

<https://doi.org/10.3176/biol.1981.1.09>

УДК 628.3:576.8.093

Лээло АЛТОН

АДАПТАЦИЯ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК КОММУНАЛЬНЫХ СТОЧНЫХ ВОД К РАЗНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ МОРСКОЙ ВОДЫ

С коммунальными сточными водами попадает в открытые водоемы огромное количество фекальных бактерий, в том числе кишечных палочек, которые являются индикаторными организмами при определении санитарного состояния воды.

Изучению выживаемости этих бактерий при температуре 37°С (оптимальная) и выше посвящено много работ, а выживаемость и развитие кишечных палочек при температурах значительно ниже 37° гораздо меньше изучены. Известно лишь (Meynell, 1958; Farrell, Rose, 1965, 1968; Rose, 1967; Broeze и др., 1976), что при резком понижении температуры среды обитания коли-бактерий от 37 до 5° основная масса их не погибает, однако перед развитием при 5° им требуется определенный период адаптации. Генерация клеток при 10° оказалась значительно продолжительнее, чем при 30°. По А. Гольдштейну и др. (Goldstein и др., 1964), синтез протеина в клетках *E. coli* не прекращается даже при 0°, но проходит в 350 раз медленнее, чем при 37°. Р. Митчелл (1976) отмечает, что клетки кишечных палочек сохраняют жизнеспособность в водах Северной Атлантики зимой в 10 раз дольше, чем летом, и погибают они не из-за неблагоприятной для развития температуры, а в результате конкуренции с другими микроорганизмами. Сущность адаптации этих бактерий к более низким температурам среды изучена слабо. Некоторые авторы связывают способность кишечных палочек адаптироваться к более низким температурам среды с химическим составом и рН среды (Malmcolm, 1969; Brown, Melling, 1971; Hoadley, Cheng, 1974; Dofour, Cabelli, 1975). По данным С. П. Ляха (1976), адаптация бактерий к условиям среды, которая не является оптимальной для их развития, не приводит к принципиальным изменениям организмов.

Ранее нами показано, что кишечные палочки довольно успешно размножаются в морской воде при температурах значительно ниже 37°, которая считается оптимальной для их развития. Рост бактерий при более низких температурах замедлялся (Алтон, Рахно, 1979).

По стандартной методике определения количества кишечных палочек в пробах воды (ГОСТ 18963-73) учитываются только те бактерии, которые образуют колонии при выращивании около 37°, т. е. при температуре, какую морская вода никогда не достигает в природных условиях. Эта методика, использованная нами и в исследованиях 1978 г., не позволяла более подробного изучения процессов адаптации бактерий к разным температурам.

Целью настоящей работы было установить:

1. При каких температурах клетки кишечных палочек, попавшие со сточными водами в море, продолжают интенсивно размножаться.
2. Является ли температура 37° оптимальной для развития кишечных палочек сточных вод после длительной адаптации их к более низким температурам морской воды.

Настоящая работа является продолжением исследований, проведенных нами в 1978 г. (Алтон, Рахно, 1979).

Материал и методика

Опыты проводили с морской водой Таллинской бухты. В целях устранения влияния других факторов, кроме температуры, которые могли бы оказать угнетающее действие на жизнеспособность кишечных палочек (бактерицидность морской воды, влияние других микроорганизмов), часть морской воды была обработана в автоклаве, часть — использовалась в нестерилизованном виде. В качестве посевного материала использовалась коммунальная сточная вода из коллектора сточных вод Таллина, через который она направляется в Таллинскую бухту. Посевной материал добавляли в морскую воду в количестве 10 мл на 1000 мл морской воды. Морскую воду разливали в равных количествах по стерильным колбам и выдерживали длительное время при температурах 20, 10, 5 и 0°.

Динамику развития и адаптацию кишечных палочек к разным температурам морской воды определяли по изменению количества бактерий в пробах воды. Для этого были проведены периодические высевы из опытных образцов на среду Эндо с последующим определением оксидазактивности бактерий (ГОСТ 18963-73). В стандартную методику определения коли-титра внесены некоторые дополнения. Чашки Петри с посевами на среду Эндо инкубировали параллельно при 37° и при 20, 10 или 5° в зависимости от того, при какой температуре они выдерживались в морской воде. Так как при 0° кишечные палочки не размножались, посевы из воды, температурой около 0°, инкубировали параллельно при 37 и 10°.

