Roles of UV-B, UV-A, and Photosynthetically Active Radiation. Microb. Ecol. 2000, 39(1):65-71.

26. Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B. Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase. Antonie Van Leeuwenhoek. 1995; 67(3): 289-95.

27. Palmu A.A., Saukkoriipi P.A., Lahdenkari M. et al. Does the presence of pneumococcal DNA in middle-ear fluid indicate pneumococcal etiology in acute otitis media? J. Infect. Dis. 2004, 189(5): 775-84.

28. Pitonzo B.J., Amy P.S., Rudin M. Resuscitation of microorganisms after gamma irradiation. Radiat. Res. 1999, 152(1): 71-75.

29. Rockabrand D., Austin T., Kaiser R., Blum P. Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling: does chlorination kill coliforms in municipal effluent? Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65(9):4181-4188.

30. Shoen C.M., Chase S.E., De Stefano M.S. Evaluation of rifalazil in long-term treatment regimens for tuberculosis in mice. Antimicrob. Agents. Chemother. 2000, 44(6):1458-1462.

31. Signoretto C., Burlacchini G., Lleo M. M. et al. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the Nonculturable State to Plankton Is the Main Mechanism Responsible for Persistence of This Bacterium in both Lake and Seawater. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70(11): 6892-6.

32. Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol. 1997 May; 63(5):2047-53.

33. Stinear T., Davies J.K., Jenkin G.A., et al. Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in Southeast Australia in

which it is endemic with sequence capture-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66(8): 3206-3213.

34. Wai S.N., Moriya T., Kondo K. et al. Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from viable but nonculturable state by heart shock. FEMS Microbiol. Lett. 1996, 136(2):187-9.

35. Warner J.M., Oliver J.D. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but non-cultureable *Vibrio vulnificus* cells. Appl. Environ. Microbiol. 1998. V.64., #8., P:3025-8.

**UNCULTIVATED FORMS OF BACTERIA: SPREAD IN NATURE, INDUCTORS
OF UNCULTIVATED CONDITION AND BACKWARD MUTATION.**

Sokolenko A.V.
FGUZ RostNIPChI

Last ten years dates of research of noncultureable forms analyzed in this review. Spreading of noncultureable forms in the environment, food, human and animals, plants are listed. The divers chemical, physical and biological factors which induce this state are described. Most of these factors are sours of citotoxic free radicals. The analysis literature date allows to voice opinion that noncultureable forms have social, economic and sanitary-hygienic importance.