

**Abstract**

**Sukhodub L.B.\***, Yudin I.P.,  
Gushilik B.I., Pokhil S.V.,  
Kazmirchuk V.V.

*State Institution "Institute of Microbiology and Immunology named after II Mechnikov NAMS Ukraine"  
14-16, Pushkinskaya street,  
Kharkov, 61052, Ukraine*

### **DETERMINATION NONCULTURABLE STATE OF ENTERO-BACTERIA BASED ON ELECTROCHEMICAL ACTIVITY**

Under the influence of the environment pathogenic bacteria may become viable, but nonculturable characterized by the inability of microorganisms to grow in vitro. Indicator assessing the viability of microorganisms enough depends on the characteristics of the method used and the subjective factor, so it becomes more urgent precise quantitative analysis of viable bacteria in the material. The objective of this study was to develop methods for determining the status nonculturable bacteria *E. coli*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. enteritidis*, caused by the action of a biocide - sodium hypochlorite by fluorescence microscopy on membrane filters using fluorochromes rhodamine 123 to identify viable cells and propidium iodide, as an indicator of non-living cells. Research has shown that even after 300 seconds in the biocide action of 1 mg/l of active chlorine still possible to identify viable microorganisms, while under the standard method for seeding onto solid medium the culturability *E. coli* and *S. enteritidis* was observed only after 10 second action said biocide concentration, *S. sonnei* and *S. flexneri* under these conditions did not show the growth. All tested microorganisms cultured at 20°C, proved to be more resistant to biocide than cultured at 37 °C.

**Keywords:** enterobacteria, nonculturable state, method of fluorescence microscopy on membrane filters.

**Corresponding author:** \*l.sukhodub@gmail.com

**Резюме**

**Суходуб Л.Б.**, Юдін І.П.,  
Гушилик Б.І., Похил С.В.,  
Казмірчук В.В.

*ДУ Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України»,  
вул. Пушкінська, 14, Харків,  
61057, Україна*

### **ВИЗНАЧЕННЯ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОГО СТАНУ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ЗА ОЗНАКОЮ ЕЛЕКТРОХІМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ**

Під впливом оточуючого середовища бактерії з патогенними властивостями можуть переходити в життєздатний, але некультурабельний стан, який характеризується неспроможністю мікроорганізмів до росту in vitro. Показник оцінки життєздатності мікроорганізмів є достатньо залежним від особливостей використаного методу і суб'єктивного чинника, тому стає більш актуальним точний кількісний аналіз життєздатних бактерій у досліджуваному матеріалі. Задачею даного дослідження стала розробка методики визначення некультурабельного стану бактерій *E. coli*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. enteritidis*, спричиненого дією біоциду - гіпохлориту натрію методом флюоресцентної мікроскопії на мембранних фільтрах із застосуванням флюорохромів родамін 123 для ідентифікації життєздатних клітин та йодиду пропідію, як індикатора неживих клітин. Результати досліджень показали, що навіть через 300 секунд дії біоциду у дозі 1 мг/л активного хлору ще вдається виявляти

життєздатні мікроорганізми, в той час, як при стандартному методі висіву на тверде поживне середовище культурабельність *E. coli*, *S. enteritidis* спостерігається тільки після 10 секундної дії біоциду вказаної концентрації, а *S. sonnei* та *S. flexneri* за зазначених умов взагалі не проявляють росту. Всі досліджені мікроорганізми, культивовані при температурі 20 °С, виявилися більш стійкими до дії біоциду, ніж культивовані при 37 °С.

**Ключові слова:** ентеробактерії, некультурабельний стан, метод флюоресцентної мікроскопії на мембранних фільтрах.

#### Резюме

Суходуб Л.Б.\*, Юдін І.П.,  
Гушлик Б.И., Похил С.В.,  
Казмирчук В.В.

