НЕКУЛЬТИВИРУЕМОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

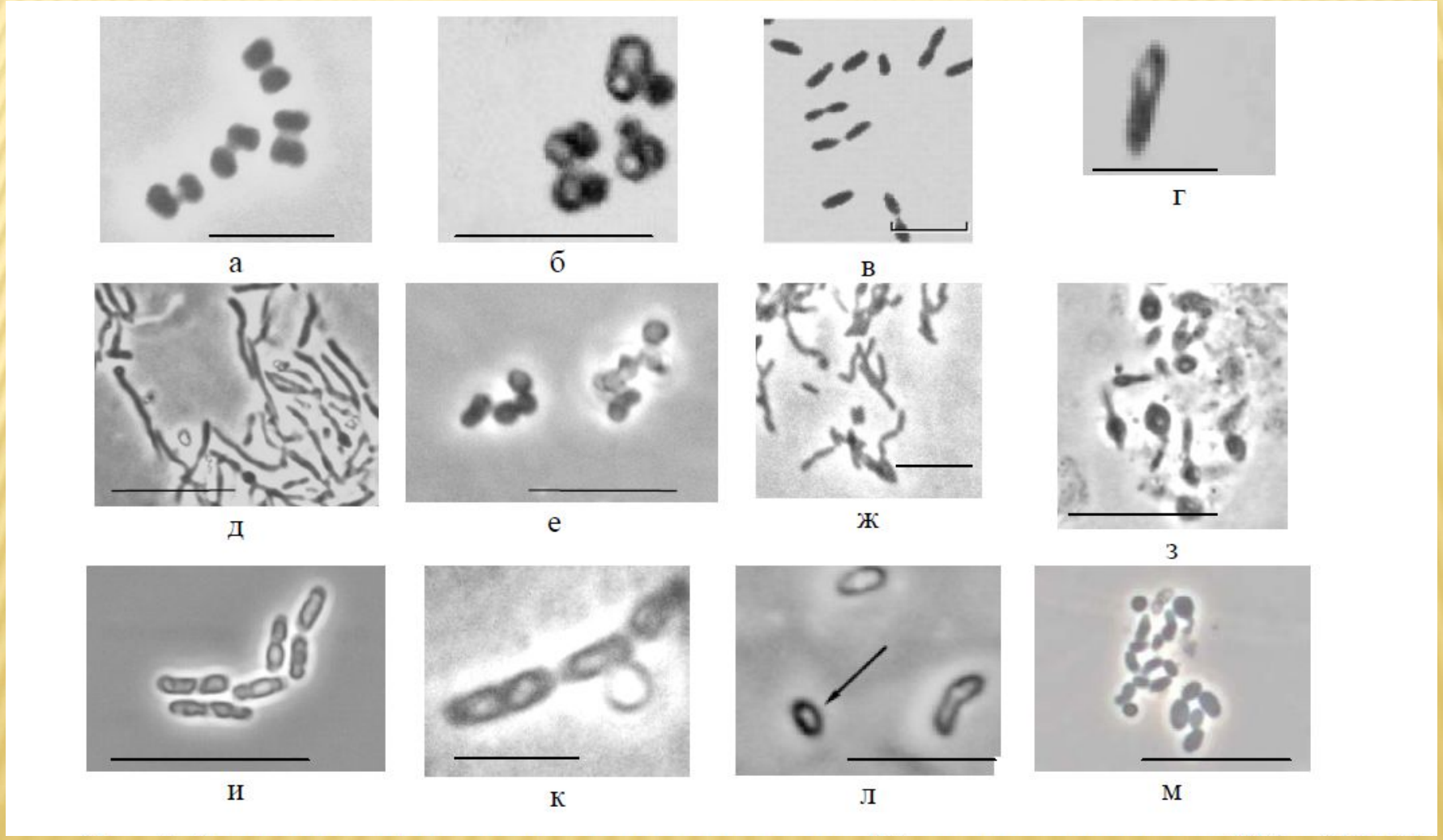
ТРАКТОВКА ТЕРМИНА «ПОКОЙ»

- Клетки культур стационарной фазы
- Некультивируемые формы
- Неактивные клетки в биопленках
- Антибиотикоустойчивые персисторы
- Клетки цистоподобного типа

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

- **ЖНС** – состояние микроорганизмов, характеризующееся прекращением роста на питательных средах в ответ на действие неблагоприятных факторов
- **45 видов**
- **30 видов** патогенны для человека, в том числе, **ВОЗБУДИТЕЛИ ХОЛЕРЫ, ТУЛЯРЕМИИ, ЛЕГИОННЕЛЕЗА**
- **15 видов** условно-патогенны для человека
- **Грамотрицательные, грамположительные, микоплазмы, археобактерии**

