

МОРФОГЕНЕЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37Rv В СТРЕССОРНОЙ СРЕДЕ

В.М.Катола

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

РЕЗЮМЕ

В работе представлен морфогенез микобактерий туберкулеза, вызванный питательной средой с геотехногенными образцами, отобранными из лежащих отходов золотодобычи. В жидкой питательной среде Сотона с образцами, взятыми из многолетних отходов золотодобычи, *M. tuberculosis* H37Rv вырастают на третьей неделе в виде сухой морщинистой пленки. С помощью электронной микроскопии установлено, что она состоит из сферопластов, шаровидных клеток, нитевидных структур, элементарных телец и небольшого количества исходных клеток. При переносе фрагментов пленки из среды Сотона на среду Левенштейна-Йенсена вырастают R-колонии чистой культуры *M. tuberculosis* H37Rv. Элементарные тельца, нитевидные структуры и палочковидные клетки микобактерий туберкулеза являются природным резервуаром, который поддерживает эпидемиологическую обстановку.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, L-формы, электронная микроскопия.

SUMMARY

MORPHOGENESIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37Rv IN STRESS CONDITIONS

V.M.Katola

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

The work shows morphogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* caused by the growth medium with geotechnogenic samples taken from stale gold wastes. In liquid medium Soton with samples taken from long-term waste gold *M. tuberculosis* H37Rv grows at the third week in a form of a dry wrinkled patch. Electron microscopy revealed that it consists of spheroplasts, spheroid cells, thread-like structures, elementary cells and some stem cells. After moving the patch fragments from Soton into Lowenstein-Jensen medium, R-colonies of pure culture of *M. tuberculosis* H37Rv appear. Elementary bodies, thread and rod-shaped cells of *Mycobacterium tuberculosis* are the natural reservoir which develops the epidemiological situation.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, L-forms, electron microscopy.

Семейство *Mycobacteriaceae* содержит единственный род *Mycobacterium*, который к 2000 г. насчитывал примерно 100 видов. Предположительно, входящие в современный *Mycobacterium tuberculosis complex* виды (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* и др.)

появились 15-35 тыс. лет назад, и уже тогда обладали патогенным потенциалом [8, 11]. Им присущи высокая степень родства (порядка 99,9%), гомология по последовательностям 16S рРНК и лидерство среди остальных бактерий по продукции сложнейших органических соединений [8, 14]. Более того, это факультативные внутриклеточные паразиты с длительной персистенцией в макроорганизме [15]. В конце 1998 г. усилиями большого коллектива молекулярных биологов из Великобритании, США, Франции и Дании полностью расшифрован геном эталонного штамма *M. tuberculosis* H37Rv [9, 10]. Он представляет собою протяженность 4411529 пар оснований, где гуанину и цитозину принадлежит 65,6%. В составе хромосомы (нуклеоида) 4000 генов (91% общей емкости генома) одиннадцати функциональных категорий в соответствии с продуктами их экспрессии. На сегодняшний день определены функции 52% генов. Помимо генов, кодирующих белки, 60 генов отвечают за функциональные компоненты РНК. ДНК-полиморфизм обеспечивает около 56 копий IS-элементов. Мигрируя и встраиваясь в определенные участки генов, они нарушают одну из стадий экспрессии. При этом вызывают «псевдомутации», которые инициируют резистентность: в гене *katG* к изониазиду, в гене *rpsL* — к стрептомицину, в гене *groB* — к рифампицину [5]. Основными источниками генетического разнообразия служат мобильные элементы, делеции, варьирующие множественные повторы ДНК и точечные мутации [9]. Коренным отличием *M. tuberculosis complex* от других бактерий является то, что значительная часть генома направлена на производство ферментов липолиза и липогенеза, гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и гликоксилатного пути, что позволяет быстро адаптироваться к среде существования. Располагает геном и системами, обеспечивающими внедрение в него чужеродных генов (*Escherichia coli*, *Actinobacterium*). В неблагоприятных условиях индуцируются также стрессовые гены [6]. Так, в состав системы SOS-ответа на нарушения в структуре ДНК или в системах ее репликации входят гены *lexA*, *recA* и ген *hsp65*, ответственный за синтез белков термического шока при воздействии на клетку сублетальной температуры, тяжелых металлов, голодания, гипоксии и других стрессоров. К характерным чертам генома относят медленное клеточное деление микобактерий (период удвоения 18-24 часов) и строение клеточной стенки.

