

УДК: 579.843.1:579.26

ПЕРЕХОД ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В НЕКУЛЬТИВИРУЕМОЕ СОСТОЯНИЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕКОТОРЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Николеишвили Л.Р., Подосинникова Л.С.

*Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт,
Ростов-на-Дону*

Показано достоверно значимое влияние на скорость процесса образования некультивируемых форм холерных вибрионов совместного действия некоторых абиотических факторов их в различных сочетаниях.

По мнению многих исследователей (1, 2), для холерных вибрионов, как возбудителей кишечной инфекции, пребывание во внешней среде является неизбежным и «носит не случайный характер», а обусловлено взаимоотношениями микро- и макроорганизма.

Обнаружение некультивируемого состояния (НС) у бактерий обусловило необходимость нового подхода к анализу экологических и молекулярно-генетических механизмов существования возбудителей инфекций в природе.

Знание этих механизмов необходимо для оценки факторов, обеспечивающих микроорганизмам существование в качестве естественных компонентов природных биоценозов, что, в свою очередь, будет способствовать пониманию природы эндемичности и резервации патогенных бактерий в межэпизоотические (межэпидемические) периоды.

Считается, что переход бактерий в НС является ответом на ухудшение условий обитания. К основным факторам индуцирующим переход в НС бактерий исследователи относят понижение температуры в среде обитания и условия голодания (4, 7, 9).

В связи с важностью изучения экологических аспектов перехода холерных вибрионов в некультивируемое состояние особого внимания заслуживают работы, посвященные роли биотических и абиотических факторов водоёмов в этом процессе. Имеются сведения о переходе вибрионов, в том числе холерных, в некультивируемую форму (НФ) в условиях пониженной (+4 °С) и повышенной (37 °С) температуры (3,8), получены НФ холерных вибрионов в голодной среде, морской, речной воде и некоторых других модельных системах (5,6).

Цель настоящей работы – изучение отдельного и комплексного влияния некоторых абиотических экологических факторов: температуры, освещенности и различной солености среды на переход в некультивируемое состояние

токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов.

Материалы и методы. В работе было использовано 9 типичных по родовым и видовым свойствам ctx^+ и ctx^- штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы. Для получения НФ конструировали микрокосмы на основе автоклавированной речной, морской (Азовского и Черного моря) воды. В качестве контроля использовали дистиллированную воду и 0,85% NaCl. Для облегчения визуального контроля морфологии и подсчета клеток под микроскопом концентрацию холерных вибрионов доводили средой культивирования до 10^9 кл/мл. Пробы содержали при температуре 4-6 и 8-10 °С без освещения и в условиях постоянной искусственной освещенности в 300 люкс.

Высевы на агаровые среды производили ежедневно в течение 30 дней, затем раз в неделю и в месяц. Некультивируемыми считали вибрионы в пробе, в посевах из которой на агаровых средах не обнаружено выросших колоний, но витальными методами окрашивания выявлены живые бактериальные клетки или ПЦР методом - ДНК ctx гена при культивировании токсигенных штаммов.

Полученные материалы проанализированы с учетом влияния на скорость перехода холерных вибрионов в НС отдельного и сочетанного действия двух и более факторов.

Результаты и обсуждение

Использование в экспериментах разного температурного режима содержания микрокосм показало, что наиболее быстрый переход холерных вибрионов в НС происходил при температуре 4-6 °С, как при постоянном искусственном освещении, так и без него.

В микрокосмах с речной водой при температуре 4-6 °С без искусственного освещения штаммы *V. cholerae* O1 переходили в НС через 12 – 15 суток, *V. cholerae* O139 - в период от 30 до 50-60 суток. В микрокосмах с водой Азовского моря

НФ холерных вибрионов O1 серогруппы получены в течение 60 суток, а O139 серогруппы – 75-90. В воде из Черного моря в тех же условиях штаммы *V. cholerae* O1 переходили в НС в более поздние сроки (90 – 150 суток), а холерные вибрионы O139 серогруппы в течении 180 суток сохраняли жизнеспособность (срок наблюдения). В 0,85% растворе NaCl время перехода в НС колебалось у *V. cholerae* O1 от 30 до 40, а у холерных вибрионов O139 серогруппы - от 40 до 75 суток. В дистиллированной воде штаммы *V. cholerae* O1 переходили в НС через 30 – 40 суток, а холерные вибрионы O139 серогруппы в среднем через 45 суток, однако имели место и более поздние (до 120 суток) сроки.