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ

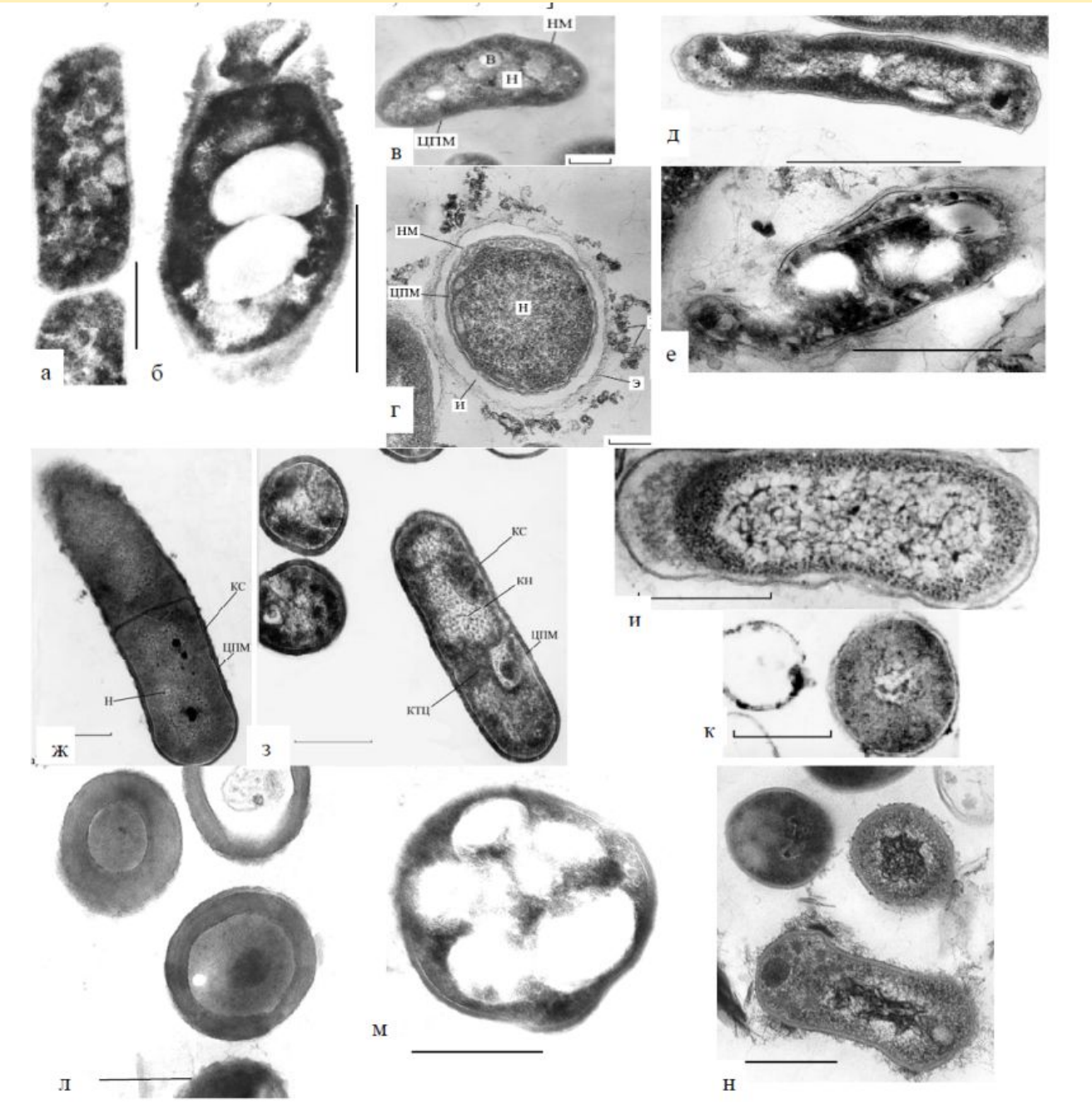


ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ

- Светопреломление (рефрактерность)

1. Усложнение и утолщение клеточных оболочек
2. Неоднородность текстуры цитоплазмы
3. Появление электронпрозрачных включений полиалконатов
4. Конденсация и компактизация нуклеоида
5. Отсутствие признаков деления
6. Бугристый рельеф клеточной поверхности
7. Переходный характер флюоресценции

СТРОЕНИЕ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ



СТРОЕНИЕ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ

Таблица 1. Структурные особенности ЦПК и их значение для выживания

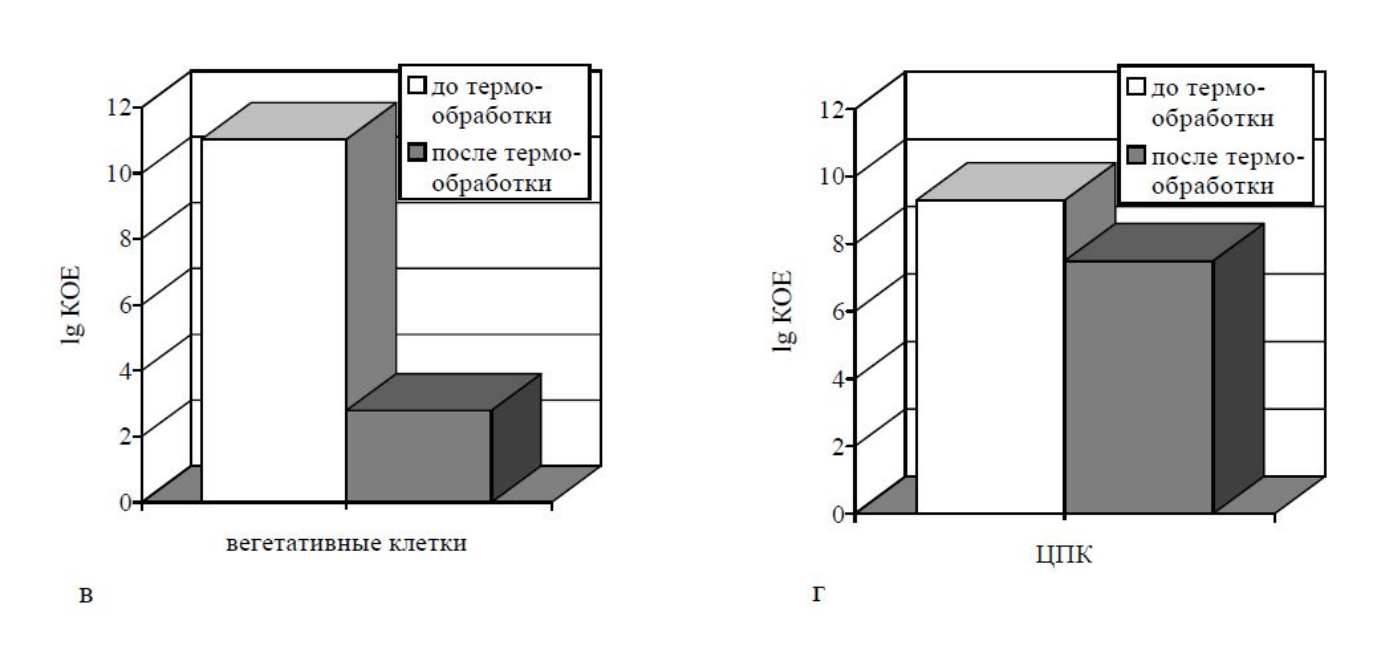
Характеристики ЦПК	**Связь с покоящимся состоянием**
Наличие капсульных слоев	Дополнительный защитный слой; матрикс для сорбции органоминеральных частиц, повышающих защиту клетки *in situ*; коммуникативная структура для передачи сигналов к развитию и поддержанию покоя и выходу из него.
Утолщенная и слоистая клеточная стенка	Обеспечение устойчивости к термообработке, действию литических ферментов и другим повреждающим физическим, химическим и биологическим факторам.
Измененное состояние клеточных мембран	Обратимая инактивация мембраносвязанных ферментов (в т.ч., электрон-транспортной цепи); изменение проницаемости мембран для моновалентных ионов и обезвоживание клетки.
Измененная структура цитоплазмы	Уменьшение числа рибосом или их агрегация, что обеспечивает обратимую инактивацию метаболизма
Компактизация нуклеоида	Обратимое прекращение репликации и транскрипции; обеспечение устойчивости генетического материала к повреждающим воздействиям;
Наличие включений	Резервный материал, утилизируемый при прорастании.

ИНДУКТОРЫ НЕКУЛЬТИВИРУЕМОГО СОСТОЯНИЯ

- Температура (+0,5-+7 ^{0}C для *Campilobacter jejuni,* 25^0 C для *Vibrio cholerae*)
- Вариации химического состава среды (повышенное содержание меди для *Agrobacterium tumerifaciens*)
- Антибиотики (ципрофлоксацин для *Mycobacterium tuberculosis*)
- γ- лучи
- Аэрация
- Чередование световой и темновой фазы (*S. typhimurium*)
- Экзометаболиты (ГМЛ, факторы d_1 - АОБ)