Несмотря на расшифровку генома *M. tuberculosis* H37Rv полной ясности в механизмах патогенности не достигнуто. Но считается доказанным, что трудности борьбы с туберкулезом, высокая стойкость популяции микобактерий, большой риск развития эндогенных рецидивов и реактиваций связаны с персистенцией L-

форм [1, 7]. Правда, в результате анализа исследований, проведенных за период с 1934 по 2003 гг., у отдельных авторов появились сомнения в отношении роли L-форм в инфекционной патологии [13]. Однако за последние несколько лет информация об L-трансформации бактерий дополнилась новыми фактами. Отмечена высокая устойчивость L-форм *E. coli* к кипячению и автоклавированию [12], а в лежалых токсичных отходах (почвогрунтах) золотодобычи, в почве, речной и водопроводной воде визуализированы бактериальные биопленки с элементарными тельцами L-форм, их конгломератами, палочковидными клетками и нитевидными структурами неидентифицированных бактерий [3, 4]. Не исключено, что в почвогрунтах могут находиться и микобактерии туберкулеза, поскольку они имеют ген, отвечающий за формирование биопленки. С частицами пыли, аэрозолями и членами биоценоза фрагменты биопленки способны переноситься и попадать в организм человека и животных. Поэтому сапрофитическая фаза существования L-форм нуждается в продолжении исследований, социальную значимость которых обуславливают антропогенное загрязнение окружающей среды, наличие профессионального риска и хронических профзаболеваний на предприятиях с вредными и опасными условиями труда. Особенно это актуально при добыче полезных ископаемых.

В настоящей работе представлен морфогенез микобактерий туберкулеза, вызванный питательной средой с геотехногенными образцами, отобранными из лежалых отходов золотодобычи.

Материалы и методы исследования

В стерильные колбы с жидкой синтетической питательной средой Сотона (рН $7,2 \pm 0,2$), предназначенной для культивирования микобактерий туберкулеза, в соотношении Т:Ж=1:5-7 вносили образцы из многолетних отходов золотодобычи (хвосты шлихообогатительной установки), содержащие тяжелые минералы (магнетит, амфибол, гематит, ильменит, лимонит, мусковит, рутил и др.), высокие концентрации (г/т) токсичных металлов: золото ($18 \pm 3,51$), ртуть ($160 \pm 36,7$), кобальт ($56 \pm 6,00$), хром ($3000 \pm 1204,1$), никель ($240 \pm 74,83$), медь ($326 \pm 49,08$), свинец ($340 \pm 92,73$), цинк ($108 \pm 18,00$), мышьяк ($5800 \pm 800,2$) и др. После трехкратного автоклавирования питательной среды с образцами в нее инокулировали 1 мг коллекционного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и инкубировали в периодическом режиме, то есть, в закрытой системе при комнатной температуре, освещении и влажности. С появлением роста культуры в виде тонкой сухой поверхностной пленки (колонии) к ней прикладывали сеточки с формваровой подложкой и предметный столик с липкой лентой на торце. Препараты-отпечатки на сеточке просматривали в просвечивающем электронном микроскопе TESLA BS 500 с ускоряющим напряжением 60 кВ. Отпечатки на предметном столике просушивали, напыляли углеродом в вакуумной установке ВУП-4 и анализировали в сканирующих электронных микроскопах LEO 1420 (Германия) и JEOL ISM-35C (Япония).

Одновременно фрагменты пленки-колонии переносили на среду Левенштейна-Йенсена.