В условиях постоянного искусственного освещения в микрокосмах с речной водой при температуре 4-6 °С время перехода в НС, в отличие от аналогичных микрокосм без освещенности, было значительно более продолжительным и составило для *V. cholerae* O1 90 суток, а для холерных вибрионов O139 серогруппы - 120-180 суток. В микрокосмах с водой Азовского моря *V. cholerae* O1 переходили в НС через 120 суток, а холерные вибрионы O139 серогруппы - в течение 100-150. В воде Чёрного моря *V. cholerae* O1 в течение 190-210 суток сохраняли жизнеспособность, а холерные вибрионы O139 серогруппы переходили в НС через 120 – 270 суток. Аналогичная тенденция отмечена и для проб с 0,85% раствором NaCl, где при постоянном искусственном освещении *V. cholerae* O1 переходили в НФ через 120-130 суток, а холерные вибрионы O139 серогруппы - 120 - 150 суток. В дистиллированной воде время перехода в НС *V. cholerae* O1, так же, как и без освещения, колебалось в пределах 30 – 45 суток, а холерных вибрионов O139 серогруппы - 60 суток.

Повышение температуры культивирования до 8-10 °С также выявило увеличение сроков перехода в НС холерных вибрионов во всех микрокосмах кроме дистиллированной воды.

Культивирование холерных вибрионов при 8-10 °С без искусственного освещения в микрокосмах с речной водой показало, что штаммы *V. cholerae* O1 переходили в НС через 150 - 180 суток, а холерные вибрионы O139 серогруппы - 240 - 300 суток. В микрокосмах с водой из Черного моря *V. cholerae* O1 и холерные вибрионы O139 серогруппы образовывали в НФ через 210 - 230 суток, в 0,85% растворе NaCl *V. cholerae* O1 - через 75 - 80 суток, а холерные вибрионы O139 серогруппы - 114 - 120 суток. В дистиллирован-

ной воде *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139 переходили в НС через 30 - 40 суток.

Освещение микрокосм и при 8-10 °С значительно увеличило время перехода холерных вибрионов в НС во всех средах за исключением дистиллированной воды. Так, при культивировании микрокосм с речной водой в условиях освещения при температуре 8-10 °С *V. cholerae* O1 переходили в НС через 240 - 260 суток, а холерные вибрионы O139 серогруппы - 290 - 360 суток. В микрокосмах с водой из Черного моря *V. cholerae* O1 переходили в НС через 275-280, а O139 серогруппы - через 280 - 340 суток. В 0,85% растворе NaCl время перехода *V. cholerae* O1 занимало 240 - 260 суток, а для холерных вибрионов O139 серогруппы составило 250 - 270 суток. Скорость перехода холерных вибрионов в НС при 8-10 °С в дистиллированной воде практически не изменилась: *V. cholerae* O1 переходили в НС через 28 - 45 суток, а холерные вибрионы O139 серогруппы - через 30 суток.

Таким образом, несмотря на наиболее короткие сроки перехода при температуре 4-6 °С холерных вибрионов в НС выявлено влияние на их продолжительность освещенности и состава среды. Например, в микрокосмах речной воды, солёность которой гораздо ниже, чем из Черного моря, при постоянном искусственном освещении время перехода *V. cholerae* O1 в НС оказывается в 6,8, а *V. cholerae* O139 - в 3,7 раза больше, чем без неё. В микрокосмах с водой Азовского моря освещённость в среднем в 1,7 раза увеличивала эти сроки, а в воде из Черного моря - в 1,2 раза. При культивировании холерных вибрионов в 0,85% растворе NaCl, сроки перехода в НС в условиях освещенности увеличивались в 2,3 раза. В дистиллированной воде влияния освещенности на переход холерных вибрионов в НС не выявлено, ни при 4-6, ни при 8-10 °С.

В условиях микрокосм с различной солёностью среды, температурой содержания и освещённостью не выявлено зависимости перехода в НС холерных вибрионов от их токсигенности. Обнаружено лишь различие в скорости образования НФ холерными вибрионами разных серогрупп. Различия в скорости перехода в НС *V. cholerae* O1 и O139 особенно выражены в микрокосмах с морской и речной водой. Так например, *V. cholerae* O1 в микрокосмах с речной водой без освещения в 3,1 раза быстрее переходили в НС, чем *V. cholerae* O139, в условиях освещенности сроки перехода в НС у *V. cholerae* O139 увеличились в 1,2 - 1,7 раза (Рисунок).