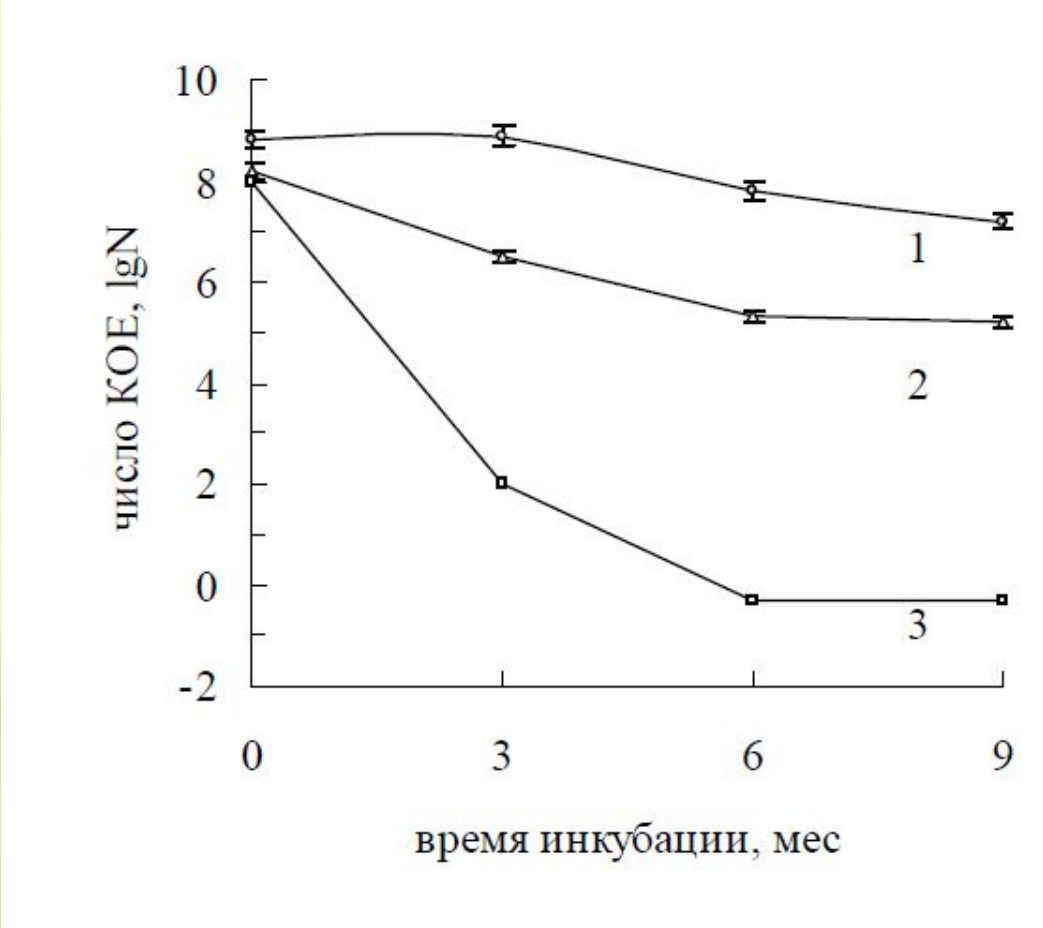
МЕТАБОЛИЗ

- Отсутстви
  дыхатель
  активност
- Низкое
  соотноше
  и высокое
  соотноше
  Ca/K
- Терморезистентн
  ость
- Устойчивость



УСЛОВИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ

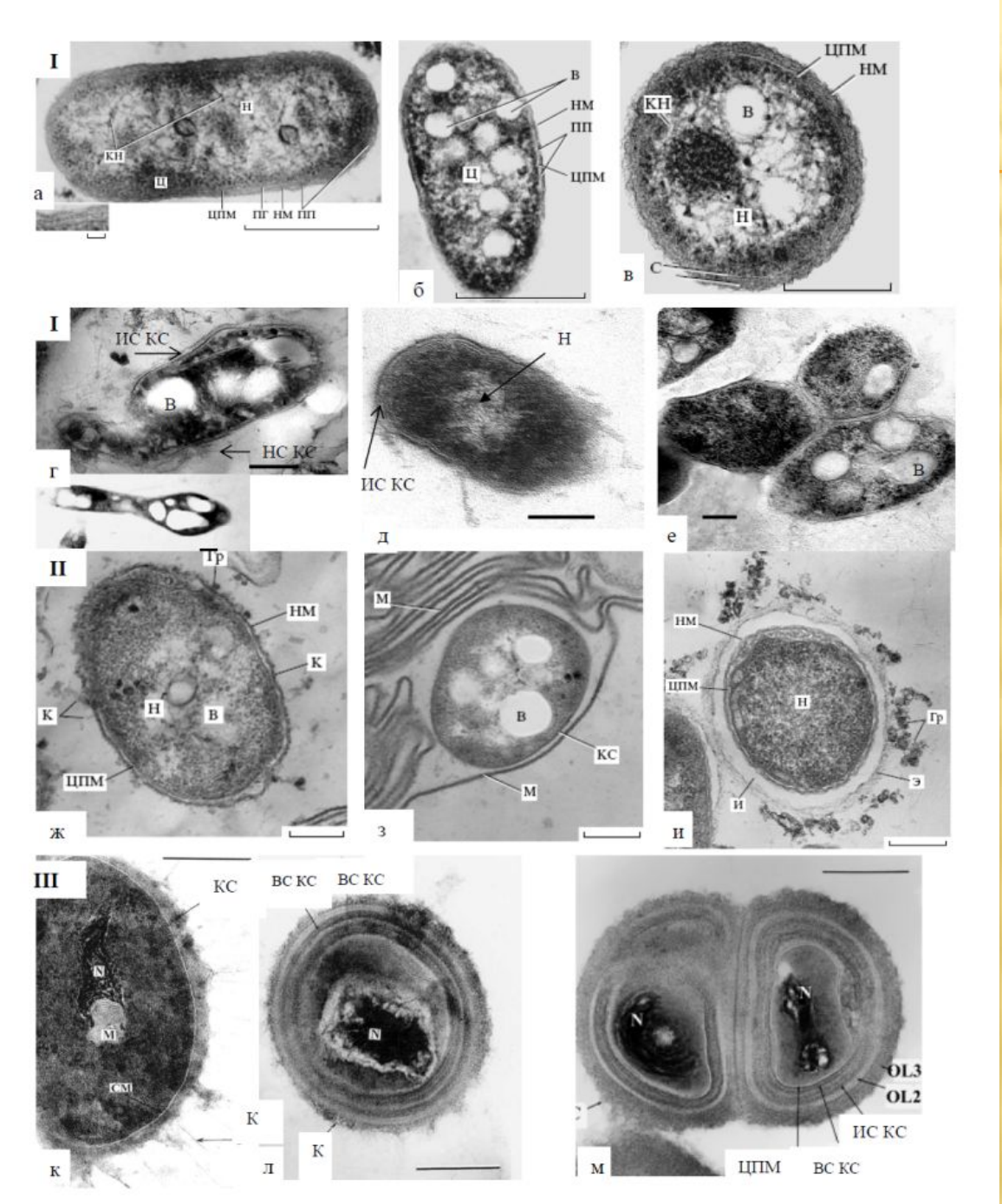
- Трофическая регуляция
- Стресс, вызванный исчерпанием пространства (избыточное количество глюкозы, индукция автолиза)
- Резкое изменение окружающих условий
- Микробные аутоиндукторы



