

УДК 628.1+579.22

**Е.С. Болгова, М.Н. Сапрыкина, В.В. Гончарук**

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ *ESCHERICHIA COLI*  
В ЖИЗНЕСПОСОБНОМ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОМ  
СОСТОЯНИИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ХЛОРА**

Институт коллоидной химии и химии воды  
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев  
emeryy@bigmir.net

*Исследовано влияние NaOCl на клетки Escherichia coli с целью обнаружения их жизнеспособного некультурального состояния. Определена оптимальная температура перехода клеток из некультурального состояния в культуральное.*

**Ключевые слова:** водная среда, жизнеспособное некультуральное состояние, питательные среды, стресс-фактор, *Escherichia coli*.

**Введение.** Несмотря на предварительную очистку и обеззараживание воды, количество заболеваний, передающихся водным путем, продолжает расти. Такая тенденция, с одной стороны, связана с возрастанием устойчивости микроорганизмов к существующим методам дезинфекции, а с другой – с отсутствием эффективного метода определения их жизнеспособности.

Исследования последнего десятилетия посвящены изучению такого феноменального явления, как способность неспорозных бактерий переходить от вегетативного (культурального) состояния к некультуральному [1]. Термин "жизнеспособные, но некультуральные" микроорганизмы был введен для бактерий, которые проявляют метаболическую активность, однако не растут на общепринятых бактериологических средах [2, 3].

Образование жизнеспособного некультурального состояния (ЖНС) клеток происходит в виде реакции на какую-либо форму естественного стресса, например, голодание, попадание в неблагоприятный диапазон температур, высушивание и др. [4]. Кроме того,

© Е.С. Болгова, М.Н. Сапрыкина, В.В. Гончарук, 2015

установлено, что антимикробные агенты (пастеризация, хлорирование, УФ-излучение и др.) также могут привести к появлению ЖНС [5, 6]. В таком состоянии бактерии способны находиться длительное время, при этом сохраняя свой патогенный потенциал, в том числе способность к токсинообразованию [7].

При попадании в благоприятную среду или под воздействием определенных факторов указанные бактерии снова переходят из ЖНС в культурабельное состояние. Присутствие в воде патогенных микроорганизмов в ЖНС несет опасность недооценить их количество и получить ложноотрицательные результаты при лабораторных исследованиях стандартизированными методами [8].

Известно, что многочисленные бактерии, такие, как *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* и *Campylobacter jejuni*, могут переходить в ЖНС под воздействием неблагоприятных условий окружающей среды [4].

Однако, несмотря на широкое распространение в окружающей среде жизнеспособных некультурабельных микроорганизмов, в настоящее время при оценке качества воды по микробиологическим показателям, согласно ДСанПиН 2.2.4-171-10, определяют только жизнеспособные клетки *E. coli*. При этом не учитывается факт воздействия хлора на появление жизнеспособных некультурабельных клеток, которые при определенных условиях могут вызывать вспышки инфекционных заболеваний, что уже имело место в Новосибирске (Россия), когда вода, соответствовавшая ГОСТу 2874-82, привела к появлению ряда заболеваний у населения города [9].

В связи с этим возникает необходимость проведения цикла исследований по определению ЖНС культуры *E. coli* – как основного санитарно-показательного микроорганизма, используемого для оценки безопасности питьевой воды, под воздействием хлора.

**Методика эксперимента.** В работе использовали бактериальные культуры *E. coli* К-12 (полученной в Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины) и *E. coli* 1257 (полученной в НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, Россия).

Штаммы *E. coli* инкубировали в питательном бульоне (ПБ) в течение 24 ч при 37°C. После этого полученный осадок в результате центрифугирования при 7000 g отмывали трижды в изотоническом растворе хлорида натрия и ресуспендировали в том же растворе до плотности  $1 \cdot 10^8$  КОЕ в 1 см<sup>3</sup>.