Продолжительность инкубирования посевов морской воды при разных температурах была установлена в ходе предварительных опытов. Прирост колоний считался законченным тогда, когда их число на чашках Петри не превышало предыдущее не более чем на 1—2 колоний. Итак, все посевы воды были инкубированы при 37° в течение 3 сут, при 20, 10 и 5° соответственно при 4, 14 и 21 сут. Полученные результаты согласуются с литературными данными (Nedwell, Floodgate, 1971) по исследованию выживаемости *E. coli* в морских осадках. С целью определения способности бактерий развиваться не только при 37°, но и при температурах морской воды были проведены дополнительные эксперименты. Для этого использовались колонии кишечных палочек, выросшие в посевах морской воды на среде Эндо: 1) при инкубировании чашек Петри при температуре 37° и 2) при инкубировании параллельных чашек с посевами из тех же вариантов опыта при температурах 20, 10 или 5°.

Клетки из первой колонии пересеивали на другие чашки Петри, которые затем инкубировали при 20, 10 или 5° в соответствии с вариантом опыта. Если после такого посева образовались колонии кишечных палочек, считали, что именно те самые клетки, которые размножались при 37°, способны размножаться и при 20, 10 и 5°, и наоборот, когда после посева роста колоний не наблюдалось, то решили, что клетки не способны размножаться.

Таким же образом проверяли способность к развитию у клеток кишечных палочек из колоний, которые предварительно находились при 20, 10 и 5°. Пересевы колоний на среду Эндо проводили периодически во всех вариантах опытов. Для каждого посева выбирали 25 колоний. Чтобы выяснить, какой промежуток времени нужен (если он вообще нужен) для восстановления нормального развития кишечных палочек при 37° после длительного пребывания их в морской воде при температурах 20, 10, 5 и 0°, колбы с морской водой, в которых на среде Эндо роста колоний не наблюдалось, подогревали до 37°. Эту температуру поддерживали до тех пор, пока количество клеток кишечных палочек не стало увеличиваться или было очевидно, что развития клеток не наблюдается.

Результаты исследования

Данные о динамике развития и выживаемости исследованных нами кишечных палочек при разных температурах стерилизованной морской воды представлены в табл. 1, откуда видно, что количество клеток, выросших в посевах при 37°, значительно отличалось от количества клеток, выросших из тех же проб воды при 20, 10 и 5°. Уже в первые дни после внесения кишечных палочек в морскую воду наибольшее количество колоний выросло при 20 и 10°, а не при 37°, как это можно было ожидать. Подобные данные получены также при посевах коммунальных сточных вод (использованы в наших опытах в качестве источника кишечных палочек).

Из табл. 1 видно, что в пробах из морской воды температурой 20° при посевах, выдержанных при 37°, количество клеток увеличивалось в течение 15 *сут* и достигало за это время титра 10^7 клеток в 1 *мл* воды (исходный титр 10^3). Через 15 дней экспозиции клетки постепенно теряли способность к развитию и через 63 дня их фактическое размножение заканчивалось.

Клетки этой же культуры, находившиеся в морской воде также при 20°, но выдержанные после посева при 20°, вели себя иначе. Способность к развитию у них сохранялась после 30-дневного выдерживания в морской воде и достигала за это время титра 10^{13} (исходный литр 10^2) клеток в 1 *мл* воды. Затем отмечено у них постепенное вымирание, но более медленное, чем при 37°.

Более низкие температуры (10 и 5°) оказывались менее благоприятными для клеток кишечных палочек, чем 20°, и это при выдерживании посевов как при 37°, так и при 10° (см. табл. 1). В данном случае исходное количество клеток опытной культуры увеличивалось в морской воде более медленно и в течение более продолжительного времени. Клетки вымирали также медленнее, чем при температуре 20°. Количество клеток кишечных палочек из проб морской воды 10 и 5°, в посевах, инкубированных при 37°, увеличивалось в течение 20 и 40 дней. Затем количество их стало уменьшаться. В параллельных опытах с теми же пробами, инкубированных не при 37°, а при 10 и 5°, количество кишечных палочек увеличивалось в течение 50 и 63 дней экспозиции. Температура морской воды 0° влияла отрицательно на развитие кишечных палочек. Количество их при этой температуре не увеличивалось, бактерии стали медленно вымирать через 30 дней от начала экспозиции. Интересно отметить, что после длительного пребывания в морской воде при 0° стало увеличиваться количество клеток кишечных палочек, способных развиваться при 10°.