РАЗНООБРАЗИЕ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ

Внутривидовые/ Межштаммовые

- толщина и слоистость клеточных оболочек
- наличие включений
- степень выраженности покоящегося состояния
- Полиморфизм (эндоспоры и ЦПК)
- Фенотипическая вариабельность



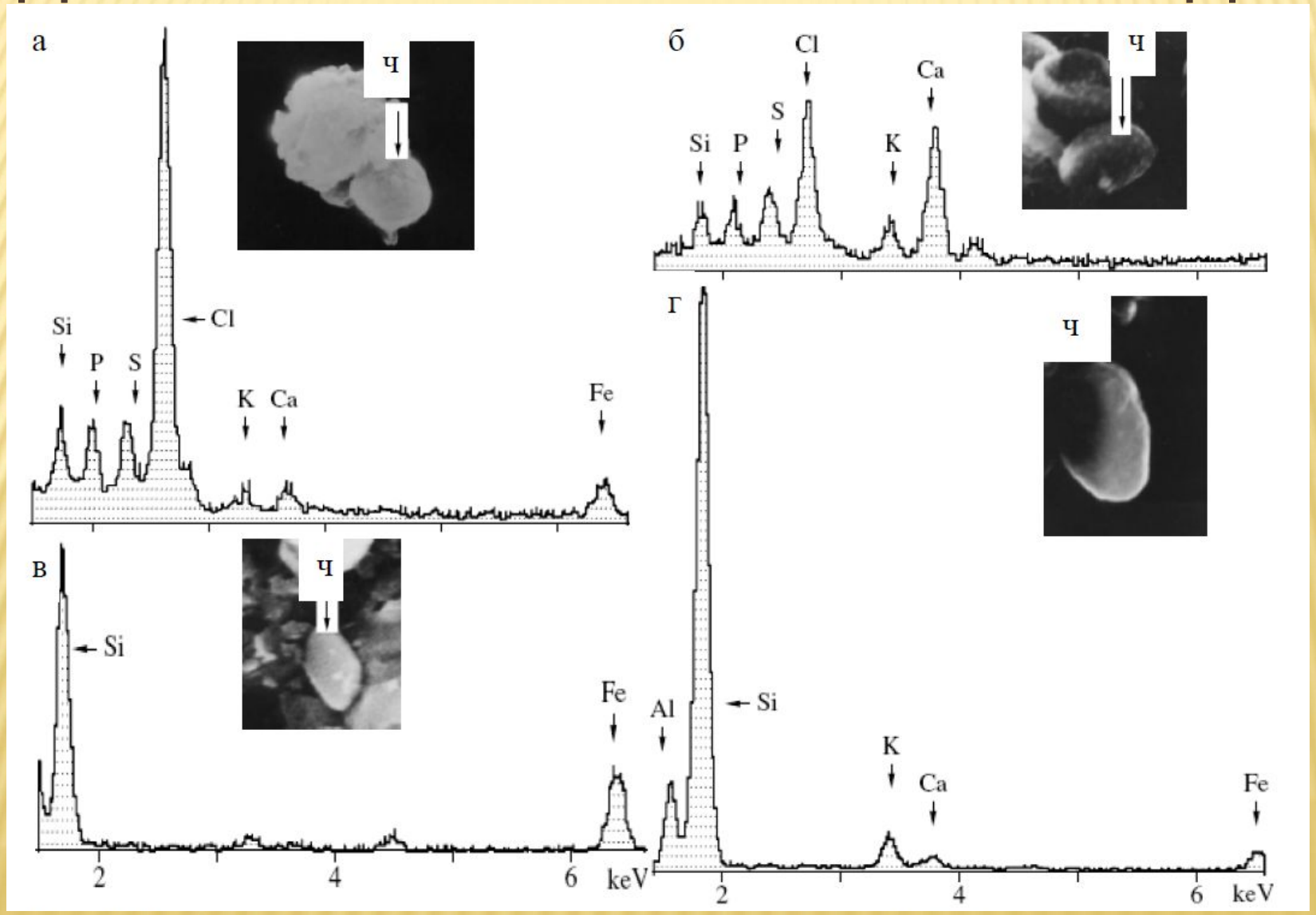
ЖНС И ДИАГНОСТИКА

- Прямые методы

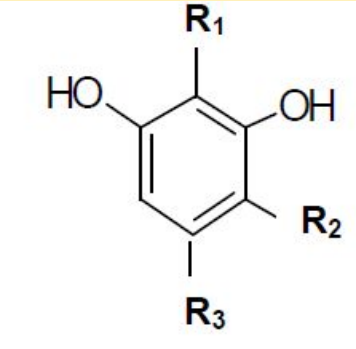
1. Электронная микроскопия
2. Метод рентгеновского анализа
3. Микроскопия препаратов, окрашенных ДНК-связывающими красителями Live/Dead

