

УДК 579.61;63;695

ВІДНОВЛЕННЯ *IN VIVO* НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОЇ СУБПОПУЛЯЦІЇ *SALMONELLA ENTERICA*

Юдін І. П.

ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України", yudinip@ukr.net

Резюме

Salmonella enterica є патогенним для людини мікроорганізмом, який викликає сальмонельоз. Мета цього дослідження полягала в тому, щоб дослідити життєздатний, але некультурабельний (ЖН) стан *S. enterica*, індукований дією етанолу та відновлення *in vivo* некультурабельних клітин. Експериментально встановлено, що клітини *S. enterica* в експоненціальній фазі росту, піддані дії етанолу (кінцева концентрація 20 %) втрачали культурабельність в межах до 60 хвилин протягом обробки цим біоцидом. Загальна кількість клітин залишалася незмінною, однак бактерії не виявлялись методом посіву на поживне середовище. Прямий облік життєздатних бактерій за допомогою барвнику LIVE/DEAD BacLight становив біля 4 Іг клітин/мл. Результати подальших експериментів інтраперитонеального зараження мишей припускають, що відновлені клітини могли б зберегти патогенність.

Вступ

Більш як тридцять років тому в лабораторії Colwell R. вперше було описано клітини *Escherichia coli* і *Vibrio cholerae*, які перебували у невідновлювальному на поживних середовищах стані існування, але мали ознаки життєздатності. З цього повідомлення розпочато дослідження щодо розрізнення концепції життєздатності та культурабельності, при тому, що раніше, як правило, життєздатність бактеріальної клітини оцінювалася через її культурабельність [1]. Як один із мезофільних, легко культивованих видів патогенних бактерій, *Salmonella enterica* трансформується в життєздатний некультурабельний (ЖН) стан у відповідь на екологічні стреси, у тому числі - дію біоцидів. У цьому стані клітини зберігають цілісність мембран та деякий метаболізм, але не виявляються звичайними методами культивування. Деякі дослідники припускають, що еволюційне значення цього феномену є частиною адаптивної відповіді, спрямованої на довгострокове виживання бактерій в несприятливих умовах [1, 2], інші стверджують, що це є наслідком стохастичного клітинного ушкодження, при якому некультурабельні клітини знаходяться у стані поступової загибелі [3, 4]. У всякому випадку, феномен існування ЖН патогенів, якщо вони зберігають здатність відновлювати *in vivo* свою вірулентність, є суттєвою проблемою в медицині, фармвиробництві, ветеринарії, харчовій промисловості [5]. Метою даної роботи було

дослідження відновлення здатності до росту *in vivo*, використовуючи модель інтраперитонеального зараження мишей, некультурабельної субпопуляції *S. enterica*, ЖН стан якої індуковано дією етилового спирту.

Матеріали і методи

У роботі використовувався штамп *Salmonella enterica* (серотип Enteritidis) v. *ratin* гр. Д, № 27, отриманий з Музею мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України». Усі середовища та розчини були виготовлені на дистильованій стерильній воді: агар Lui-Bertani (LB), бульон LB, вісмут-сульфітний агар (BCA), фосфатно-сольовий буфер (ФСБ, pH=7,2). При підготовці рідких середовищ і буферів застосовувалася додатково фільтрація через мембранні фільтри (МФ) «Millipore» SLGS, діаметр пор 0,22 мкм, з метою видалення осаду та будь-яких нерозчинених часток.