Из табл. 1 видно, что через 55—63 дня экспозиции в морской воде

Таблица 2

Влияние продолжительности выдерживания в морской воде при 20, 10 и 5°C на способность клеток кишечных палочек к росту при 37°

Температура морской воды, при которой выдерживали клетки до их посева на среду Эндо $\pm 1^\circ$, °C	Длительность выдерживания в морской воде до посева, сут	Количество колоний (из 25 испытанных), клетки которых способны развиваться на среде Эндо при 37°
20	4	20
	20	17
10	45	8
	7	19
	55	14
5	64	8
	4	18
	45	10
	72	7

Таблица 3

Влияние продолжительности выдерживания в морской воде при 20, 10 и 5°C на способность клеток кишечных палочек к росту при 20, 10 и 5°

Температура морской воды, при которой выдерживали клетки до их посева на среду Эндо $\pm 1^\circ$, °C	Длительность выдерживания в морской воде до посева, сут	Количество колоний (из 25 испытанных), клетки которых способны развиваться на среде Эндо при температурах выдерживания в морской воде
20	7	18
	20	23
10	55	24
	10	12
	55	16
5	70	20
	4	2
	87	6
	114	15

при 20° (при 10, 5 и 0° соответственно через 87, 100 и 114 дней) в посевах на среду Эндо, инкубированных при 37°, роста колоний бактерий не отмечено. В то же время в параллельных опытах из тех же проб воды, но инкубированных в соответствии с вариантом опыта при 20, 10 или 5° кишечные палочки продолжали развиваться.

Результаты опытов со стерилизованной морской водой не существенно отличались от данных, полученных с нестерилизованной водой. Поэтому результаты этих опытов в настоящей работе не рассматриваются. Однако следует отметить, что кишечные палочки в стерилизованной морской воде были несколько дольше способными к развитию, чем в нестерилизованной. Представляло интерес уточнить способность клеток кишечных палочек к развитию при 37° после выдерживания их длительное время в морской воде при более низких температурах и способность их к развитию при 20, 10 и 5° (см. методику). Результаты этих экспериментов представлены в табл. 2 и 3. Из табл. 2 видно, что уже через 4—10 дней выдерживания в морской воде в некоторых колониях кишечных палочек, размножающихся при 20, 10 или 5°, обнаружены клетки, неспособные к развитию при 37°. Количество этих колоний (из 25 испытанных) увеличивалось со временем выдерживания кишечных палочек в морской воде. Данные табл. 3 показывают, что после выдерживания клеток кишечных палочек в морской воде при 20° в течение 7 сут 18 из 25 испытанных колоний показали способность к развитию при этой температуре. После 20 сут выдерживания при 20° почти все клетки были способными к развитию при этой температуре. При температуре морской воды 10 и 5° адаптация клеток кишечных палочек была более медленной, но и в этих условиях со временем выдерживания в морской воде количество колоний, клетки которых были способными к развитию при 10 и 5° увеличивалось.

Дальнейшая задача нашего исследования заключалась в том, чтобы выяснить, возможно ли нормальное развитие клеток кишечных палочек

Таблица 4

Сроки восстановления развития клеток кишечных палочек при 37°С после длительного пребывания их при более низких температурах морской воды

Температура предварительного выдерживания в морской воде $\pm 1^\circ$, °С	Продолжительность предварительного выдерживания в морской воде, сут	Продолжительность выдерживания при температуре морской воды 37°, сут	Число клеток в 1 мл воды при инкубировании высевах морской воды при 37°
20	87	0	0
		1	5
		2	34
		4	8 900
		7	240 000
10	127	0	0
		1	0
		2	0
		4	5 300
		7	190 000
5	150	0	0
		1	0
		2	0
		4	94
		7	7 000
		10	610 000

при температуре 37° после длительного пребывания их при более низких температурах морской воды. С этой целью в каждом варианте опыта морскую воду, в посевах из которой на среду Эндо, инкубируемую при 37°, роста колоний не наблюдалось, подогрели до 37°. Эту температуру поддерживали до тех пор, пока клетки кишечных палочек не стали вновь размножаться (табл. 4). Таким путем было выяснено, что клетки кишечных палочек, находившиеся в морской воде при 20° в течение 87 сут, показали развитие при 37° через 1—2 сут после пребывания их при этой температуре. Кишечные палочки, находившиеся в морской воде при 10 и 5° в течение 127 и 150 сут, стали развиваться через 4—7 сут после пребывания при 37°.

