

УДК 619:579:614:31

**ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ***Л.П. Блинкова<sup>1</sup>, А.М. Абдуллаева<sup>2</sup>, Ю.Д. Пахомов<sup>1</sup>, М.Л. Альтишулер<sup>1</sup>, Т.А. Першина<sup>2</sup>**1. НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия**2. Московский Государственный Университет Пищевых Производств, Россия**Формирование и характеристика жизнеспособных некультивируемых клеток*

В настоящее время существенно вырос интерес к жизнеспособным некультивируемым клеткам (ЖНК) – прежде всего беспоровых бактерий со стороны не только специалистов теоретических биологических дисциплин, но и со стороны медицинских и санитарных микробиологов, генетиков, биотехнологов, экологов, эпидемиологов и др. [1–4, 6, 11, 14–16]. Следует отметить значительный вклад наших ученых в эту проблему [1, 2, 14]. По этому вопросу проводятся международные конференции.

Такие клетки обратимо теряют способность расти на традиционных средах. Они изменяют форму и размер. Палочки могут преобразовываться в шарообразную, спиралевидную, нитевидную формы, измельчаются. Может утолщаться стенка. Не очень активно экспрессируются гены и идет метаболизм. Изменяется и ряд других свойств. Исследователям пока неясно, являются ли ЖНК беспоровых микроорганизмов заменяющим споры способом переживать неблагоприятные условия или это этап отмирания культуры. Помимо термина «жизнеспособные некультивируемые клетки», для подобных бактерий существует термин «дормантные клетки», т. е. спящие клетки, находящиеся в состоянии покоя. Некоторые ученые видят различия между ЖНК и покоящимся состоянием, считая, что в отличие от дормантных бактерий ЖНК имеют метаболическую активность [14]. Один из авторитетов в этой проблеме Oliver J.D. [15] считает это 2-мя терминами одного и того же физиологического состояния, главным признаком которого является некультивируемость.

Для многих представителей бактерий и грибов установлено НС. Среди них имеются возбудители опасных инфекций, например, такие как бруцеллы, псевдомонады, сальмонеллы, легионеллы, стафилококки, стрептококки, микобактерии, вибрионы и др. [2, 5, 7–9, 11, 13, 15, 18, 19]. Наличие ЖНК установлено у *Candida albicans* var. *stellatoidea* и *Brettanomyces*, с которыми связывают порчу пива [10, 12].

Известен ряд факторов, которые могут стать стрессовыми факторами, индуцирующими некультивируемое состояние (НС).

Количество стрессовых агентов, приводящих к переходу клеток в НС, продолжает увеличиваться. Это – экстремальные температуры, голодание, окислительный стресс, облучение (УФ-лучи, радиация), электрическое поле, высушивание, лиофилизация, химические вещества, среди них дезинфектанты и консерванты, пищевые красители и т. д. [1, 2, 8–10, 19], ряд биологических факторов, например, экстракты водорослей [2], где, на наш взгляд, стрессорным агентом могут быть альготоксины.

В настоящее время механизм формирования ЖНК не совсем понятен [17]. Наиболее признаваемой считается гипотеза, включающая несколько ключевых объяснений возникновения ЖНК. Экстремальные условия могут привести к потере клеточной активности и переходу в НС. При этом ЖНК имеют стратегию выживания, а не отмирания, адаптируясь к неблагоприятным факторам [15]. Формирование ЖНК является результатом генной регуляции [3, 4]. Основным геном при переходе микроорганизмов в НС оказался ген *groS*, контролирующий белок RpoS, который появляется в стационарной фазе роста популяции и способствует выживанию бактерий в экстремальных условиях [5]. Предположительно, белок RpoS улучшает адаптацию и резистентность клеток к различным стрессам, но тормозит переход адаптированных бактерий в НС. Однако мутации в гене *groS* приводят к потере или накоплению важной сигнальной регуляторной молекулы (p) *ppGpp*, влияющей на количество белка RpoS. Если происходит снижение уровня белка RpoS, то, соответственно, уменьшается адаптация бактерий и может осуществляться более быстрый переход в НС. При этом RpoS повышает стрессоустойчивость возникших ЖНК. Считается также, что перед формированием ЖНК нормальные клетки бактерий становятся клетками-персистерами. В этом состоянии клетки не растут, но могут быстро восстанавливать культивируемость. Персистентное состояние Augarsetyan, один из очень результативных исследователей, относит к состоянию покоя [3, 4].