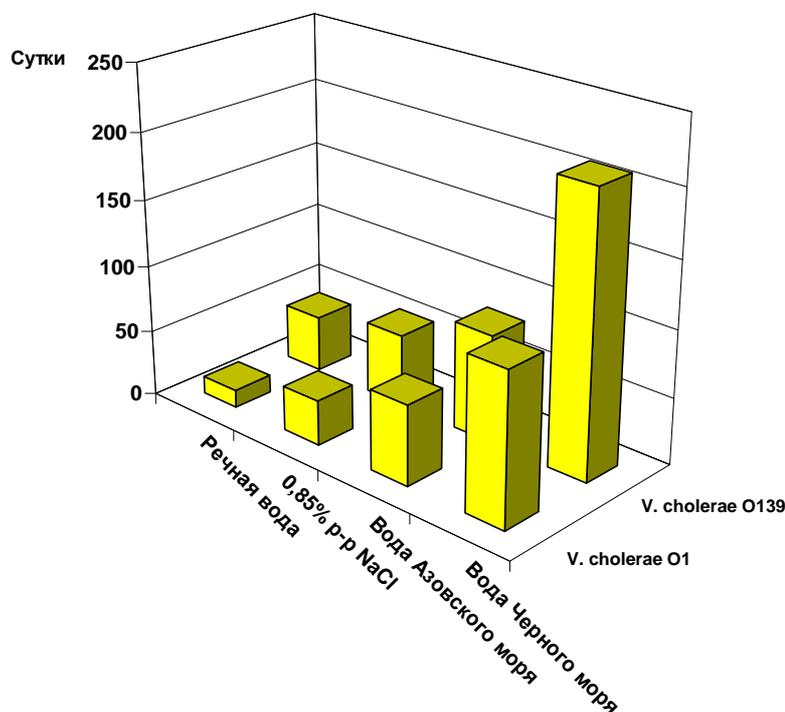


Рисунок. Сравнительный анализ скорости перехода в НС в различных микрокосмах холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы при 4 °С без освещения

В микрокосмах с водой из Чёрного моря продолжительность сохранения в культивируемом состоянии *V. cholerae* O139 серогруппы была в 1,7 раза больше, чем у *V. cholerae* O1. При искусственном освещении у *V. cholerae* O1 переход в НФ в воде из Черного моря не зарегистрирован, а сроки образования НФ у *V. cholerae* O139 были более продолжительными чем без освещения.

Получение в экспериментальных экосистемах НФ холерных вибрионов под действием нескольких факторов, характеризующих природные экосистемы, выявило достоверно значимое влияние на скорость процесса как каждого из изученных факторов, так и совместного их действия в различных сочетаниях.

Из четырех изученных микрокосм с различным солевым составом среды в условиях без искусственной освещенности при 4-6 °С в трех (кроме морской воды, характеризующейся более высоким, чем в остальных микрокосмах, содержанием солей) холерные вибрионы переходили в НС в одинаковые сроки. Освещенность этих же микрокосм увеличивала сроки перехода в НС холерных вибрионов во всех четырех микрокосмах: в 0,85% растворе NaCl в - 2,3 раза, в речной воде в 4,1 раза и в воде Азовского моря - в 1,7 раза. В морской воде, при искусственном освещении НФ *V. cholerae* O1 не были получены, в отличие от аналогичных микрокосм без освеще-

ния, где холерные вибрионы перешли в НС в течение 190-210 суток.

При температуре 8-10 °С в тех же микрокосмах без искусственного освещения сроки перехода в НС удлинялись: в речной воде - в 7,4 раза, в 0,85% растворе NaCl - в 1,8 раза и в морской воде в - 1,6 раза. Искусственное освещение в условиях этой температуры еще более увеличило сроки перехода в НС холерных вибрионов: в 0,85% растворе NaCl в 2,8 раза, в речной воде в 1,3 раза и в воде Черного моря - 1,3 раза.