Выживаемость микроорганизмов после воздействия на них стресс-фактора (NaOCl) определяли по наличию КОЕ при посеве отобранных проб воды на агаризированную среду Эндо. Влияние NaOCl исследовали в диапазоне концентраций от 0,1 до 5 мг/дм<sup>3</sup>. Для этого в стерильные флаконы, содержащие 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, добавляли такое количество свежеприготовленной культуры *E. coli*, чтобы нагрузка в рабочем растворе (р/р) составляла 1·10<sup>4</sup> – 1·10<sup>6</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>, а также вносили определенное количество NaOCl. Пробы отбирали через 10; 30 и 60 мин. По истечении этого времени свободный хлор в р/ре связывали тиосульфатом натрия (0,1 М Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O). Пробы высевали на чашки Петри со средой Эндо и помещали в термостат при 37°С. Через 18 – 24 ч проводили подсчет колоний. Результат выражали как соотношение логарифма концентрации тест-микроорганизма, который остался в растворе после обработки гипохлоритом натрия ( $N_t$ ), к исходному его количеству ( $N_0$ ).

С целью обнаружения клеток *E. coli* в некультурабельном состоянии проведены исследования их реактивации, для чего р/р вносили в ПБ (оптимальная среда размножения и роста *E. coli*) и минимальную синтетическую среду М-9, а также изучали влияние температуры на культуру в ЖНС.

Рабочий раствор отбирали в заранее подготовленные пробирки, содержащие среды М-9 или ПБ в соотношении 1:10 и тщательно перемешивали. Эти пробы помещали в термостат при 37°С и высевали на среду Эндо через 18 – 24 ч. При определении кинетики роста жизнеспособных некультурабельных клеток *E. coli* в течение 4 – 5 сут р/р вносили в пробирки со средой М-9 или ПБ и также помещали в термостат. После чего их высевали на среду Эндо.

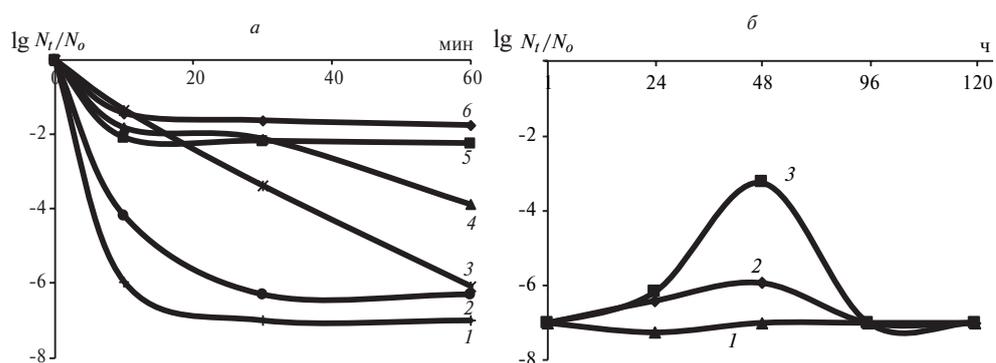
Кроме того, оценено влияние температуры (5; 10 – 15; 37°С) на восстановление и рост клеток *E. coli* 1257, находившихся в жизнеспособном некультурабельном состоянии.

**Результаты и их обсуждение.** Опыты по определению выживаемости бактерий при воздействии на них NaOCl показали, что антимикробный эффект возрастает с повышением концентрации гипохлорита натрия, что вполне закономерно, и зависит также от степени заражения воды бактериальной культурой. Проведен выбор оптимальных концентраций гипохлорита натрия, обеспечивающих полное обеззараживание воды от культуры *E. coli*.

Установлено, что концентрации NaOCl в диапазоне 0,1 – 1 мг/дм<sup>3</sup>, при исходной нагрузке *E. coli* 1257 1·10<sup>6</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>, не приводят к полному

обеззараживанию воды, а только частично снижают степень загрязнения, тогда как концентрации  $\text{NaOCl}$  2 – 5 мг/дм<sup>3</sup> способствуют полному обеззараживанию воды от указанной культуры (рисунок, а).

Аналогичные эксперименты были проведены с культурой *E. coli* К-12, которые показали, что она обладает схожей степенью устойчивости при воздействии на нее гипохлоритом натрия в аналогичном диапазоне концентраций.