ГУ "Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины",  
ул. Пушкинская, 14-16, Харьков,  
61052, Украина

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПО ПРИЗНАКУ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Под влиянием окружающей среды бактерии с патогенными свойствами могут переходить в жизнеспособное, но некультурабельное состояние, характеризующееся неспособностью микроорганизмов к росту *in vitro*. Показатель оценки жизнеспособности микроорганизмов существенно зависит от особенностей использованного метода и субъективного фактора, поэтому становится более актуальным точный количественный анализ жизнеспособных бактерий в исследуемом материале. Задачей данного исследования стала разработка методики определения некультурабельного состояния бактерий *E. coli*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. enteritidis*, вызванного действием гипохлорита натрия методом флюоресцентной микроскопии на мембранных фильтрах с применением флюорохромов родамин 123 для идентификации жизнеспособных клеток и йодида пропидия, как индикатора неживых клеток. Результаты исследований показали, что даже через 300 секунд действия биоцида в дозе 1 мг/л активного хлора еще удается выявлять жизнеспособные микроорганизмы, в то время, как при стандартном методе посева на твердую питательную среду культурабельность *E. coli*, *S. enteritidis* наблюдается только после 10 секундного действия биоцида указанной концентрации, а *S. sonnei* и *S. flexneri* при указанных условиях вообще не проявляют роста. Все исследованные микроорганизмы, культивируемые при температуре 20 °С, оказались более устойчивыми к действию биоцида, чем культивируемые при 37 °С.

**Ключевые слова:** энтеробактерии, некультурабельное состояние, метод флюоресцентной микроскопии на мембранных фильтрах.

Автор, відповідальний за листування: \* l.sukhodub@gmail.com

#### Вступ

Зміна умов оточуючого середовища впливає на генетичну складову мікроорганізмів, в результаті чого бактерії з патогенними властивостями можуть переходити в життєздатний, але некультурабельний стан, який характеризується неспроможністю мікроорганізмів до росту на поживних середовищах [1, 2]. Починаючи з часу появи в науковій літературі й дотепер терміно-

логія "viable but nonculturable" (VBNC) – "життєздатний, але некультурабельний" є ключовою в даному контексті [3], і означає стан бактеріальної клітини, при якому вона проявляє метаболічну активність (виявлену прямими мікроскопічними методами), але не здатна до безперервного клітинного розподілу в середовищі, яке звичайно підтримує ріст такої клітини [4]



Достовірною оцінкою життєздатності мікроорганізмів способом культивування зіштовхується з багатьма відомими проблемами, у тому числі й такими істотними, як відсутність селективних умов для виділення, межа виявлення, неможливість розділити бактеріальні скупчення й біоплівки. Культивування бактерій *in vitro* - це спроба моделювання умов їхнього існування в різноманітних природних біотопах. В результаті того, що практично неможливо точно відтворити умови росту бактерій у штучному середовищі, показник оцінки життєздатності мікроорганізмів є достатньо залежним від суб'єктивного фактора. Тому для контролю сучасних бактеріальних інфекцій, поряд із встановленням ознак патогенності, стає більш актуальним точний кількісний аналіз життєздатних бактерій у досліджуваному матеріалі.

Основною задачею даного дослідження була розробка методики визначення некультурабельного стану ентеробактерій під дією біоциду - гіпохлориту натрію методом флюоресцентної мікроскопії на мембранних фільтрах (ФММФ).

#### Матеріали та методи

У роботі використовувалися штами *Escherichia coli* O-111, *Shigella sonnei* ДІСК 5772, *Shigella flexneri* ДІСК 170, *Salmonella enteritidis* гр. Д, № 27, отримані з Музею патогенних для людини мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України». Бульйон та агар Лерія-Бертані (LB) з рН 7,5 та 7,0 відповідно, натрієво-фосфатний буфер (ФБ) готувалися на дистильованій проавтоклавованій воді ( $t = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 хв). Для рідких середовищ і буферів застосовувалася додатково фільтрація води через мембранні фільтри «Millipore» SLGS, діаметр пор 0,22 мкм для виключення будь-яких нерозчинних часток. В якості біоциду використовували гіпохлорит натрію (NaOCl) (марка А, Держстандарт 11086-76 з масовою концентрацією активного хлору, 40-60 г/дм<sup>3</sup>). В якості флюоресцентних зондів використовували йодид пропідію, або (propidium iodide, PI), родамін 123 (rhodamine 123, Rh123). Додаткові матеріали: етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), трис-гідроксиметил-амінометан (TRIS).

Отримання стресових популяцій бактерій під дією біоциду. Для отримання стресових популяцій бактерій використовувався метод, описаний Morishige зі співав., в авторській модифікації [5]. При цьому, бактерії вирощувалися до ек-

спонентної фази в бульйоні LB. Культури були двічі відмиті центрифугуванням при 6000 g упродовж 10 хвилин, ресуспендовані у ФБ до концентрації близько  $1,5 \times 10^8$  клітин/мл (кл./мл), що відповідає 0,5 одиницям за шкалою McFarland. До вибірок бактеріальних суспензій, розведених до кінцевих концентрацій  $1,5 \times 10^6$  чи  $1,5 \times 10^7$  кл./мл, був доданий біоцид. Після експозиції та серійних розведень вибірки фільтрували на мембранні фільтри і фарбували для флюоресцентної мікроскопії, або висівали на чашки з агаром LB для визначення культурабельності.