Для отримання стресових некультурабельних популяцій бактерій використовувався метод, що описаний Morishige I. [6] в авторській модифікації, який полягає в наступному. Бактерії вирощувались до експоненціальної фази в бульйоні LB. Культури були двічі відмиті центрифугуванням при 4500 г протягом 10 хвилин, ресуспендовані у ФСБ до оптичної щільності близько $1,5 \times 10^8$ клітин/мл згідно стандарту 0,5 одиниць McFarland. До 1,0 мл зразку суспензії, розведеної до $1,5 \times 10^6$ клітин/мл був доданий 1,0 мл етанолу у концентрації 40 % (об'єм/об'єм). Після експозиції від 10 до 600 хв. у досліджувані суспензії додавали 8,0 мл ФСБ, відмивали шляхом центрифугування (4500 г протягом 5 хвилин) та серійно розведені у співвідношенні 1:10 (об'єм/об'єм) зразки суспензій фарбували барвником LIVE/DEAD BacLight (виробництва фірми "Invitrogen", USA), фільтрували через мембранні фільтри для флюоресцентної мікроскопії та паралельно висівали на чашки з агаром LB для визначення культурабельності з обрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО) в мл.

Кількісне виявлення життєздатних бактерій у досліджуваних зразках здійснювали методом флюоресцентної мікроскопії на мембранних фільтрах (ФММФ) із застосуванням маркера цілісності мембран LIVE/DEAD BacLight. У його складі зелений низькомолекулярний флюорохром Syto9, що спроможний проникати через неушкоджені плазматичні мембрани, і високомолекулярний червоний флюорохром йодид пропідію (PI), що проникає тільки через ушкоджені мембрани. Клітини бактерій, що інкубовані в присутності обох фарб одночасно, будуть флюоресціювати зеленим (життєздатні), або червоним (нежиттєздатні) кольором, залежно від інтактності їхніх мембран.

Дослідження відновлення *in vivo* некультурабельних клітин *S. enterica* проводили на моделі інтраперитонеально заражених безпородних лабораторних мишей вагою 25-30 г. В експерименті три групи тварин були інокульовані шляхом

внутрішньочеревної ін'єкції таким чином: 1) 10^3 культурабельних клітин (0,1 мл суспензії, що містить 10^4 КУО/мл); 2) 10^3 ЖН клітин (0,1 мл суспензії, що містить 10^4 клітин/мл некультурабельної популяції); 3) 10^3 інактивованих клітин (пастеризація при температурі 60 °С у 70 % етанолі, 10 хв.). Суспензії перевірялись на культурабельність висівом на агар LB і підрахунком методом ФММФ для визначення кількості ЖН клітин. За мишами спостерігали щодня протягом 14 діб для реєстрації рівня загибелі і відбору внутрішніх органів. Печінки і селезінки загиблих мишей були видалені і гомогенізовані в 1,0 мл ФСБ для виявлення відновлених культурабельних клітин

сальмонел шляхом висіву на селективне середовище ВСА.

Результати досліджень оброблялись методами альтернативної і варіаційної статистики. Для визначення достовірних відмінностей між вибірками, дані логарифмічно трансформувалися і застосовувався *t*-тест Ст'юдента.

Результати й обговорення

У цьому дослідженні клітини *S. enterica* в експоненціальній фазі росту, піддані дії етанолу (кінцева концентрація 20 %) втрачали культурабельність в межах до 60 хвилин (рис. 1).