- Культуральный метод
- ПЦР анализ

ДИАГНОСТИКА. ПРЯМОЙ МЕТОД



АУТОРЕГУЛЯЦИЯ ПОКОЯЩЕГОСЯ СОСТОЯНИЯ



- Алкилризорцины, гидрохиноны

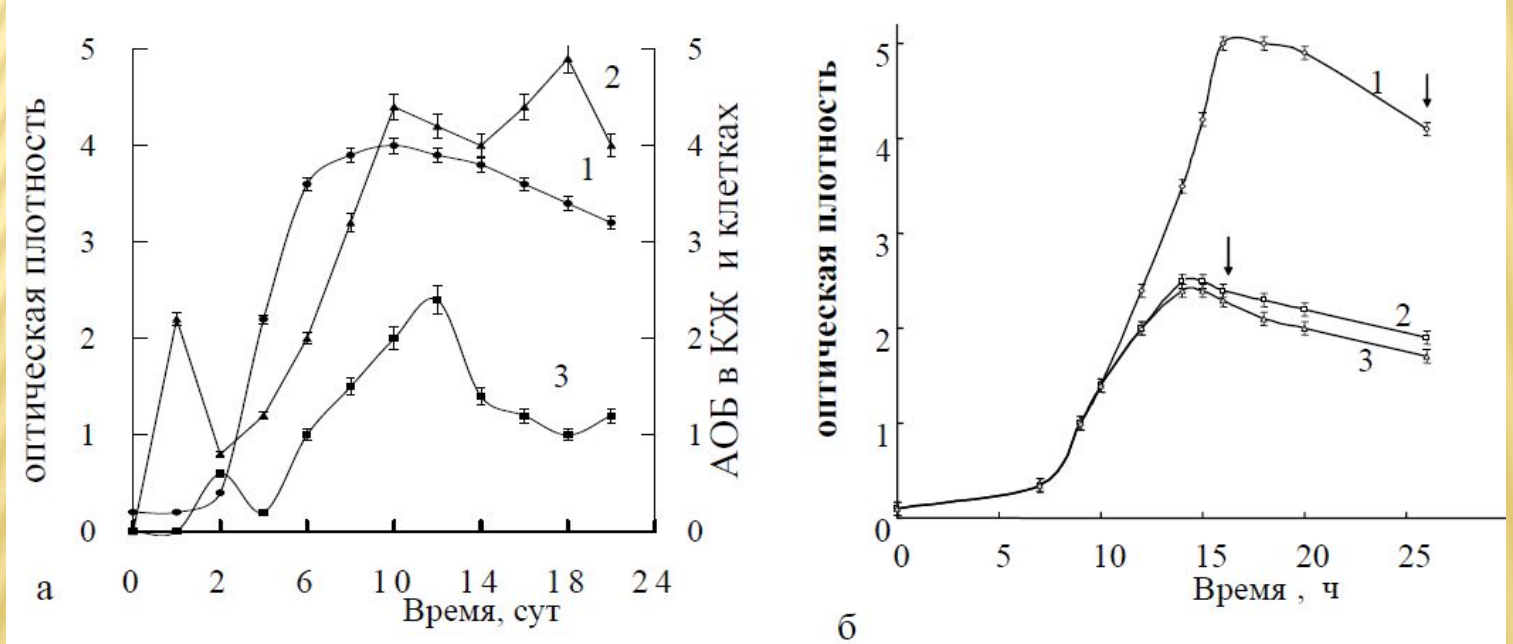


Рис. 11. (а) Динамика накопления АОБ (на единицу объема) в культуре *M. luteus*: (1) оптическая плотность культуры; содержание АОБ в (2) КЖ и (3) клетках, мг/л. (б) Развитие культуры *B. cereus* на среде для спорообразования в (1) контроле и при внесении ГСЛ (10 ч) в концентрациях: (2)10^{-4} М и (3)10^{-3} М. Время начала спорообразования отмечено стрелками.

АОБ И ДНК

- Эластовязкость
- Концентрация АОБ точки излома соответствовала концентрации, индуцирующей ЦПК (псевдомонады)
- Повышение температуры плавления
- Защита при УФ-излучении
- Конформационная подвижность
- Гипохромный эффект
- Сдвиг максимума флюоресценции

Таблица 2

Регистрируемые эффекты	Причины их возникновения
Гипохромизм смеси АОБ-ДНК	Взаимодействие гидроксильных радикалов АОБ и ДНК с образованием водородных связей; экранирующие эффекты
Сдвиг максимума флюоресценции АОБ в сторону коротких длин волн	Переход алкильных радикалов АОБ в гидрофобное окружение
Эксимеризация пирена в растворе ГР+ДНК при концентрациях меньше ККМ	Образование мицеллоподобных структур на нитях ДНК
Изменение скорости конформационного В→А-перехода ДНК	Изоляция ДНК от водного окружения
Повышение температуры плавления ДНК в присутствии АОБ	Стабилизация нити ДНК при связывании с молекулами АОБ
Защита ДНК от УФ-облучения	Экранирующие эффекты; изменение конформации ДНК под действием АОБ (В→А-переход ДНК)
Длительное сохранение вязкости и электрофоретической подвижности комплексов ДНК+АОБ в водных растворах	Изоляция ДНК от водного окружения

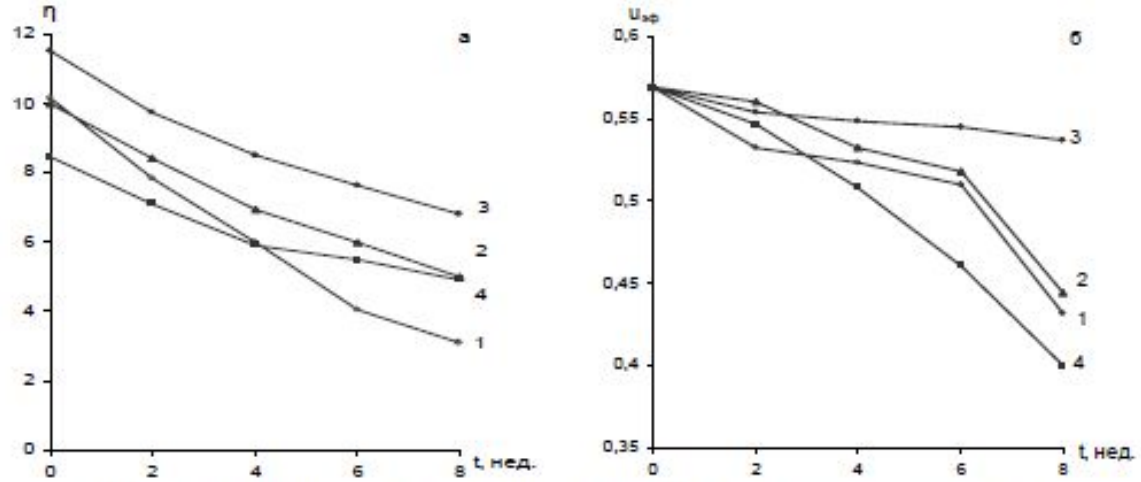


Рисунок 9 – Динамика изменения вязкостных (а) и электрофоретических (б) свойств ДНК (1), ДНК+МР(2), ДНК+ГР(3), ДНК+Т(4) при молярном соотношении 10:1.

ГИПОХРОМНЫЙ ЭФФЕКТ И ЗАЩИТА ОТ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

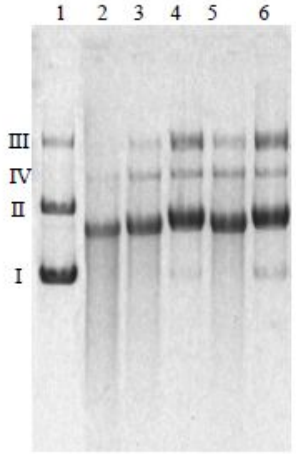


Таблица 1 – Относительное содержание ДНК в составе полос I-IV.

Образцы	Содержание ДНК, %	в том числе в составе полос, %			
		I	II	III	IV
1	100	55,7±4,3	31,2±2,7	13,1±2,6	0
2	39,9±4,1	0	38,3±2,9	0	1,6±1,1
3	53,7±5,6	0	45,2±3,0	1,9±0,9	6,6±1,9
4	77,2±4,6	5,4±1,1	46,0±3,0	18,8±1,9	7,0±1,6
5	58,6±5,7	0	45,5±3,4	6,1±1,1	7,0±2,0
6	84,0±6,1	10,0±1,7	47,1±3,4	19,9±2,4	7,0±1,9

Рисунок 8 – Электрофоретическая подвижность плазмиды pUC19 в присутствии АОБ после 3 часов УФ-облучения.
Слева – результаты электрофореза: 1 – контроль; 2 – после 3 часов облучения; 3 – то же в присутствии МР в концентрации 10^{-4}М; 4 – МР в концентрации 10^{-3}М; 5 – то же в присутствии ГР в концентрации 10^{-4}М; 6 – то же в присутствии ГР в концентрации 10^{-3}М.

