

НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ L-ВАРИАНТЫ БАКТЕРИЙ В ЭКОСИСТЕМАХ ГОРОДА БЛАГОВЕЩЕНСКА

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН, 675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1

РЕЗЮМЕ

С помощью прямой электронной микроскопии визуализированы морфотипы покоящихся форм бактерий в экосистемах города Благовещенска. Установлено, что в воде реки Амур, питьевой водопроводной воде и почве города содержатся некультивируемые формы, внешне соответствующие элементарным тельцам и их микроколониям L-форм неидентифицированных бактерий. Обнаруженные некультивируемые формы находятся как в свободном состоянии, так и в биопленке, что может препятствовать выявлению и идентификации патогенных и условно-патогенных бактерий рутинными бактериологическими методами. При попадании в организм человека со сниженной иммунобиологической резистентностью элементарные тельца и их микроколонии могут вызывать разнообразные заболевания. В таких случаях источник инфицирования определить трудно.

Ключевые слова: окружающая среда, L-формы бактерий, биопленка, электронная микроскопия.

SUMMARY

RESTING L-FORMS BACTERIA IN THE ENVIRONMENT OF BLAGOVESHCHENSK

V.M.Katola

Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS, 1 Relochniy Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

Morphotypes of resting bacteria forms in the ecosystems of Blagoveshchenck were visualized with the help of direct electronic microscopy. It was found out that resting forms externally corresponding to elementary bodies and their microcolonies of L-forms unidentified bacteria are in the water of the Amur river, drinking running water and in the soil of the town. The revealed resting forms have been found both in a free state and in biofilm, which may hinder the identification of pathogenic and conditionally pathogenic bacteria by routine bacteriologic methods. These elementary bodies together with their microcolonies may cause different diseases in people with a low immune-biologic resistance. It is difficult to identify the source of infecting in such a case.

Key words: environment, L-form bacteria, biofilm, electron microscopy.

Распространение, жизнестойкость, многочисленность и сохранность таксономического разнообразия микроорганизмов как в экстремальной среде, где жизнь для других организмов невозможна, так и просто в постоянно меняющихся условиях окружающей

среды объясняется беспрецедентной способностью популяций к адаптации. Лежащая в ее основе перестройка морфологии и физиологии бактериальной клетки нередко затрудняет диагностику инфекционных заболеваний и источника инфицирования. Например, экологическая ситуация в Амурской области официально считается удовлетворительной, однако атмосферный воздух загрязнен настолько, что на душу населения приходится 45 кг взвешенных частиц, 43 кг диоксида серы, 49 кг диоксида азота и 122 кг окиси углерода [5, 6]. Кроме того, в течение 2009-2011 гг. в поверхностные водоемы в среднем сброшено 87,70 млн м³ сточных вод, включая 3,05 млн м³ без очистки и 76,18 млн м³ – недостаточно очищенных. Стоки суммарно содержали 11,028 тыс. тонн взвешенных частиц, фенолов, нитратов, нефти, тяжелых металлов (Fe, Zn, Mg, Mn, Pb, Hg) и пр. В результате вблизи городов и поселков вода большинства рек оценена как «очень загрязненная» (река Амур у г. Благовещенска, реки Зея, Томь, Нюкжа и др.), «грязная» (реки Б.Петра, Кивда) и «загрязненная». Основными загрязнителями окружающей среды являются предприятия по производству и распределению электроэнергии, воды и газа, добыче полезных ископаемых (металлических руд, бурого и каменного угля, торфа), автотранспорт и жилищно-коммунальное хозяйство. Только в г. Благовещенске в 2011 г. ТЭЦ выбросила в атмосферу 33,028 тыс. тонн вредных веществ, ОАО «Амурские коммунальные услуги» – 2,06 тыс. тонн, а по количеству бенз(а)пирена и формальдегида г. Благовещенск давно числится в списке городов России с высоким уровнем загрязнения воздушной среды. Не в лучшем положении находятся и почвы – при анализе санитарного состояния территорий 96 поселений 6,9% почвенных проб не соответствовали гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям, 1% – по содержанию гельминтов. Но, несмотря на такой экологический фон, санитарно-бактериологическими методами патогенные бактерии из почвы и воды не выделены [6]. Действительно, выявить патогенов в экосистемах удастся не всегда. Одной из причин отрицательных бактериологических исследований является то, что многие неспорообразующие патогенные и сапрофитные бактерии, оставаясь жизнеспособными, переходят в близкие к анабиозу покоящиеся формы или некультивируемые состояния. Они представлены цистоподобными клетками, физиологически эквивалентные цистам, обладают внутривидовым полиморфизмом, низким метаболизмом, системами биосинтеза белка, нуклеиновых кислот, могут сохранять вирулентность и пр. Главное же состоит в том, что покоящиеся формы прекращают деление и рост на плотных агаровых средах, но могут быть реанимированы [1, 4, 7]. Приме-