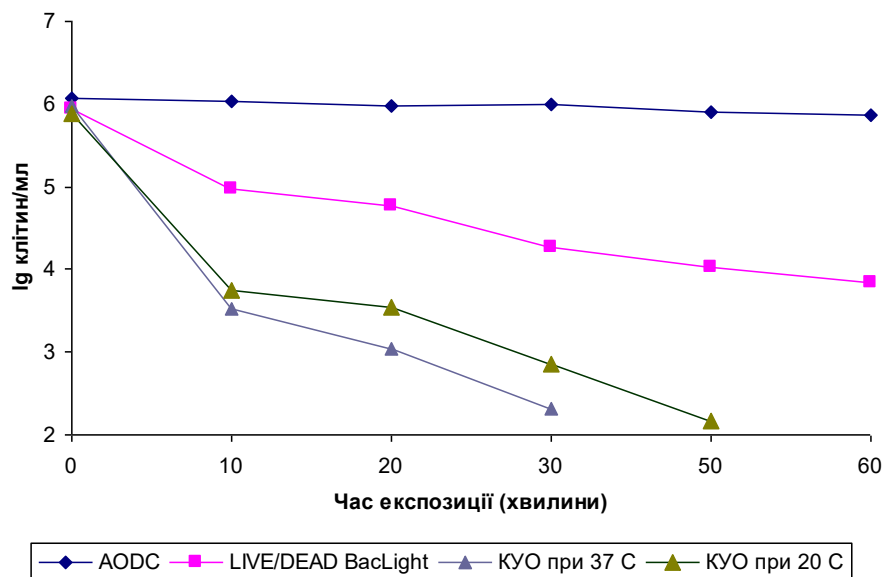


Рисунок 1 – Динаміка змін кількості життєздатних клітин *S. enterica* під дією етанолу у концентрації 20 % в різні проміжки часу. Кожна крапка даних діаграми - середнє від трьох реплік з однієї підвибірки суспензії. AODC – загальна кількість клітин; LIVE/DEAD BacLight - кількість клітин з неушкодженими мембранами; КУО при 37 °C – культурабельність при 37 °C, інкубація 24 год.; КУО при 20 °C – культурабельність при 20 °C, інкубація 48 год.;

Після 50 хв. експозиції культурабельність бактеріальних суспензій була за межами оцінки чашковим методом на агарі LB. Загальна кількість клітин у зразках, що визначалась за допомогою прямого підрахунку з акридиновим помаранчевим була незмінною. У той же час, життєздатність за ознакою цілісності клітинних мембран, визначено на рівні $1,0 \times 10^4$ клітин/мл. Ці результати співставні із тими, де експоненціальні клітини стресіндукованої популяції *Vibrio vulnificus*, піддані дії етанолу (кінцева концентрація 13 %), втратили культурабельність в межах 60 хв. впродовж обробки [7]. Бактерії, які набувають некультурабельного стану (НС), можуть відновлювати культурабельність. Таким чином, цей стан є оборотним. Важливо відзначити, що відновлення з НС *in vitro*, яке досягається або простим усуненням чинника індукції НС (підвищення температури зростання, доступність поживних речовин), або більш складних умов, на зразок комбінації екологічних і хімічних стимулів [8] не висвітлює повноцінно рівня патогенного потенціалу

відновлюваних бактерій. Тому процес відновлення здатності до росту *in vivo* некультурабельних *Salmonella sp.* екстенсивно вивчався на моделі зараження мишей. Наприклад, при інфікуванні мишей промиванням легенів протягом 3 днів суспензією некультурабельних клітин *S. typhi*, індукованих низькими температурами (4 °C, або -20 °C) та різними концентраціями CuSO_4 , у всіх тварин дослідних груп спостерігалась діарея. Культурабельні клітини *S. typhi* були виділені з асцитної рідини тварин цих двох дослідних груп [9]. *S. enterica*, серовар Turphimurium був підданий стресу інкубацією в морській воді і мікрокосмі ґрунту протягом 20 років. Відновлення *in vitro* ЖН сальмонел було отримано інкубацією протягом 2-х місяців в живильному бульйоні, а також *in vivo* у мишей, інфікованих перорально, але не інтраперітонеально [10].

Основні результати експериментів з вивчення відновлення здатності до росту некультурабельних бактерій *S. enterica* із подальшим проявом їх вірулентності наведено в табл. 1. Як видно із даних табл. 1, в експериментах *in vivo* відновлення з НС

здатності до росту у *S. enterica* із проявом загибелі впродовж терміну спостереження піддослідних тварин відмічено у 13,3 % ($p < 0,05$), при 100 % рівні летальності в групі тварин, заражених суспензією живих культурувальних клітин сальмонел і цілковитому виживанні тварин контрольної групи (які отримали ін'єкцію інактивованих бактерій). У загиблих мишей з гомогенатів внутрішніх органів було висіяно відновлені сальмонели, що підтверджувалось їх ростом на селективному середовищі ВСА.

