

ВПЛИВ ПОЄДНАНИХ АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ВЕГЕТАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Деркач С.А., Носатенко А.І., Крилова І.А., Габишева Л.С., Давиденко М.Б., Строга О.І.,
Юдин І.П., Літкевич Г.Н.

Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України

Принципову новизну і значимість мають наукові дослідження останніх років, присвячені проблемі існування неспороздатних бактерій у некультурабельному стані (НС).

Останнім називають стан бактеріальних клітин, що зберігають метаболічну активність, але не здатні до стабільного клітинного поділу, необхідного для росту на живильних середовищах, зазвичай використовуваних для їх культивування [1, 2].

Вже накопичено досить велику кількість експериментальних даних з цієї проблеми, але й сьогодні ще залишаються не визначеними конкретні параметри умов, або їх комбінації, що ініціюють перехід бактерій у НС і їх рекультивацію.

Одним із основних факторів, що забезпечують тривалий термін вегетативного стану бактерій є наявність адекватного середовища. Добре відомо, що для бактерій роду *Salmonella* таким середовищем може служити вода, молоко та різні харчові продукти.

З іншого боку, є наукові повідомлення, що саме несприятливі зміни складу середовища (відсутність тих чи інших складових або збільшення вмісту шкідливих речовин, солей, тощо) може бути фактором переходу сальмонел до НС-некультивуючого стану [3 - 8].

НС є невід'ємною частиною екології бактерій, а виявлення механізмів і факторів індукції некультивуючих форм (НФ) бактерій є надзвичайно актуальним.

Метою даного дослідження було визначення впливу кількох поєднаних абіотичних факторів навколишнього середовища на життєздатність сальмонел та можливість їх переходу до некультивуючого стану.

Об'єктом дослідження служили музейні штами *Salmonella typhimurium*. Культуру сальмонел у стаціонарній фазі росту засівали в мікрокосми з різними зразками „голодного середовища” та культивували при двох режимах: в термостаті при температурі +37 °С та на світлі при кімнатній температурі (від +18 до +22 °С).

Кількісний підрахунок вирослих колоній проводили на першому місяці один раз на тиждень, потім один раз в десять – п'ятнадцять діб. Для цього з мікрокосм робили висіви на тверді живильні середовища – Ендо та ВСА (вісмут сульфідний агар) по 1-ому мл на чашку Петрі та підраховували КУО в 1-ому мл. Колонії, що виросли, ідентифікували морфологічними, біохімічними та серологічними методами, аглютинуючи з типоспецифічними сальмонельозними сироватками. Наявність некультурабельних штамів виявляли за допомогою ПЛР-полімеразноланцюгової реакції.

ПЛР проводили на базі клініко-діагностичної лабораторії Харківського міського клінічного пологового будинку. Для ПЛР використовували наступні обладнання:

- ампліфікатор „Gene Amp PCR System 2400” фірми “Perkin Elmer”, США;
- ламінований шкаф Holten PSR з вмонтованою УФ лампою, Голландія;
- центрифуга лабораторна А-14 JDAN (Франція) і лабораторний PSR комплекс „Біокм” (Росія);
- термостат 24-15;
- термостат SC-20 – охолоджувач проб;
- центрифуга Вортекс;
- насос перистальтичний з колбою-ловушкою;

- камера для горизонтального електрофорезу в агарозному гелі;
- джерело постійного току НИП-300;
- транс іомінатор UVI-1;
- набір автоматичних піпеток перемінного об'єму "Biohit".

Для постановки ПЛР використовували набори реактивів фірми „АмплиСенс-100”, для ампліфікації специфічної ділянки ДНК 225 п.н. гену білка мікроорганізмів роду *Salmonella* (ЦНП епідеміології, Москва, Росія). Детекцію продуктів ПЛР проводили електрофоретичним розділюванням в 2%-ному агарозному гелі з бромід етіділом з використанням трис-боратного електрофорезного буферу. Перегляд гелів проводили на трансільюмінаторі.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням параметричного критерія Стьюдента та методом варіаційної статистики [9].

Водопровідна вода в одному випадку була дехлорованою (відстоюванням у відкритій космі з періодичним стряхуванням на протязі семи діб), у другому - бралась відразу з крану (при цьому залишок хлору був 0,5 %).