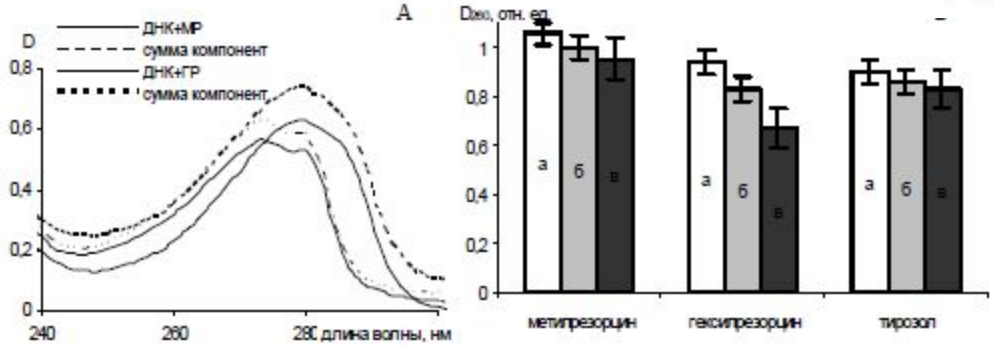


Рисунок 1 – Гипохромизм растворов АОБ+ДНК: А – спектры растворов МР+ДНК и ГР+ДНК по сравнению с суммой спектров компонентов, Б –различные концентрации МР, ГР и Т в присутствии ДНК 10^{-4}: а – 10^{-5}М, б – 10^{-4}М, в – 10^{-3}М.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ГЕКСОРЕЗОРЦИМА С ДНК

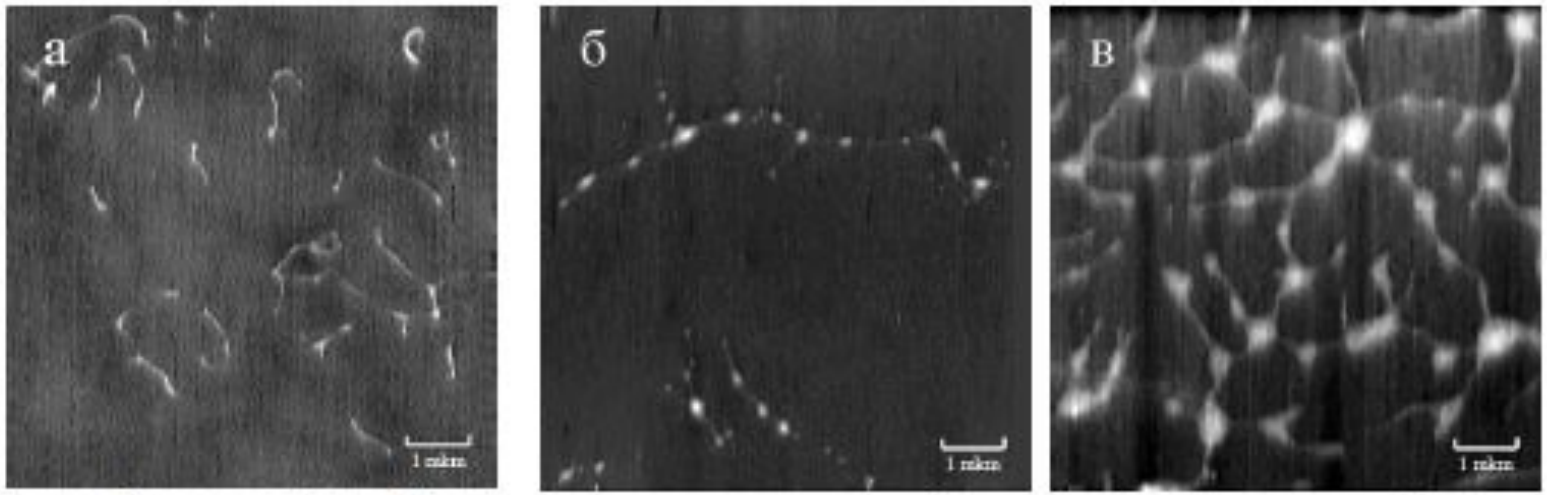
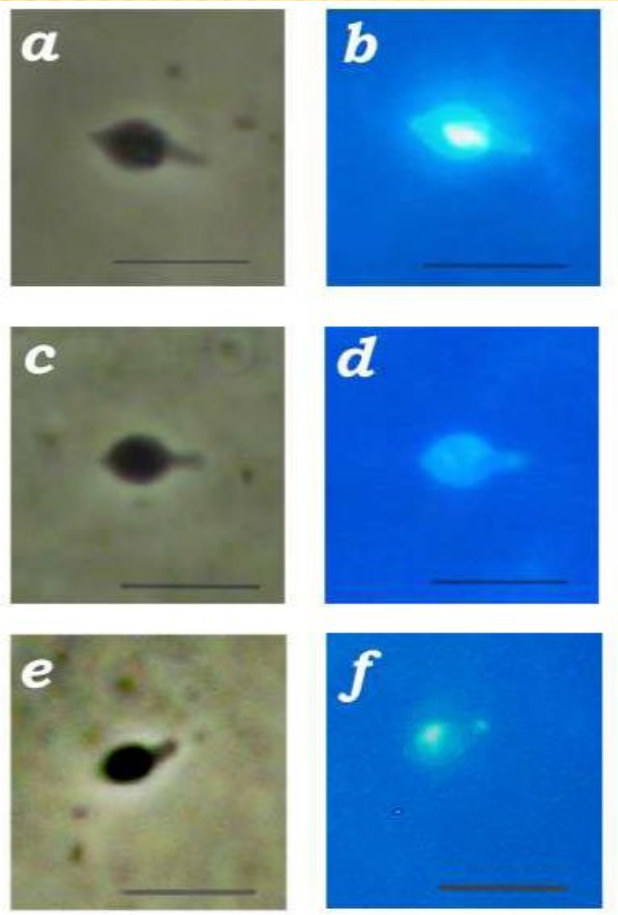
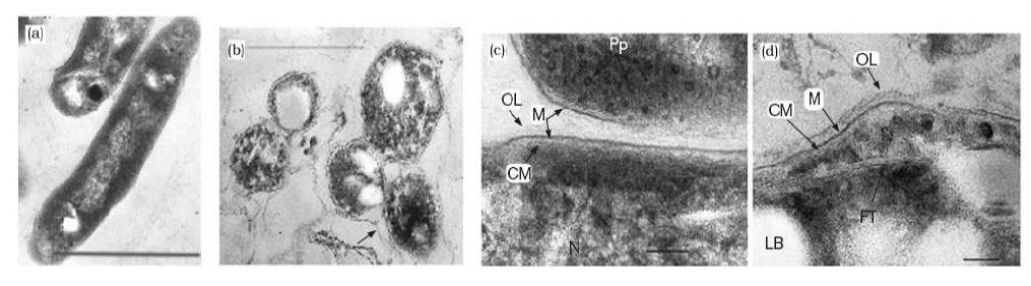


Рисунок 4 – Последовательные этапы формирования мицеллоподобных надмолекулярных структур из ГР на ДНК при различных сроках инкубации: а – интактная ДНК, б – 2-3 недели, в – 5-6 недель.