Таблиця 1 – Результати досліджень відновлення *in vivo* некультурувальної субпопуляції *S. enterica* за ознакою їх вірулентності.

Кількісна та якісна характеристика інокулятив, які вводили інтраперітонеально лабораторним тваринам	Кількість піддослідних тварин	
	всього заражених, абс. ч.	Загиблих, абс. ч. (%)
Суспензії інактивованих бактерій (10^3 клітин/мл)	7	0 (0)
Суспензії живих культурувальних бактерій (10^3 КУО/мл)	7	7 (100)
Суспензії некультурувальних бактерій (10^3 клітин/мл)	30	4 (13,3)
Всього	44	11 (25)

Відновлення *in vivo* і патогенність *S. enterica* серовар Oranienburg, який набув ЖН стану в продовольстві, було випробувано шляхом інтраперітонеального зараження мишей. ЖН клітини були повністю нейтралізовані в організмі контрольної групи мишей, але викликали системну бактеріємію і згодом загибель оброблених морфієм мишей [11]. Можна припустити, що бактерії частково втрачають свою вірулентність, але проявляють її в ослаблених особин з нечіткою імунною відповіддю.

Висновки

Піддавання сальмонел невисокими дозами біоциду (етиловий спирт, кінцева концентрація 20 %) призводить до індукції в них некультурувального стану, що проявляється відсутністю росту на живильних середовищах. В умовах *in vivo* процес відновлення з НС *S. enterica* може відбуватись, але з низьким рівнем інтенсивності у здорових мишей (у 13,3 %, $p < 0,05$). Тим не менш, ці клітини зберігають патогенний потенціал і можуть представляти небезпеку у разі їхньої недооцінки.

Література

1. Oliver, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria [Electronic

- resource] / J. D. Oliver // FEMS microbiology reviews. – 2010. – Vol. 34. - № 4. – P. 415-425.
2. Pinto, D. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms [Electronic resource] / D. Pinto, M. A. Santos, L. Chambel // Critical reviews in microbiology. – 2013. – Vol. 41. - № 1. – P. 61-76.
3. Kell, D. Individuality, phenotypic differentiation, dormancy and ‘persistence’ in culturable bacterial systems: commonalities shared by environmental, laboratory, and clinical microbiology [Electronic resource] / D. Kell, M. Potgieter, E. Pretorius // F1000Research. – 2015. – Vol. 4.
4. Are uncultivated bacteria really uncultivable? [Electronic resource] / I. D. Puspita [et al.] // Microbes and environments. – 2012. – Vol. 27. - № 4. – P. 356-366.
5. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens [Electronic resource] / L. Li [et al.] // Front. microbiol. – 2014. – Vol. 5(258).
6. Morishige, Y. Differential Resuscitative Effect of Pyruvate and its Analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella* [Electronic resource] / Y. Morishige, K. Fujimori, F. Amano // Microbes and environments. – 2013. – Vol. 28. - № 2 – P. 180–186.
7. Nowakowska, J. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state [Electronic resource] / J. Nowakowska, J. D. Oliver // FEMS microbiology ecology. – 2013. – Vol. 84. - № 1. – P. 213-222.
8. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli [Electronic resource] / D. Pinto [et al.] // Journal of applied microbiology – 2011. – Vol. 110. - № 6. – P. 1601-1611.
9. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella typhi* [Electronic resource] / B. Zeng [et al.] // BioMed research international – 2013. – Vol. 2013.
10. Dhiaf, A. Resuscitation of 20-year starved *Salmonella* in seawater and soil [Electronic resource] / A. Dhiaf, F. B. Abdallah, A. Bakhrouf // Annals of microbiology – 2010. – Vol. 60. – № 1. – P. 157-160.
11. Viable but nonculturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice [Electronic resource] / H. Asakura [et al.] // Journal of infectious diseases. – 2002. – Vol. 186. - № 10. – P. 1526-1529.