няя полимеразную цепную реакцию и ее модификации, их легко обнаружить и идентифицировать в природной среде и организме человека и животных. Мнения исследователей на сущность покоящихся форм бактерий и механизм их формирования неоднозначны, к тому же для большей части неспорообразующих бактерий переход в некультивируемое состояние не установлен. Оно доказано лишь для энтеропатогенных *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella thyphimurium*, *S. enteridis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Yersinia pseudotuberculosis* и ряда других видов, которые являются обычными обитателями почвы и воды и имеют наибольшее эпидемиологическое значение [1]. Правда, остальные таксоны также владеют эффективной адаптивной стратегией. Так, чтобы продолжительно персистировать в макроорганизме, грамотрицательные и грамположительные гетеротрофные бактерии прекращают продукцию пептидогликана клеточной стенки и преобразуются в L-варианты, иначе CWDB (*cell wall-deficient/defective bacteria* – бактерии с отсутствующей/дефектной клеточной стенкой), не узнаваемых иммунной системой [2, 8, 10, 15]. L-формы выделены также из сухой почвы, воды, продуктов питания, но сообщения об их существовании в природных биотопах встречаются очень редко [8].

Цель настоящей работы – с помощью прямой электронной микроскопии визуализировать морфотипы покоящихся форм бактерий в экосистемах г. Благовещенска.

Материалы и методы исследования

Воду из реки Амур в районе г. Благовещенска, муниципальной водопроводной сети (из-под крана и колонок) и отстоявшуюся жидкость из почвенной вытяжки в объеме 0,1 мл наносили на верхнюю поверхность липкой ленты, закрепленной на торце объектного столика электронного микроскопа. Затем все препараты при комнатной температуре подсушивали в стерильных чашках Петри, напыляли углеродом в вакуумной установке ВУП-4 и просматривали в сканирующих электронных микроскопах «LEO 1420» (Германия) или «JEOL ISM-35C» (Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

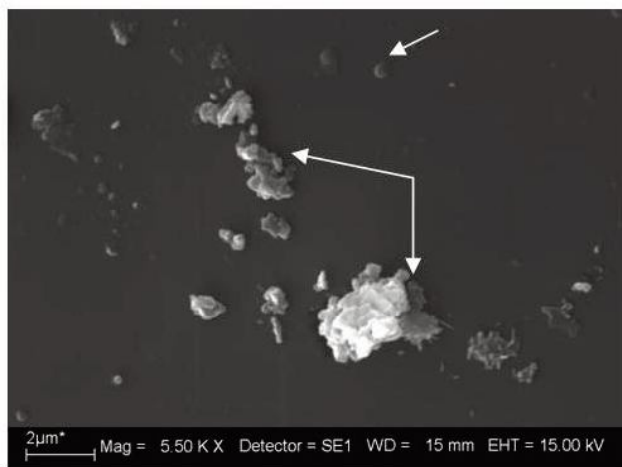
Из рисунка видно, что в воде реки Амур, в воде городской коммунальной водопроводной сети и в почвенной вытяжке содержатся сферические субмикроскопические образования (структуры) с ровными четкими контурами и диаметром 0,15–0,4 мкм. Одновременно встречаются более крупные, различной формы их конгломераты. Причем, если нормальные бактериальные клетки делятся (размножаются) бинарно, то часть визуализированных мелких структур активно делится пополам неравномерно, чаще почкуются, образуя при этом множество дочерних особей гораздо меньшего размера. Различные способы деления свидетельствуют о том, что обнаруженные субмикроскопические элементы: а) не вирусы; б) жизнеспособны; в) обладают метаболической актив-