1. Линейные фрагменты
2. Мицеллоподобные структуры на ДНК, диаметро200нм
3. Утолщенные разветвленные структуры, до 1 мкм в диаметре

HLP БЕЛОК И ПОКОЯЩИЕСЯ ФОРМЫ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*





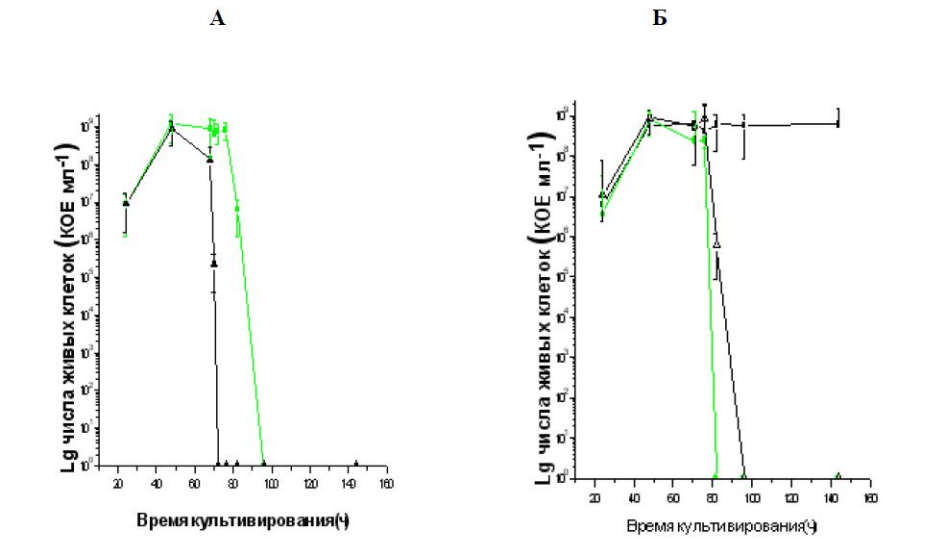


Рис. 5. Переход в некультивируемое состояние штаммов *M. smegmatis* в модифицированной среде Hartman-de Bont.
▲- штамм Wt-pMind, ■ (зеленый) - Hlp-0-pMind (А), ■ – Hlp-0-AGR, ● (зеленый) – Wt-AGR, △- Hlp-0-AGRmut (Б). Эксперименты А и В повторяли 11 раз, на рисунке представлен результат типичного эксперимента. Каждая точка КОЕ представляет средний результат 5 повторностей. Разброс показывает SD.

MYCOBACTERIUM SMEGMATIS И RPF ГЕН

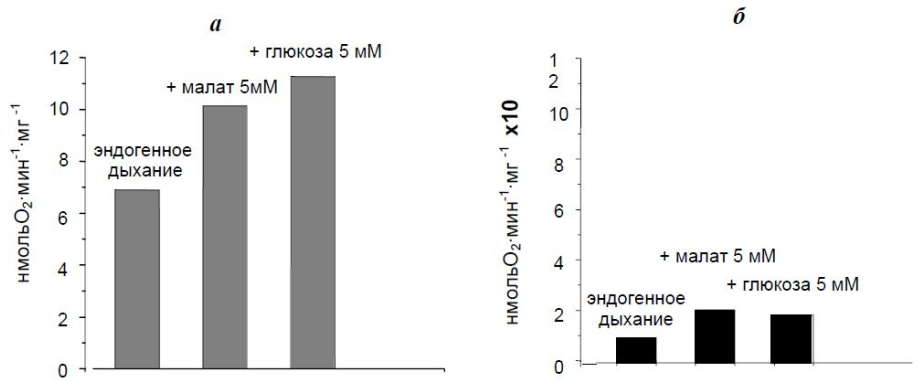


Рис. 4. Уровень дыхательной активности клеток *M. smegmatis*. *а* – метаболически активные клетки, ***б*** – НК клетки.

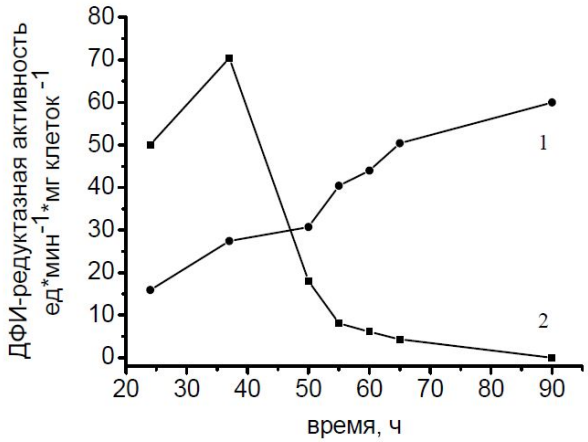


Рис. 5. ДФИ-редуктазная активность клеток *M. smegmatis*. 1 – метаболически активная культура, **2** – культура, образующая НК клетки.

MYCOBACTERIUM SMEGMATIS И *RPF* ГЕН

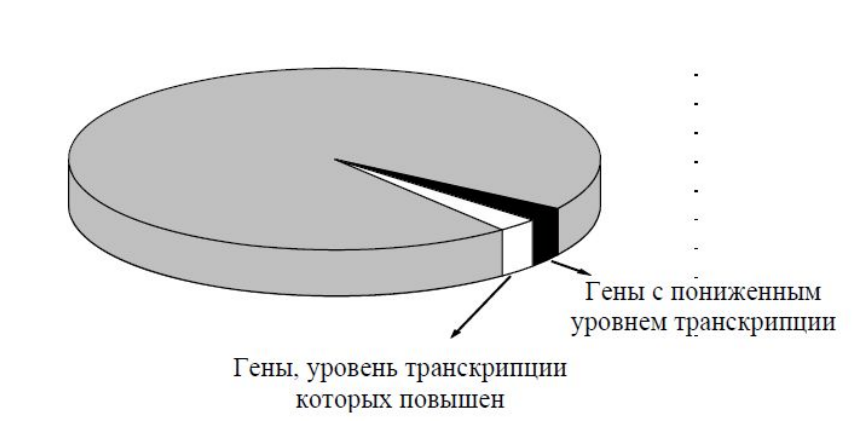
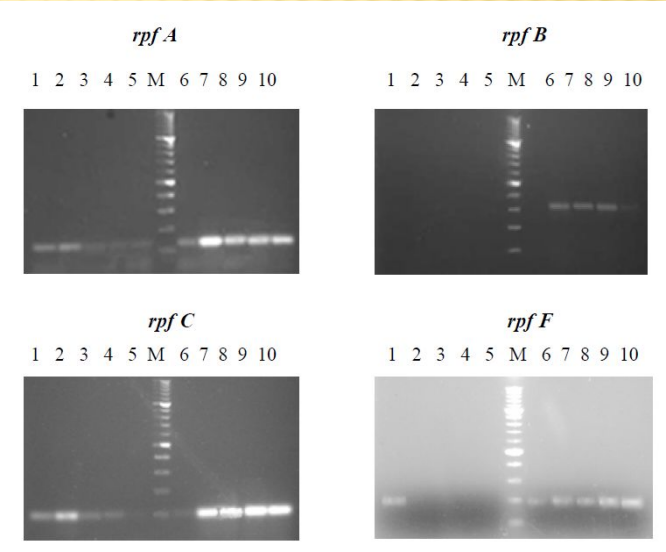


Таблица 1. Распределение белков *M. smegmatis*, гены которых обнаружили значительно повышенный уровень транскрипции (>5) в НК состоянии в зависимости от функций, выполняемых в клетке.