При культивуванні штамів сальмонел у бідистильованій воді з рН = 7,0 та дехлорованій водопровідній воді при умовах експозиції у термостаті при температурі + 37 °С їх культурабельність зберігалась на протязі дев'яти – дванадцяти місяців, а на світлі при кімнатній температурі (від +18 °С до +22 °С) – трьох – шести місяців.

У свіжовзятій (хлорованій) воді культурабельність штамів сальмонел зникала на протязі 1 – 3-х діб, незалежно від умов культивування. Перенесення культури сальмонел, зрощених на багатих живильних середовищах, в мікрокосми з дистильованою чи водопровідною водою (умови голодування) можна порівняти з виходом бактерій із макроорганізму до зовнішнього середовища. Якраз в таких умовах J.T.Staley з співавторами спостерігали утворення НФ бактерій [10].

Враховуючи той факт, що перехід до некультурабельного стану (НС) цілого ряду бактерій, пов'язаний з різними факторами природного середовища (вода водоймищ, водорості, ґрунтові складові, тощо), про що є цілий ряд публікацій [3 - 6], ми вирішили визначити вплив на персистенцію сальмонел снігової води. Для цього було взято сніг, після таяння якого (при кімнатній температурі + 20 °С) воду розділили на дві порції: одна була кохірована при температурі +60 °С по 1-ій годині на протязі трьох днів, іншу брали в експеримент нативною, без будь-якої обробки чи фільтрації.

В свою чергу кожна вода була розлита по 100 мл в косми, куди додавали культуру сальмонел до кінцевої концентрації 10^4 КУО/мл.

Умови культивування також були різними: одна партія проб залишалась при кімнатній температурі на світлі (в денний час доби), друга – в термостаті при температурі +37 °С. Висіви на наявність росту вегетативних форм сальмонел проводили один раз на тиждень на тверді живильні середовища, а після припинення росту – проводили пасажі через цукровий бульйон, намагаючись виявити хоча б незначну кількість живих вегетативних особей із загальної популяції сальмонел.

Статистично значимою була різниця у збереженні культивуємих властивостей сальмонел при інкубації у кохірованій воді по відношенню до некохірованої ($p > 0,05$).

Значне зниження КУО почалося із зразків кохірованої води лише через 70 – 90 діб, а відсутність росту колоній при висівах на тверді селективні живильні середовища була відмічена через 120 – 150 діб (табл.1)

Із некохірованої води зменшення КУО сальмонел на твердому середовищі розпочиналось через сім діб (у зразках, що находились при кімнатній температурі на світлі), а повне припинення росту – через 2 – 3 тижні.

Дещо довше (на 1 - 2 тижні) був зафіксований ріст культури сальмонел із аналогічного середовища (некохірована вода), яке находилось весь час експерименту у термостаті при температурі +37 °С.

Таблиця 1 – Показники життєздатності *Salmonella typhimurium*, утримуваних в „голодному” середовищі і в різних умовах культивування бактерійних клітин у зразках талої води

Вид проби	Умови культивування	Кількість КУО/мл <i>Salmonella typhimurium</i> через (діб):										
		1	3	7	14-21	30-37	60	90	120	150	180	210
Тала вода кохірована	37 °С	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0	10 ²	0
	Кімнатна температура 20 – 22 °С на світу	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0	0	0	0
Тала вода некохірована	37 °С	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ³	10 ²	0	0	0	0	0	0
	Кімнатна температура 20 – 22 °С на світу	10 ⁶	10 ⁵	10 ²	10 ²	0	0	0	0	0	0	0
Контроль росту <i>Salmonella typhimurium</i> в МПБ	37 °С	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁷
	Кімнатна температура 20 – 22 °С на світу	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶

Таблиця 2 – Показники наявності життєздатних бактерійних клітин у зразках талої води шляхом пасажів через МПБ в умовах культивування у термостаті при + 37 °С

Назва зразку	Умови попереднього культивування	Доба припинення росту при висівах на ВСА та Ендо	Кількість КУО на ВСА після висіву із МПБ через (діб):			
			2	7	10	14
Тала вода кохірована	при температурі +37 °С	135	0	0	0	0
	при температурі +20 – +22 °С на світу	90	0	0	0	0
Тала вода некохірована	при температурі +37 °С	30	0	0	0	0
	при температурі 20 – 22 °С на світу	30 діб	0	0	0	0

Звертає на себе увагу той факт, що нативні зразки талої води, незалежно від умов інкубації, значно більше впливали на здатність популяції сальмонел втрачати вегетативні властивості і переходити в НС. Це підтверджують і результати ПЛР, які свідчать про наявність сальмонел у дослідних зразках ще на протязі 25 – 40 діб.