ностью; г) функционирующие; д) резистентны к комплексу факторов среды обитания. То есть, являются глубоко измененными клетками бактерий, возможно, не одного, а нескольких видов различных систематических групп. По электронной плотности, морфологии, размерам и способам деления они, как представляется, соответствуют элементарным тельцам, которые содержатся в колониях L-форм бактерий во всех фазах L-трансформации. И не только в опытах *in vitro*. В последнее время возрастает число публикаций о проникновении классических форм бактерий в кровь (при жевании, чистке и экстракции зубов, ранениях, из кишечника и др.) с персистенцией в нейтрофилах, моноцитах, в основном в макрофагах [1, 9, 14]. Показано, что элементарные тельца циркулируют в плазме крови даже у людей с хорошим самочувствием, работоспособностью и социальной активностью, в том числе у доноров крови [3]. Элементарные тельца считаются мелкими репродуцирующими единицами L-форм, проходят через бактериальные фильтры, обладают замедленным метаболизмом, способны увеличиваться в размерах и реверсировать в родительские клетки [2, 8]. Они устойчивы к антибиотикам, бактериофагам, хлорированию воды, ультразвуку, кипячению, автоклавированию и высыханию (до 10 лет) [2, 14]. Однако не растут на стандартных лабораторных средах и не выявляются биохимическими методами. Таким образом, можно предполагать, что наряду с образованием некультивируемых цистоподобных клеток, в воде и почве происходит L-конверсия бактерий, постоянно обитающих в них либо случайно привносимых из других сред.

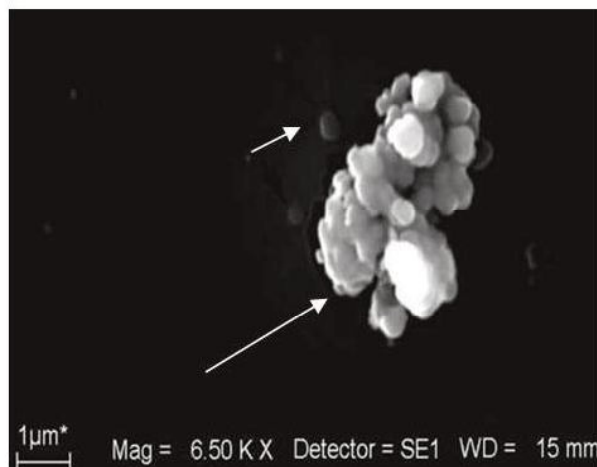
В исследуемых объектах элементарные тельца пребывают в свободном (планктонном) состоянии либо иммобилизованы в биопленку и появляются при ее повреждении. Что касается конгломератов, то они, фактически, являются микроколониями элементарных телец, окруженных пленочным матриксом. Согласно современным представлениям [1, 9, 11, 12, 13] в природе и организме человека и животных 99,9% бактерий существует именно в виде структурированной биопленки, распределяясь в ней неравномерно. Будучи древней частью жизненного цикла бактерий, биопленка необходима для их выживания в местах обитания, захвата и колонизации новых экологических ниш. Механизм ее образования еще мало изучен. По данным многих авторов [11, 12, 13] она имеет различную структуру, толщину и форму, состоит из внеклеточных полисахаридов, белков, липидов, ДНК и РНК и формируется одновременно с микробными микроколониями сразу же после адгезии клеток к любой твердой биогенной и абиогенной поверхности. Скрепленные в биопленке клетки организуются в многовидовые сообщества, где каждая особь имеет свою микроэко-нишу, размножается, обеспечивается надежной защитой, питанием и коммуникациями с другими клетками и окружающей средой. В условиях неблагоприятного воздействия на бактерии в природе или организме хозяина биопленка придает им особые преимущества – в отличие от планктонных бактерий пле-

ночные клетки более устойчивы к воздействию физических, химических и биологических стрессоров. В ее функцию входит регуляция плотности («кворум») популяции, поэтому микробная клетка сейчас рассмат-

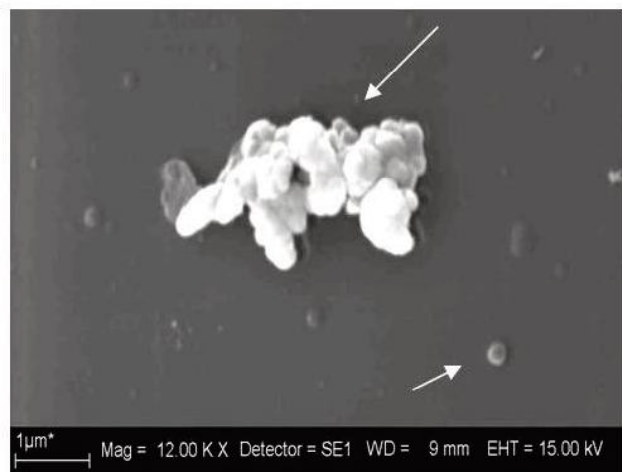
ривается как многоклеточный организм, который значительно отличается от клеток колоний, выросших на питательных средах.