Rv1158, Rv1821, Rv1859, Rv2377c, Rv3879, Rv3899c	Транспортные белки
Rv0845, Rv1009, Rv1267, Rv1884c, Rv3133c, Rv3327	Регуляторные белки
Rv0527, Rv2344c, Rv3777	Энергетический метаболизм
Rv0129c, Rv0341, Rv2934	Белки клеточной стенки
Rv0310c, Rv0695, Rv1399c, Rv3813c	Гидролазы
Rv0165c, Rv1641, Rv3060c, Rv3246c, Rv3291c, Rv3833	Регуляция транскрипции и трансляции
Rv0435c, Rv2154c	Деление клеток
Rv0382c, Rv1381, Rv2139	Биосинтез пиримидинов
Rv0282, Rv0940c, Rv1279, Rv1895, Rv2002, Rv2266, Rv2996c, Rv3774	Различные «неэнерге-тические» оксидоредуктазы
Rv0048c, Rv0310c, Rv0574c, Rv0735, Rv1491c, Rv1509, Rv2340, Rv2704, Rv3230, Rv3516, Rv3529c, Rv3786c, Rv3810, Rv3879c, Rv3910, Rv3922c	Гипотетические белки

MYCOBACTERIUM SMEGMATIS И *RPF* ГЕН



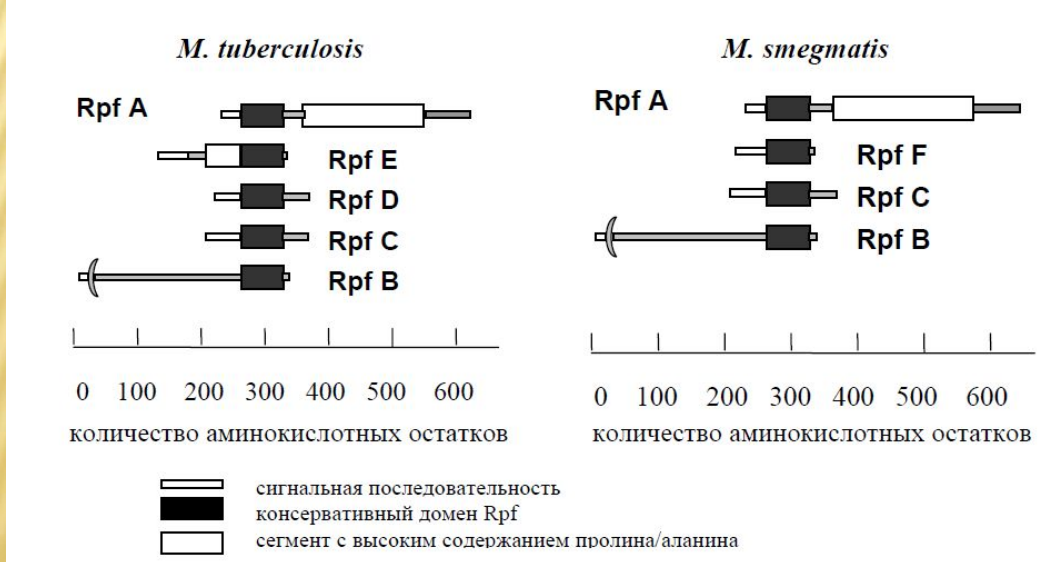


Рис. 12. Схема строения белков семейства Rpf рода *Mycobacterium*.

M. TUBERCULESIS И *RPF* ГЕН

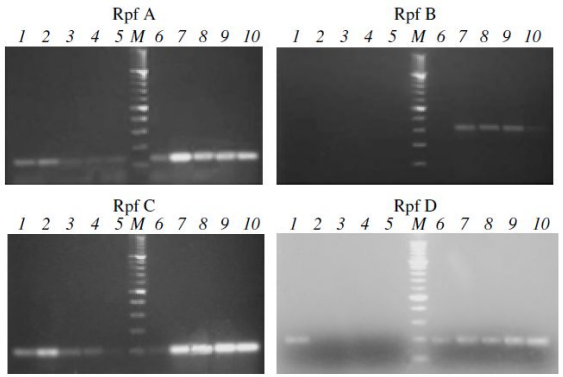


Рис. 5. RT-PCR анализ уровня экспрессии генов, кодирующих белки семейства Rpf *M. smegmatis* при росте с образованием НК клеток: дорожки *1* – 24 ч, *2* – 48 ч, *3* – 72 ч, *4* – 96 ч, *5* – 120 ч, и в активнорастущей культуре, дорожки *6* – 24 ч, *7* – 48 ч, *8* – 72 ч, *9* – 96 ч, *10* – 120 ч. М – маркеры длины фрагментов ДНК (п.н.).

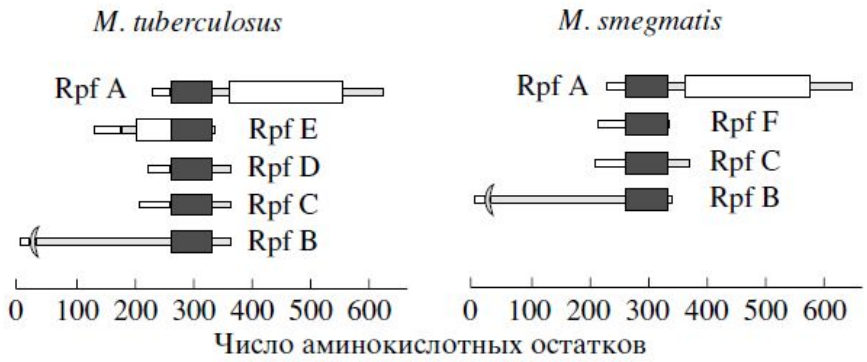


Рис. 4. Предполагаемая структура белков семейства Rpf *M. tuberculosis* (а) и *M. smegmatis* (б): @ – сигнальная последовательность; @ – консервативный Rpf-домен; @ – сегмент с высоким содержанием пролина и аланина.

ДИССОЦИАЦИЯ КЛЕТОК И ЖНС

Тип диссоцианта культуральные признаки	**Фото диссоцианта** *A. brasilense*	**Условие получения**
S Округлые палевые колонии с гладкой поверхностью и ровнми краями		Хранение в стандартной (безлимитной) среде 3 сут при +20^{0}С
Pg Округлые бурые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями		Хранение в физрастворе 4 мес при -20^{0}С
R Округлые колонии палевого цвета и шероховатой поверхностью		Хранение в физрастворе 14 сут при +20^{0}С
Sm Мелкие кремовые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями, частосливаются на плотной среде		Хранение в физрастворе и стандартной среде 4 мес при-20^{0}С После прогревания при 60^{0}С
Sg Кремовые колонии продолговатой формы с сегментообразным ростом		Хранение в физрастворе 4 мес при +20^{0}С
PgCr		Хранение в физрастворе 4 мес