Намагаючись визначити, чи лишилися у зразках (після припинення росту видимих колоній на ВСА та Ендо) здатні до розмноження хоча б поодинокі клітини мікроорганізмів, ми вносили по 2 мл дослідних зразків (тала вода + сальмонели) у пробірки з 8 мл МПБ, інкубуючи потім в умовах термостату (температура +37 °С), періодично висіваючи із кожної проби по 0,5 мл на середовище Ендо, ВСА та кров'яний агар. В жодному зразку реверсувати сальмонели не вдалося (табл.2).

Результати свідчать про те, що з припиненням росту бактерій на твердих живильних середовищах відновити вегетативні властивості сальмонел лише шляхом збагачення живильного середовища та умов культивування не вдається. Наявність позитивних результатів ПЛР у таких зразках дозволяє зробити ще один висновок – різниця щодо походження та складу вода є одним із абіотичних факторів індукції некультивурувальних форм (НФ) сальмонел, а для реверсії їх до вегетативного стану потрібні пошуки особливих „пробуджуючих” факторів.

Список літератури

1. Weichart D. H. Stability and survival of VBNC cells - conceptual and practical implications / Bell C. R, Brylinsky M, Johnson-Green P. (eds) Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999.
2. Bogosian G., and Bourneuf E. V. A matter of bacterial life and death // EMBO Reports. - 2001. - V. 2. - № 9. - P. 770 - 774.
3. Головлев Е.Л. Другое состояние неспорулирующих бактерий // Микробиология. - 1998. - Т.67. - № 6. - С. 725-735.
4. Романова Ю.М., Чегаева Е.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса // Молекул. генетика. - 1998. - № 3. - С. 3-8.
5. 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.
6. Аксенов М. Ю., Гаровникова Ю. С, Левина Г. А. и др. Использование полимеразной цепной реакции для изучения перехода клеток *Salmonella typhimurium* в некультивируемое состояние // Молекул, генет. - 1994. - № 2. -С. 17-21.
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. Bruns A., Nubel U., Cypionka H., and Overmann J. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton // Appl. Envir. Microbiol. -2003. -V. 69. -P. 1980 -1989.
9. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л., 1962. – С. 85 – 93.
10. 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.

УДК 615.246.6.+ 615.29

ВПЛИВ ПОЄДНАНИХ АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ВЕГЕТАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ SALMONELLA TYPHIMURIUM

Деркач С.А., Носатенко А.І., Крилова І.А., Габишева Л.С., Давиденко М.Б.,
Літкевич Г.Н.

Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України

Наведені результати дослідження впливу поєднаних абіотичних факторів на життєдіяльність культур *Salmonella typhimurium*. Показана роль середовища (водопровідна та тала вода), температурних умов культивування.

Ключові слова: *Salmonella typhimurium*, поєднане середовище, абіотичні фактори.

УДК 615.246.6.+ 615.29

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВЕГЕТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА SALMONELLA TYPHIMURIUM

Деркач С.А., Носатенко А.И., Крылова И.А., Габышева Л.С., Давыденко М.Б.,
Литкевич Г.Н.

Институт микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова АМН Украины

Представлены результаты исследований сочетанных абиотических факторов на жизнедеятельность *Salmonella typhimurium*. Показана роль среды (водопроводная вода, талая вода), температурных условий культивирования.

Ключевые слова: *Salmonella typhimurium*, питательная среда, абиотические факторы.

UDC 615.246.6.+ 615.29

EFFECT OF COMBINED ABIOTIC FACTORS ON VEGETATIVE PROPERTIES OF SALMONELLA TYPHIMURIUM

Derkach S.A., Nosatenko A.I., Krylova I.A., Gabisheva L.S., Davidenko M.B., Litkevich A.A.

Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology Ukraine's AMS

The results of the influence of different abiotic factors on the vitality of the culture of *Salmonella typhimurium* were revealed. The role of medium (tap water, water from melted snow), temperature conditions of cultivation.

Key words: *Salmonella typhimurium*, nutrition medium, abiotic factors.