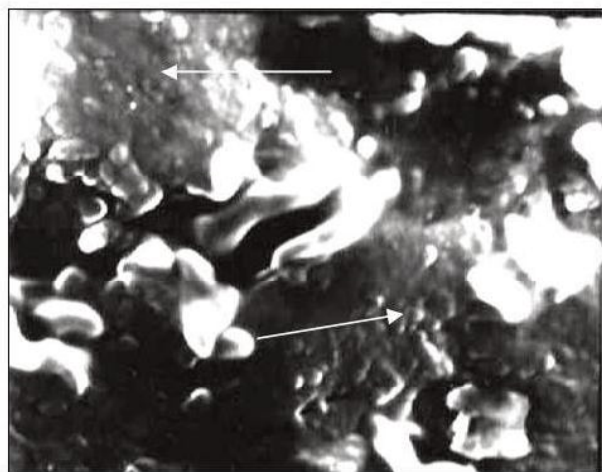
А



Б



В



Г

Рис. Сканирующая электронная микроскопия: а – отмеченные короткой стрелкой элементарные тельца (ЭТ), длинной стрелкой – их конгломераты (микроколонии) и фрагменты биопленки в воде реки Амур ($\times 5500$); б – ЭТ и их конгломерат в питьевой водопроводной воде ($\times 6500$); в – ЭТ и их конгломерат в городской почве ($\times 12000$); г – полиморфная биопленка из смешанных бактериальных популяций (ЭТ и палочковидные клетки) в почве (препарат-отпечаток, $\times 4000$).

В то же время биопленка создает массу проблем: влияет на развитие, диагностику, течение и исход инфекционных заболеваний, гарантирует длительную персистенцию патогенных бактерий, служит причиной биообрастаний и деструкции медицинских катетеров, имплантантов, гидрологических сооружений, металлических конструкций и трубопроводов. Элементарные тельца и их микроколонии могут обособленно или в составе биопленки поступать в реку Амур вместе с твердыми и жидкими промышленными и хозяйственно-коммунальными отходами, вымываться из почвы атмосферными осадками. Следует отметить, что биопленка способна преодолевать методы водочистки и формироваться непосредственно в системах водоснабжения, постоянно попадая через питьевую

воду в организм человека и животных. Оказавшись в иммунокомпрометированном организме, некультивируемые элементарные тельца и их микроколонии восстанавливаются в исходные бактериальные формы с полноценной клеточной стенкой и в зависимости от их концентрации и биологических особенностей индуцируют воспалительный процесс, аллергию и другую патологию [1, 2, 8].

Выводы

1. В воде реки Амур, питьевой воде муниципальной водопроводной сети и почве, загрязненных различными веществами, содержатся некультивируемые формы, внешне соответствующие элементарным тельцам и их микроколониям L-форм неидентифицирован-

ных бактерий.

2. Обнаруженные некультивируемые формы находятся как в планктонном состоянии, так и в биопленке, что может препятствовать выявлению и идентификации патогенных и условно-патогенных бактерий рутинными бактериологическими методами. При попадании в организм человека со сниженной иммунобиологической резистентностью элементарные тельца и их микроколонии могут вызывать разнообразные заболевания. В таких случаях источник инфицирования определить трудно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Механизмы выживания бактерий / О.В.Бухарин [и др.] М.: Медицина, 2005. 363 с.
2. О роли латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека / И.В.Елисеева [и др.] // *Аннали Мечнівського Інституту*. 2006. №1. С.12–44.
3. Катола В.М. Особенности бессимптомной бактериемии у практически здоровых людей // *Авиакосмич. и экологич. медицина*. 2012. №2. С.67–69.
4. Мулюкин А.Л. Покоящиеся формы неспорообразующих бактерий: свойства, разнообразие, диагностика: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2010. 48 с.
5. Об охране окружающей среды и экологической ситуации в Амурской области за 2011 год. Государственный доклад Министерства природных ресурсов Амурской области. URL: http://www.AMUR/Main_site_area/siteArea_gov/Iogv/Iogv_Minprirody/gos_doklad (дата обращения: 22.10.2012).
6. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Амурской области в 2011 году. Государственный доклад Управления федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Амурской области. URL: http://www.28.rospotrebnadzor.ru/docs/?print=on&p=4155&show_year=2012 (дата обращения: 22.10.2012).
7. Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П., Стоянова Л.Г. Роль некультивируемых форм в поддержании гомеостаза популяции // *Иммунол., аллергол., инфектол.* 2010. № 4. С.57–66.
8. Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий (механизм образования, структура, роль в патологии). М.: Медицина, 1981. 236 с.
9. Тец В.В. Роль микрофлоры полости рта в развитии заболеваний человека // *Стоматология*. 2008. №3. С.21–24.
10. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review / V.Beran [et al.] // *Veterinarni Medicina*. 2006. №51. P.365–389.
11. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. Vol.15, №2. P.167–193.
12. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, Vol.8, №9. P.623–633.
13. Kaplan J.B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications and Potential Therapeutic Use // *J. Dent. Res.* 2010. Vol.89, №3. P.205–218.