*Влияние NaOCl на культуру E. coli (а) при концентрации, мг/дм<sup>3</sup>: 5(1); 3(2); 2(3); 1(4); 0,3(5); 0,1(6). Кинетика восстановления культуры E. coli (б) после контакта с NaOCl при концентрации 2 мг/дм<sup>3</sup> (1 – r/p+ПБ; 2 – r/p; 3 – r/p+M-9).*

Реактивацию клеток *E. coli* 1257 в нормальное культурабельное состояние проводили путем ежесуточного внесения в течение последующего периода рабочего раствора, содержащего инактивированные клетки *E. coli*, в среду М-9 или ПБ с последующим посевом на среду Эндо.

На рисунке, б показано, что клетки в r/pe после устранения стресс-фактора (после связывания хлора с концентрацией 2 мг/дм<sup>3</sup> тиосульфатом натрия) и под воздействием благоприятной температуры (37°C) начинают восстанавливаться уже через одни сутки, что свидетельствует о переходе культуры *E. coli* 1257 при воздействии на нее NaOCl в жизнеспособное некультурабельное состояние. Через 48 ч наблюдается пик восстановления культуры в ПБ, М-9 и r/pe, который постепенно снижается с увеличением продолжительности термостатирования. На четвертые сутки происходит значительное снижение роста культуры. Такой эффект, очевидно, связан с недостаточным количеством питательных веществ в рабочем растворе (дистиллированная вода), из которого ежесуточно проводили посева в жидкие питательные среды. Аналогичная ситуация наблюдалась для NaOCl с концентрацией

3 мг/дм<sup>3</sup>. Таким образом, при воздействии NaOCl с концентрацией 2 – 3 мг/дм<sup>3</sup> на *E. coli* 1257 образуются клетки в ЖНС, которые не определяются общепринятыми методами, однако при попадании в благоприятные условия способны возвращаться в культурабельное состояние. Установлено, что концентрация NaOCl, составляющая 5 мг/дм<sup>3</sup>, не способствует образованию ЖНС клеток *E. coli* 1257.

Показано, что в минимальной питательной среде М-9 культура *E. coli* 1257 восстанавливается примерно на три – четыре порядка выше, чем в р/ре, т.е. именно состав среды М-9 способствует более быстрому восстановлению и росту бактериальных клеток данной культуры. Вероятно, такая тенденция связана с наличием жизненно необходимых ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> в среде М-9 для нормального функционирования клетки, поскольку известно, что они являются кофакторами многих ферментов. Также установлено, что кальций снижает мембранную проницаемость клетки для вредных веществ, а клетка, ослабленная действием стресс-фактора, пытается максимально быстро восстановиться [10].

Кроме того, было оценено влияние температуры на восстановление и рост клеток *E. coli* 1257, находящихся в жизнеспособном некультурабельном состоянии.

Полученные данные показали, что при 37°С культура восстанавливается лучше, чем при комнатной и низкой температурах (таблица). Очевидно, это связано с тем, что такая температура является оптимальной для роста и развития культурабельных клеток *E. coli* 1257.

Известно, что первичное взаимодействие культуры со стресс-фактором влияет на увеличение устойчивости клетки при последующем их контакте с тем же фактором, за счет преобразований, происходящих в белковых структурах клетки [10].

*Влияние температуры на кинетику роста E. coli 1257 (КОЕ/см<sup>3</sup>)  
после контакта с NaOCl*

Пробы	Температура, °С								
	37			10 – 15			5		
	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
р/р	2	230	10	0	0	0	1	0	0
р/р + М-9	30	2200	160	0	0	0	0	0	0
р/р + ПБ	0	10	0	0	0	0	0	0	0