#### Визначення життєздатності бактерій стандартним методом посіву.

Зразки розведень суспензій об'ємом 0,1 мл висівали на поверхню LB агару чашок Петрі скляним шпателем методом поширення по поверхні та інкубували впродовж 18-24 годин при 37 °C або впродовж 36-48 годин при 20 °C. По закінченню інкубації колонії підраховувались за допомогою мікроскопу МБР-2 (загальне збільшення 2,5).

#### Визначення загальної кількості та кількості фізіологічно активних клітин бактерій методом ФММФ.

Життєздатні клітини бактерій, що характеризуються певним енергетичним статусом та цілісністю мембран, мають градієнт мембранного електрохімічного потенціалу - 100 мВ [6]. Наявність життєздатних клітин визначали методом ФММФ за допомогою флюоресцентного зонду Rh 123 (максимум збудження 510 нм, максимум емісії 534 нм, зелено-жовта флюоресценція), в модифікації методу Hewitt [7]. Rh 123 у кінцевій концентрації 10 мкг/мл додавався до підготовлених зразків мікроорганізмів. Час інкубації, визначений експериментально, складав 15 хвилин. Клітини бактерій, що осідали на фільтрі, дофарбовувалися розчином PI, у кінцевій концентрації 5 мкг/мл, що застосовувався, як індикатор неживих клітин, час його контакту з клітинами складав 2 хвилини. Підраховували не менше 150 клітин у 10 рандомізованих полях зору, при цьому спочатку визначали кількість фізіологічно активних, родамін-позитивних (Rh+) бактерій. Потім у тому ж полі зору проводився облік інтактних, пропідіум йодид-позитивних (PI+) клітин. Основні розчини барвників готувалися наступним чином: PI - 200 мкг/мл у дистильованій воді, Rh 123 - 10 мг/мл в етанолі.

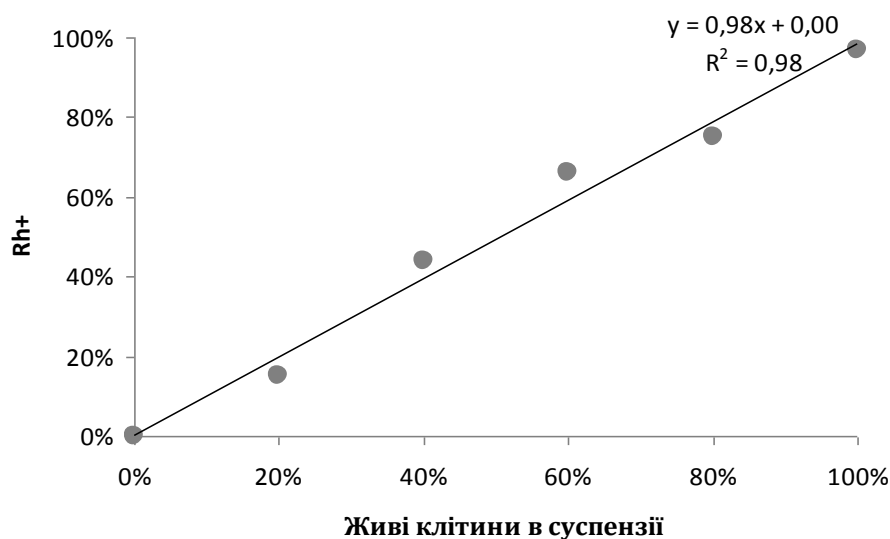


Статистична обробка отриманих даних проведена із використанням програми Excel (MS Office 2003) з визначенням геометричного середнього та вірогідності розбіжностей ( $p$ ) показників груп. Для аналізу кореляційних залежностей показників життєздатності використовувалася регресійний аналіз.

#### Результати та обговорення

У ході досліджень було виявлено, що найбільш прийнятними умовами для застосування барвника Rh123 є додавання суміші EDTA та TRIS буферу (10 ммоль TRIS, 1 ммоль EDTA, рН = 8). Оптимальний термін фарбування, критерієм якого була найбільша кількість виявлених клітин з зеленою флуоресценцією, становить 15 хвилин.