Среди источников ЖНК патогенов выявлены: вода питьевая, грунтовая, прудовая, морская; почва; пыль; кухонная утварь; лечебные средства; пищевые продукты: сырое мясо животных, птицы, рыба, морские продукты, яйца, молоко и молочные продукты, растительная пища, фрукты, салат, шпинат, соленья и т. д. [7, 10–13, 18]

Нами выявлены ЖНК в биотехнологической продукции: в промышленных препаратах пробиотиков лактобациллы (это впервые обнаружено нами); ЖНК в лиофилизированных коммерческих препаратах пробиотиков, возраст которых превысил 30 лет [1, 6].

*Реверсия микроорганизмов из некультивируемого состояния.*

Способность ЖНК к реверсии является важнейшим экологическим свойством. Реанимация (реверсия, восстановление) ЖНК патогенов до физиологически активного состояния, превращая их в биологически опасные микробные клетки, возникает под действием ряда факторов, которые постепенно выявляются исследователями. К таким факторам относятся физические, химические и биологические факторы: увеличение концентрации питательных веществ или витаминов в средах выращивания, т. е. использование обогащенных питательных сред; изменение температурных условий; использование химических соединений, стимулирующих рост и размножение бактерий; совместное культивирование ЖНК с клетками организма-хозяина или его метаболитами (культуры клеток, транзит через кишечник грызунов, выращивание с клетками простейших и т. д. [2, 16, 19]. Впервые о реверсии сообщили Roszak et al. [18], предложившие этот термин. Следует отметить, что восстановление ЖНК до нормального состояния происходит не всегда и не у всех культур, т. е. условия реверсии должны быть подобраны даже до конкретного штамма [13, 17, 18]. Так, удачная реанимация ЖНК гемолитического штамма *E. coli* с помощью аминокислот оказалась неэффективной для другой культуры *E. coli* O157:H7. В некоторых ситуациях по неизвестной причине ЖНК не удавалось реанимировать.

Механизмы реанимации ЖНК так же, как и переход микроорганизмов в НС, остаются нераспознанными на многих этапах этих процессов. Однако появление современных методик, в частности, в молекулярной биологии, позволяет надеяться на успешность изучения этих вопросов. Так, было показано, что белки реанимации Rpf (лизоцимоподобные, в их составе до 220 аминокислот) действуют как цитокины. Они выделяются в среду растущими микробами и связываются с поверхностными рецепторами dormantных клеток и затем вызывают реанимацию ЖНК [17].

Таким образом, факт существования ЖНК патогенов и, в частности, их присутствие в клинических образцах, в пищевых продуктах, воде и т. д. и создают угрозу здоровью человека, имеет уже достаточно много подтверждений. Однако в настоящий период достоверный ответ о механизме формирования НС и выхода из него существует, в основном, в виде гипотез и предположений. Поэтому получение новых сведений о микроорганизмах в НС и разработка быстрых, точных и достоверных методик детекции ЖНК и их реверсии к нормальному состоянию являются необходимой задачей исследователей, прежде всего, для предотвращения инфекций, в том числе, пищевого происхождения. Изучение НС имеет и другую практическую значимость, например, для определения всего потенциала жизнеспособных клеток в биологических препаратах (вакцинах, пробиотиках, музейных культурах, в клинических образцах), т. е. это важно для определения активности и срока годности препаратов.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Блинкова Л.П., Пахомов Ю.Д., Дмитриева О.В. Обнаружение некультивируемых бактерий в лиофилизированных препаратах пробиотиков. Журн. микробиол., 2013, № 3, с. 83–88.
2. Бухарин О.В., Гинцбург Л.П., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М., Медицина, 2005
3. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Bridging the gap between viable but not culturable and antibiotic persistent bacteria // Trends in Microbiology, V.23, № 1, P. 7–13.
4. Ayrapetyan M., Oliver J.D. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety // Curr. Opin. Food Sci. 2016, V. 8, P. 127–133.
5. Bhagwat A.A. Tan J., Sharma M. et al. Functional heterogeneity of RpoS in stress tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. // Appl. Environ. Microbiol. 2006, V. 72, P. 4978–4986.
6. Blinkova L.P., Martirosyan D., Pakhomov Yu. et al. Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparation // Functional Foods in Health and Disease. 2014, V. 4, № 2, P. 66–76.
7. Braden C.R. Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States // Clin. Infect. Dis. 2006, V. 43, P. 512–517.