Res. 2010. Vol.89, №3. P.205–218.

14. Are there naturally occurring pleomorphic Bacteria in the Blood of Healthy Humans / R.McLaughlin [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(12):4771–4775

15. Survival of *Escherichia coli* under lethal heat stress by L-form conversion / N.Markova [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* 2010; Vol.6, №4. P.303–315.

REFERENCES

1. Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El'-Registan G.I. *Mekhanizmy vyzhivaniya bakteriy* [Mechanisms of bacteria survival]. M.: Meditsina; 2005.
2. Eliseeva I.V., Babich E.M., Volyanskiy Yu.L., Sklyar N.I., Belozerskiy V.I. *Annali Mechniv'skogo Institutu* 2006; 1:37–40.
3. Katola V.M. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina* 2012; 2:67–69.
4. Mulyukin A.L. *Pokoyashchiesya formy nesporobrazuyushchikh bakteriy: svoystva, raznoobrazie, diagnostika avtoreferat dissertatsii doktora biologicheskikh nauk* [Resting forms of asporogenous bacteria: properties, diversity, diagnosis: abstract of thesis...doctor of biological Sciences]. Moscow; 2010.
5. *Ob okhrane okruzhayushchey sredy i ekologicheskoy situatsii v Amurskoy oblasti za 2011 god. Gosudarstvennyy doklad* [About environmental protection and ecological situation in the Amur region in 2011. The state report]. Available at: http://www.AMUR/Main_site_area/siteArea_gov/Iogv/Iogv_Minprirody/gos_doklad
6. *O sanitarno-epidemiologicheskoy obstanovke v Amurskoy oblasti v 2011 godu. Gosudarstvennyy doklad* [About the sanitary-epidemiological situation in the Amur region in 2011. The state report]. Available at: http://www.28.rospotrebnadzor.ru/docs/?print=on&p=4155&show_year=2012
7. Pakhomov Yu.D., Blinkova L.P., Stoyanova L.G. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya* 2010; 4: 57–66.
8. Prozorovskiy S.V., Kats L.N., Kagan G.Ya. *L-formy bakteriy (mekhanizm obrazovaniya, struktura, rol' v patologii)* [L-form bacteria (the mechanism of formation, structure, and the role in pathology)]. Moscow: Meditsina; 1981.
9. Tets V.V. *Stomatologiya* 2008; 3:21–24.
10. Beran V., Havelkova M., Kaustova J., Dvorska L., Pavlik I. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina* 2006; 51:365–389.
11. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(2):167–193.
12. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(9):623–633.
13. Kaplan J.B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications and Potential Therapeutic Use. *J. Dent. Res.* 2010; 89(3):205–218.
14. McLaughlin R.W., Vali H., Lau P.C.K., Palfree R.G.E., De Ciccio A., Sirois M., Ahmad D., Villemur R., Desrosiers M., Chan E.C.S. Are there naturally occurring pleomorphic Bacteria in the Blood of Healthy Humans. *J.*

Clin. Microbiol. 2002; 40(12):4771–4775.

15. Markova N, Slavchev G, Michailova L, Jourdanova

M. Survival of *Escherichia coli* under lethal heat stress by L-form conversion. *Int. J. Biol. Sci.* 2010; 6(4):303–315.

Поступила 12.11.2012

Контактная информация

Виктор Моисеевич Катола,

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник,

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,

675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.

E-mai: katola-amur@list.ru

Correspondence should be addressed to

Viktor V. Katola,

MD, PhD, Leading staff scientist,

Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS,

1 Relochniy Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mai: katola-amur@list.ru