Для визначення ступеню достовірності отриманих методом ФММФ даних щодо кількості живих Rh<sup>+</sup> з зеленою флуоресценцією та інтактних PI<sup>+</sup> з червоною флуоресценцією клітин проводили підрахунок червоних та зелених клітин у сумішах із відомим співвідношенням (0, 20, 40, 60, 80, 100 %) між живими та інтактними клітинами. З метою деполяризації клітин їх обробляли розчином граміцидину (20 мкг/мл) впродовж 10 хвилин із подальшим висівом на тверде живильне середовище для підтвердження статусу цих клітин, як інтактних. Коефіцієнт кореляції отриманих даних змішаних суспензій з відомими концентраціями складав  $r^2 = 0,98$  (Рис. 1).



**Рисунок 1**

Кореляція між кількістю живих клітин у змішаних суспензіях і підрахованих ФММФ після фарбування Rh 123 для *Escherichia coli*. Кожна крапка даних - середнє геометричне трьох паралельних досліджень однієї змішаної суспензії.

Для порівняння кількості Rh<sup>+</sup> бактерій, які мають електрохімічний мембранний потенціал, та кількості культурабельних бактерій в одній виборці також тестувались суміші живих та деполяризованих клітин з відомим вмістом живих клітин від 0 до 100%. Rh<sup>+</sup> бактерії підраховували методом ФММФ. Паралельно в кожній виборці методом висіву на тверде поживне середовище з наступною інкубацією при 37 °C та 20 °C впродовж 24-36 годин визначали число клітин, що утворювали колонії, що виражалось у колонієутворюючих одиницях (КУО). Результати визначення кількості Rh<sup>+</sup> клітин добре корелювали

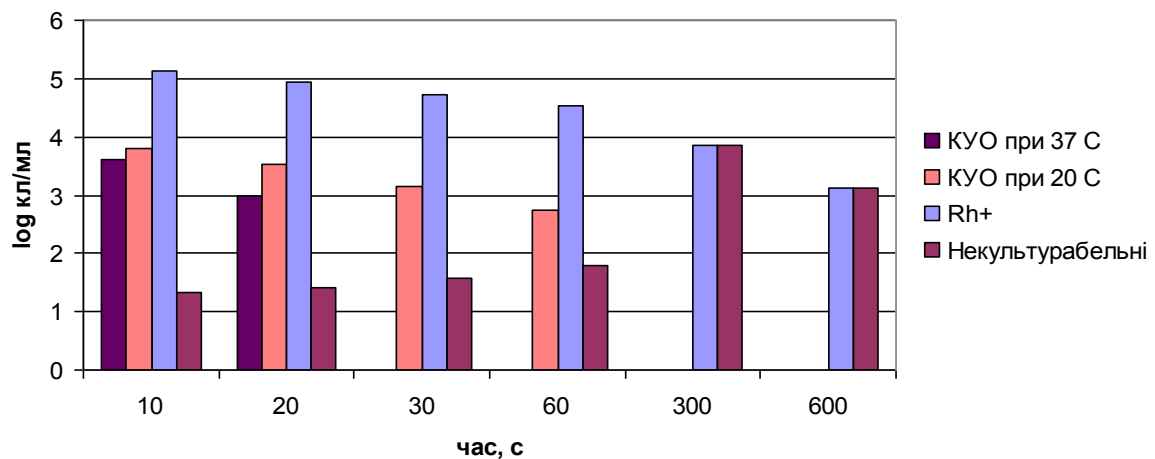
(прямий, сильний зв'язок) із кількістю культурабельних бактерій ( $r^2 = 0,96 - 0,98$ ).

Подальші дослідження були направлені на вивчення впливу NaOCl на ступінь некультурабельності взятих в експеримент ентеробактерій. Відомо, що хлорування культивованих бактерій викликає зміни параметрів життєздатності та культурабельності. Для обробки суспензій мікроорганізмів застосовували розчини гіпохлориту натрію різних концентрацій (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 1,0 мг/л) з різним терміном експозиції: 10, 20, 30, 60, 300, 600 секунд. Всі зразки після індукування біоцидом терміново аналізували методом

ФММФ. Таким чином, визначали: а) кількість  $Rh^+$  бактерій, які зберігають електрохімічний мембранний потенціал; б) кількість культурабельних бактерій методом висіву на поживне середовище; в) частку некультурабельних бактерій у зразках ( $N$ ), яка складала різницю між кількістю  $Rh^+$  бактерій ( $A$ ) й найбільшим показником висіваєності ( $C$ ), тобто:  $N = A - C$ .