Обсуждение

Оптимальной для развития фекальных бактерий (в том числе и кишечных палочек) является температура их местообитания (кишечник человека и животных) — 37°. Наши опыты показали, что эти бактерии хорошо приспосабливаются и к температуре морской воды. Было выяснено, что количество клеток кишечных палочек при посеве на среду Эндо при 20 и 10° (табл. 1) увеличивалось уже в первые дни наших опытов по сравнению с количеством их при 37°. Подробные данные были получены также при высевах сточных вод перед добавлением их в морскую воду.

Эти результаты, на наш взгляд, не противоречат общезвестным данным об оптимальной температуре развития фекальных бактерий. Очевидно, процессы селекции бактерий и адаптации их к условиям внешней среды, в том числе и к более низким температурам, начинаются уже раньше, т. е. в канализационном проходе или в коллекторе сточных вод, через которую они направляются в море. Следовательно,

можно полагать, что кишечные палочки сточных вод, исследованные нами, прошли уже первые этапы адаптации.

В первый период после попадания в морскую воду температурой 20, 10 и 5° численность кишечных палочек увеличивалась по сравнению с исходным количеством. Интенсивность и продолжительность этого процесса были максимальными при 20° и замедлялись со снижением температуры воды.

Численность кишечных палочек, размножающихся при 20, 10 и 5°, увеличивалась более длительное время и количество их было больше, чем количество бактерий при 37°. Это можно объяснить замедлением процессов развития бактерий в зависимости от снижения температуры воды и сложными процессами адаптации и селекции, которые начинаются уже в коллекторе сточных вод и продолжают в морской воде. Вследствие этих процессов температура 37° уже не является оптимальной для развития кишечных палочек. Колонии кишечных палочек вырастали на чашках Петри в посевах воды, инкубированных при 20, 10 и 5°, даже после того, когда в параллельных посевах из тех же проб, но инкубированных при 37°, клетки уже не размножались. Напрашивался вывод о том, что опытная культура в морской воде погибла. Однако штаммы или клетки кишечных палочек, которые в результате адаптации к более низким температурам воды при 37° не размножаются, просто не были нами обнаружены. Наши исследования убедительно показали, что часть клеток кишечных палочек после попадания в морскую воду, температура которой значительно ниже 37°, теряют способность к развитию при 37°. Количество таких бактерий увеличивается со снижением температуры воды и с длительностью периода адаптации. В то же время часть клеток вообще не размножается в морской воде. Эти клетки сохраняются в морской воде жизнеспособными и начинают размножаться только при инкубировании посевов морской воды при температуре 37°. Результаты экспериментов убедили нас в том, что исчезновение способности к развитию при 37° после длительного выдерживания кишечных палочек в морской воде не дает полного основания считать, что они вообще погибли. При более благоприятных условиях в ряде случаев эта способность через несколько суток может восстановиться.

Кишечные палочки в наших опытах в нестерилизованной морской воде погибали несколько быстрее, чем в стерилизованной. Причиной этого могли быть: конкуренция с другими бактериями, которая в стерилизованной воде исключалась, или бактерицидность морской воды, которая при стерилизации воды уменьшается. Рост колоний кишечных палочек при инкубировании посевов воды при 37° прекращался в нестерилизованной морской воде в зависимости от температуры воды через 55—116, в стерилизованной воде через 63—127 дней после попадания сточных вод в море. При более низких температурах инкубирования посевов рост прекращался соответственно через 102—150 и 114—181 день. В воде температурой 0° кишечные палочки не размножались. Но какие-то внутренние изменения происходили в клетках даже при этой температуре. Штаммы, выдержанные при 0° и перенесенные отсюда в температуру 10°, показали некоторое увеличение численности, чего не наблюдалось при 37°.