Поскольку *E. coli*, выделенная из водораспределительных сетей, не один раз подвергается действию активного хлора, то целесообразно было проверить наличие повышения ее устойчивости к действию NaOCl. С этой целью проведены эксперименты по инаktivации клеток *E. coli* 1257, находящихся в ЖНС. Для этого культуру подвергали воздействию NaOCl при концентрациях 2 и 3 мг/дм<sup>3</sup>, и сравнивали полученную степень ее инаktivации в ЖНС с дочерними клетками. Показано, что клетки не стали более устойчивые к данному стресс-фактору, чем исходные культурабельные клетки *E. coli* 1257. Так, при концентрации гипохлорита натрия 2 мг/дм<sup>3</sup> степень обеззараживания исходной культуры *E. coli* 1257 составляла 99,99%, тогда как для *E. coli*, ранее подвергавшейся действию активного хлора и находящейся в ЖНС, она составляла 99,98% после 60 мин контакта. Таким образом, значительного увеличения резистентности культуры, перешедшей в ЖНС, не выявлено, что может являться косвенным доказательством отсутствия генетических изменений в клетке.

**Выводы.** На основании проведенных исследований установлено, что при воздействии NaOCl с концентрациями 2 – 3 мг/дм<sup>3</sup> на культуру *E. coli* 1257 в ЖНС образуются клетки, которые не определяются общепринятыми методами, однако при попадании в оптимальные условия способны возвращаться в культурабельное состояние уже через одни сутки.

Показано, что среда М-9 способствует более быстрому восстановлению и росту бактериальных клеток *E. coli* 1257 по сравнению с ПБ. Максимальный эффект восстановления культуры наблюдается при 0,01 М CaCl<sub>2</sub> и 0,004 М MgSO<sub>4</sub> в среде М-9 и температуре 37°С.

Выделенная культура *E. coli* 1257, которая находилась в жизнеспособном некультурабельном состоянии, не стала более устойчивой к NaOCl (2 и 3 мг/дм<sup>3</sup>), что, вероятно, свидетельствует об отсутствии генетических изменений в клетке при воздействии на нее стресс-фактора.

Таким образом, *E. coli* способна переходить в ЖНС под действием стресс-фактора – NaOCl. Установлено, что для ее обнаружения целесообразно применять питательную среду М-9 перед посевом культуры на стандартную среду Эндо. Полученные данные свидетельствуют о необходимости внесения изменений в методику определения качества воды, поступающей к потребителю, а также разработки новых подходов ее обеззараживания.

**Резюме.** Досліджено вплив NaOCl на клітини *Escherichia coli* з метою виявлення їх життєздатного некультивурубельного стану. Визначено оптимальну температуру переходу клітин з життєздатного некультивурубельного стану в культивурубельний.

*E.S. Bolgova, M.M. Saprykina, V.V. Goncharuk*

**IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS  
IN A VIABLE BUT NONCULTURABLE STATE  
UNDER THE INFLUENCE OF CHLORINE**

Summary

The influence of NaOCl on *Escherichia coli* cells is investigated with the purpose of detection their viable but nonculturable state. The optimal temperature of the transition of cells from viable but nonculturable state in culturable state is determined.

Список использованной литературы

- [1] Прокопов В.О. // Инфекційні хвороби. – 1998. – №1. – С. 33 – 38.
- [2] Colwell R.R. // Biotechnol. – 1996. – IX. – P. 220 – 233.
- [3] Liu Y., Gilchrist A., Zhang J. // Appl. and Environ. Microbiol. – 2008. – March. – P. 1502 – 1507.
- [4] Юдин И.П. // Анналы Мечников. ин-та. – 2007. – №3. – С. 8 – 16.
- [5] Dukan S., Levi Y., Touat D. // Appl. and Environ. Microbiol. – 1997. – November. – P. 4204 – 4209.
- [6] Oliver J.D. // J. Microbiol. – 2005. – February. – P. 93 – 100.
- [7] Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D. // Frontiers in Microbiol. – 2014. – 5, Article 258. – P. 1 – 20.
- [8] Воронкіна І.А. // Аналі Мечніков. ін-ту. – 2006. – № 3. – С. 56 – 60.
- [9] Мокиєнко А.В.// Вода: гігієна і екологія.– 2013. – 1, № 1. – С. 20 – 34.
- [10] Zhe D., Nandakumar R., Nickerson K. W., Xu Li. // Water Res. – 2015. – 69. – P. 110 – 119.

Поступила в редакцію 20.05.2015 г.