Аналіз отриманих результатів показав, що після дії 0,01 мг/л впродовж 600 секунд всі зразки *E. coli* проявляють життєздатність. При цьому кількість культурабельних клітин складала  $2,3 \cdot 10^3$  КУО/мл,  $Rh^+$  -  $1,4 \cdot 10^4$  кл/мл і некультурабельних -  $1,2 \cdot 10^4$  кл/мл. Починаючи з концентрації NaOCl 0,02 мг/л хлорування впродовж 600 секунд знищує всі культурабельні клітини мікроорганізму. В той же час життєздатність мікроорганізмів, що визначена методом

ФММФ, спостерігається навіть через 300 секунд індукції біоцидом з концентрацією 1 мг/л. При цьому, кількість некультурабельних, але життєздатних за наявності електрохімічного мембранного потенціалу була близькою  $10^3$  КУО/мл, що становить 0,05 % від загальної кількості даної вибірки. Подібні дані було отримано для *S. sonnei*, *S. flexneri* та *S. enteritidis*, підданих дії NaOCl. На Рис. 2 продемонстровано співвідношення між життєздатними ( $Rh^+$  за методом ФММФ), культурабельними (за традиційним методом висіву на агар) та некультурабельними (за розрахунком) клітинами *S. enteritidis* гр. Д, № 27 після дії гіпохлориту натрію. Очевидно, що збільшення часу дії біоциду призводить до зменшення кількості культурабельних клітин, в той час, як кількість життєздатних, але некультурабельних - збільшується.



**Рисунок 2**

Суспензії *S. enteritidis* при піддаванні гіпохлоритом натрію у дозі активного хлору 0,01 мг/л в різні проміжки часу.

### Висновки

Таким чином, використання методу ФММФ із застосуванням барвника Rh123 є ефективним для визначення некультурабельного стану ентеробактерій, індукованого біоцидами, за ознакою їх електрохімічної активності. Навіть через 300 секунд індукції біоцидом NaOCl з концентрацією 1 мг/л вдається виявляти життєздатні мікроорганізми, в той

час, як при стандартному методі висіву на поживне середовище, культурабельність *E. coli*, *S. enteritidis* спостерігається тільки після 10 секунд дії біоциду вказаної концентрації. Слід відзначити, що всі досліджені мікроорганізми, культивовані за температури 20 оС, виявилися більш стійкими до дії біоциду, ніж культивовані при 37 °С.

### References (список літератури)

1. Волянський, Ю. Л. Некультурабельний стан аспорогенних бактерій: теоретичні аспекти проблеми та її практична зна-

чуєність / Ю.Л.Волянський // Інфекційні хвороби. - 2004. - №1. - С.5-9.

2. Rollins, D., Colwell R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in

- survival in the natural aquatic environment / Rollins, D., Colwell, R // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1986. - Vol.52. - P.531-538.
3. Xu, H. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in estuarine and marine environment [Text] / H. Xu, N. Roberts, F. Singleton, R. Attwell, D. Grimes, R. Colwell // *Microb. Ecol.* - 1982. - V. 8. - P. 313-323.
  4. Oliver, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria [Electronic resource] / J. D. Oliver // *FEMS Microbiology Reviews* - 2010. - V. 34. - № 4. - P. 415-425.
  5. Morishige, Y. Differential Resuscitative Effect of Pyruvate and its Analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella* / Y. Morishige, K. Fujimori, F. Amano // *Microbes Environ.* - 2013. - V. 28(2). - P. 180-186.
  6. Jayaraman, S. A novel method for the detection of viable human pancreatic beta cells by flow cytometry using fluorophores that selectively detect labile zinc, mitochondrial membrane potential and protein thiols. / S. Jayaraman. // *Cytometry Part A* - 2008. - V. 73A. - P. 615-625.
  7. Hewitt, C. J. An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. / C. J. Hewitt, G. Nebe-von-Caron // *Cytometry* - 2001. - V. 44. - P. 179-187.

*(received 10.11.2014, published online 30.03.2015)*

*(отримано 10.11.2014, опубліковано 30.03.2015)*