UDC 579.61; 63; 695

RECOVERY *IN VIVO* OF NONCULTURABLE SUBPOPULATION OF *SALMONELLA ENTERICA* Yudin IP

Introduction. As one of mesophilic, easily cultivated species of pathogenic bacteria, *Salmonella enterica* transformed into viable but nonculturable (VNC) state in response to environmental stresses, including action of biocides. The cells in this state, preserve the integrity of membranes and metabolism of some, but not detected by conventional methods of cultivation. Some researchers suggest that the evolutionary significance of this phenomenon is part of an adaptive response aimed at

long-term survival of bacteria in adverse conditions; others argue that it is the result of stochastic cellular damage, in which nonculturable cells are in a state of gradual death. In any case, the phenomenon of existence VNC pathogens if they retain the ability to restore its growth *in vivo* is a significant problem in medicine, pharmaceutical, veterinary, food industry. VNC subpopulation of *S. enterica* was obtained under action of ethanol. In this paper was investigated *in vivo* resuscitation VNC *S. enterica* using intraperitoneal injection of mice. **Materials and methods.** Obtaining of stressful *S. enterica* populations. Bacteria were grown to exponential phase in broth Luria–Bertani (LB). To 1.0 ml sample suspension diluted to 1.5×10^6 cells/ml was added 1.0 ml of ethanol at a concentration of 40 % (v/v). After exposure of 10 to 600 minutes in the suspension were added 8.0 ml of phosphate buffered saline (FBS), washed by centrifugation (4500 g for 5 minutes) and serially diluted at a ratio of 1:10 (v/v) samples were stained with LIVE/DEAD BacLight (produced by "Invitrogen", USA), filtrated on membrane filters for fluorescence microscopy and parallel plated on LB agar cup to determine colony-forming units (CFU) per ml. *In vivo* resuscitation VNC *S. enterica* was made following way. Three groups of animals were inoculated by intraperitoneal injection: 1) 10^3 culturable cells (0.1 ml suspension containing 10^4 CFU / ml); 2) 10^3 VNC cells (0.1 ml suspension containing 10^4 cells / ml of nonculturable population); 3) 10^3 inactivated cells (pasteurization at 60 °C in 70 % ethanol, 30 min). Mice were observed daily for 14 days to register the death and extraction of internal organs. Liver and spleen of dead mice were removed and homogenized in 1.0 ml of FBS to detect restored *Salmonella* cells by seeding on selective medium bismuth sulfite agar (BSA). **Results and discussion.** In this study *S. enterica* cells in the exponential growth phase, exposed to ethanol (final concentration 20 %) lost culturability within 60 minutes. After 50 minutes of exposure with ethanol culturability of bacterial suspensions was outside evaluation cup method. At the same time, the integrity of cell membranes was determined at $4 \log_{10}$ cells/ml. Bacteria that become VNC state can restore culturability. Thus, the state is reversible. Importantly, the resuscitation of VNC *in vitro*, which is achieved by simply eliminating or VNC induction factor (increasing the growth temperature, availability of nutrients) or more complex conditions such as a combination of environmental and chemical stimuli, does not reveal the full pathogenic potential of resuscitated bacteria. Therefore, the process of *Salmonella* resuscitation *in vivo*, we studied on infection model in mice. In experiments *in vivo* *S. enterica* resuscitation death of test animals was observed in 13.3% ($p < 0.05$) during the observation period, with 100% mortality in the group of animals infected with a suspension of living culturable cells *Salmonella* and 100% survival of the animals in the control group (who received injections of inactivated bacteria). From the dead mice from homogenates of internal organs plated recovered salmonella, which was confirmed by their growth on BSA. **Conclusions.** Under conditions *in vivo* recovery process VNC *S. enterica* cells can occur, but with low

intensity in healthy mice (at 13.3%, $p < 0.05$). However, these cells retain pathogenic potential and can represent a danger if their underestimation. We can assume that the bacteria lose their virulence in part, but manifest it in individuals with a weak immune response.

Key words: VNC, *Salmonella*, resuscitation.