Таким образом, сроки перехода в НС холерных вибрионов увеличивало как повышение температуры содержания микрокосм (1,6 -7,4 раза), так и искусственная их освещенность (1,3-2,8 раза), что в сочетанном их влиянии оказывалось еще более выраженным (2,0 - 9,8 раза).

Зависимость образования НФ холерных вибрионов от солености сред, выразилась в более продолжительных (1,8 - 3,7 раза) сроках формирования НФ холерных вибрионов как при 4-6 °С без освещения во всех средах, содержащих микроэлементы, так и при 8-10 °С (2,8 - 6,4 раза). Сочетанное влияние среды микрокосм с повышением температуры их содержания и с искусственной освещенностью еще более (7,7 раза) увеличило сроки формирования НФ холерных вибрионов.

Наиболее продолжительным оказался период перехода в НС в микрокосмах с водой из Черного моря, характеризующейся наибольшим по

сравнению со средами других микрокосм, даже водой Азовского моря, содержанием солей. Очевидно, сложный или более разнообразный минеральный состав воды Черного моря по сравнению с другими экспериментальными экосистемами способствует более продолжительному сохранению холерных вибрионов в культивируемом состоянии, имеющих в основном прототрофный тип питания, что может косвенно свидетельствовать о значении минерализации среды в поддержании культивируемого состояния вибрионов.

На скорость образования НФ холерных вибрионов в дистиллированной воде не влияли ни освещенность, ни температура содержания, что, очевидно, связано с минимальным содержанием в этой среде солей и увеличении питательного субстрата только в результате гибели и распада вибрионов.

Таким образом, низкие температуры, являющиеся основным фактором, запускающим переход холерных вибрионов в НС, в зависимости от состава экосистем реализуют индуцирующее действие в различные сроки. В дистиллированной воде, не содержащей солей и других факторов, влияющих на продолжительность сохранения холерных вибрионов в культивируемом состоянии, повышение температуры содержания микрокосм с 4-6 °С до 8-10 °С не удлиняло сроки перехода их в НС. Оценивая значимость экспериментальных данных о влиянии температуры на переход холерных вибрионов в НС, следует учитывать, что зимой с понижением температуры поверхностные холодные воды с температурой ниже 4 °С располагаются над сравнительно теплыми. По всей вероятности среда с температурой 4-5 °С является пограничной зоной в формировании некультивируемых форм у микроорганизмов, что коррелирует с получением экспериментальных НФ именно при этой температуре (5,6).

Список литературы

1. Бароян О.В., Бургасов П.Н., Гайлонская И.Н., Мединский Г.М. Экология холерных вибрионов. //Вест. – АМН. - 1975, - №2, - С.45-53.
2. Литвин В.Ю. Холера как природно-очаговая сапронозная инфекция //Журн. микробиол, эпидемиол. и иммунобиол. – 1995. - №6 – С. 30-31.
3. Подосинникова Л.С., Соколенко А.В., Чепкова Е.А. и др. Экспериментальное получение и характеристика некультивируемых форм холерных вибрионов //Пробл. Комиссия «Холера и патоген. для человека вибрионы. Ростов н/Д, 1999. Вып. 12. - С. 13-14.
4. Романова Ю.М., Чегаева Е.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса. //Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 1998. - №3. - С.3-8.
5. Савельев В.Н., Грижебовский Г.Н., Брюханов А.Ф. Некультивируемые формы холерного вибриона и их эпидемиологическое значение //Пробл. комиссия «Холера и патоген. для человека вибрионы». Ростов н/Д, 2001.- №14. – С.24-26.
6. Соколенко А.В. Морфология, ультраструктура, метоболизм некультивируемых форм холерных вибрионов.: Автореф. дис....канд. биол. наук. -Ростов н/Д., 2000.- 18с.
7. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D. I. et al. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms //BioTechnology.- 1985. - Vol.3. - P.817-820.
8. Oliver J.D., Bockian R. In vivo resuscitation and virulence towerdes mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* //Appl. Environ. Microbiol. – 1995. - Vol.61. – №7. – P. 2620-2627.
9. Roszak D.B., Colwell R.B. Survival strategies of bacteria in the natural environment //Microbiol. Rev.-1987.-Vol.51.№3. - P.365-379.

Influence abiotic factors on transfor *Vibrio cholerae* to nonculturable form

Nicoleischvili L.R. Podosinnikova L.S.

It was shown that complex abiotic factors increase transfer *Vibrio cholerae* to nonculturable form.