К сожалению, трудно установить, какую роль в этих сложных процессах играет селекция, какую — адаптация. Очевидно, оба процесса происходят одновременно, влияя друг на друга. При этом способность адаптироваться к более низким температурам морской воды оказывается разной даже у различных клеток кишечных палочек.

ЛИТЕРАТУРА

- Алтон Л. В., Рахно П. Х. Выживаемость оксидазоотрицательных кишечных палочек в морской воде при неоптимальных температурах. — Биол. моря, 1979, I, 83—86.
- Государственный стандарт Союза ССР «Вода питьевая». Методика санитарно-бактериологического анализа. ГОСТ 18963-73. М., 1971.
- Лях С. П. Адаптация микроорганизмов к низким температурам. М., 1976.
- Митчелл Р. Микробиология загрязненных вод. — М., 1976, 1—226.
- Broeze, R., Jaeger, L., Pope, D. The effect of suboptimal temperatures on growth, respiration and macromolecular synthesis in mesophilic, psychrophilic and psychrotropic bacteria. — Abst. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol. — 1976, 125.
- Brown, M. R., Melling, I. Inhibition and Destruction of the Microbiol. Cell. London—New York, 1971, 4—39.
- Dofour, A. P., Cabelli, N. J. Membrane filter procedure for enumerating the component genera of the Coliform Group. — Appl. Microbiol., 1975, 29, 826—833.
- Farell, J., Rose, A. H. Low-temperature microbiology. — In: Advances in Appl. Microbiol. London—New York, 1965, 335—403.
- Farell, J., Rose, A. H. Cold Shock in a mesophilic and a psychrophilic pseudomonad. — J. Gen. Microbiol., 1968, 50, 429—441.
- Goldstein, A., Goldstein, D., Lowney, J. T. Comparative study of temperature on metabolism of mesophilic bacteria. — J. Molec. Biol., 1964, 9, 213—235.
- Hoadley, A. W., Cheng, C. M. The recovery of indicator bacteria on selective media. — J. Appl. Bact., 1974, 37, 45—57.
- Ingraham, J. L. Genetic regulation of temperature responses. — In: Temperature and Life. Berlin—Heidelberg—New York, 1973, 60—85.
- Malmcoln, N. L. Nucleic acid and protein synthesis. — Biochim. biophys. acta, 1969, 190, 337—345.
- Meynell, G. G. The effect of sudden chilling on *Escherichia coli*. — J. Gen. Microbiol., 1958, 19, 380—384.
- Nedwell, D. B., Floodgate, B. D. The seasonal selection by temperature of heteritrophic bacteria in on intertidal sediment. — Marine Biology, 1971, 11, 305—310.
- Rose, A. H. Temperature effects on microorganisms. — In: Thermobiology. London—New York, 1967, 147—218.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
26/II 1980

Leelo ALTON

ELUKONDLIKUS REOVEES SISALDUVATE SOOLEKEPIKESTE ADAPTATSIOONIST MEREVEE ERINEVATE TEMPERATUURIDEGA

Artiklis on esitatud andmeid elukondlikus reovees sisalduvate soolekepikeste adapteerimisest temperatuuridega 20, 10, 5 ja 0°C. Katsetes kasutati steriliseeritud ja steriliseerimata merevett. Soolekepikeste adaptatsioon ja väljasuremine olenesid merevee temperatuurist ja aeglustusid selle vähenedes. Bakterid hukkusid katsevariandist ja vee temperatuurist sõltuvalt 102—181 päeva jooksul.

Leelo ALTON

ADAPTION OF COLIFORMS OF COMMUNAL SEWAGE WATERS TO VARIOUS TEMPERATURES

The adaption of coliforms inhabiting communal sewage waters was studied in sea water at temperatures from 0 to 20°C. The coliforms propagated at temperatures of 20, 10 and 5° and perished in 55—181 days, depending on the test version. Sowings for studying the changes in the numbers of bacteria were incubated at temperatures of 37 and 20°C, and at 10 and 5° simultaneously. After a period of adaption at 10, 5 and 0°, the coliforms began to develop at 37° only after a period of adaption. Some cells could not get adapted to temperatures of 20, 10 and 5°.