Результаты исследования и их обсуждение

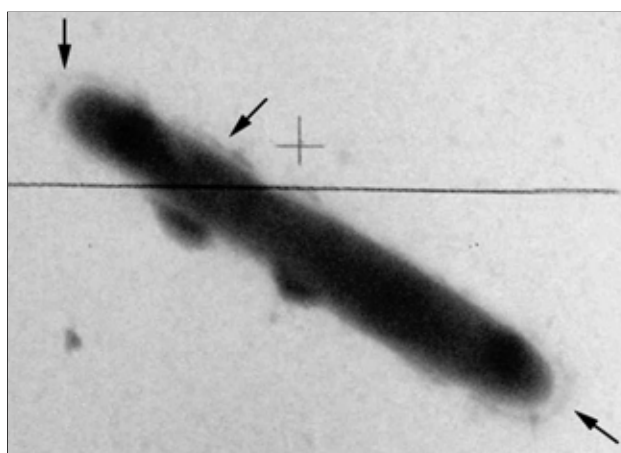
Клетки микобактерий туберкулеза имеют длину 1-10 мкм, ширину 0,2-0,7 мкм и несколько закругленные концы. Но их морфология и размеры не постоянны. При активном туберкулезе легких в мокроте окраской карболовым фуксином и метиленовым синим в большей или меньшей мере выявляются тонкие прямые либо слегка изогнутые палочки малиново-красного цвета. Часто удается обнаружить нитевидные формы с вздутиями и разветвлениями. В препаратах же непосредственно из туберкулезных очагов и «санированных» каверн просматриваются фильтрующие, кокковидные и другие формы. Вне организма микобактерии в течение многих месяцев остаются жизнеспособными, для чего могут использовать различные трофические ресурсы – растут на средах из неорганических солей, с парафинами, ароматическими углеводородами, в парах нефти, нафталина и прочих летучих углеводородах.

В наших случаях геотехногенные образцы из отходов золотодобычи модифицируют среду Сотона в экстремальный (стрессорный) токсичный раствор, в котором фазы развития *M. tuberculosis* H37Rv подвергаются суммарному воздействию тяжелых металлов, метаболитов (нуклеиновые, фтиеновые, миколовые и микоцеразиновые кислоты, их эфиры), элементов лизированных клеток и новых образующихся соединений. Подчеркиваем, что это происходит в закрытой системе на фоне нарастающего дефицита питательных веществ и вызывает у популяции микобактерий стрессовое состояние. Ее физиологический статус непрерывно изменяется, клетки различаются стадиями индивидуального развития, размерами и формой вследствие несбалансированного роста в длину и толщину. С помощью электронной микроскопии в препаратах-отпечатках визуализируется полиморфная клеточная ассоциация (смесь) сферопластов, шаровидных клеток, нитевидных структур, элементарных телец и исходных клеток (рис. 2-6). Подобный состав соответствует сложной структурной организации колоний L-форм бактерий на плотных питательных средах. Принципиальной особенностью процесса L-трансформации является полная или частичная утрата бактериальной клеткой, независимо от видовой принадлежности, ригидной клеточной стенки [1, 7]. Это обеспечивает выживание при действии физических, химических и биологических факторов окружающей среды.

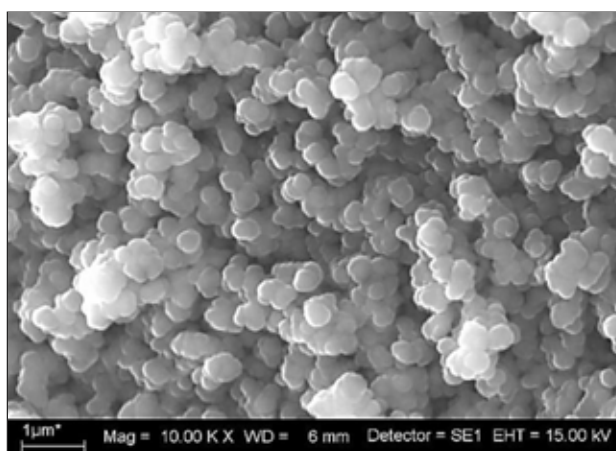
Как видно из рис. 1, при переходе *M. tuberculosis* H37Rv в L-формы у клетки сначала разрушается и отслаивается микрокапсула, в норме выполняющая защитную функцию и прочно связанная с клеточной стенкой, состоящей из 3-4 слоев толщиной 200-250 нм. Одновременно по нижнему контуру клетки появляются вздутия, вызванные нарушением формирования первичного каркаса клеточной стенки – пептидогликана и полисахаридной стромы. В итоге

клеточная стенка разрыхляется и цитоплазматическая мембрана с цитоплазмой перемещаются в образовавшиеся дефекты. Вероятно, уже на этом этапе у клеток ослабляется не только стабильность внешней формы, но и затрагивается содержание липопротеиновых ком-

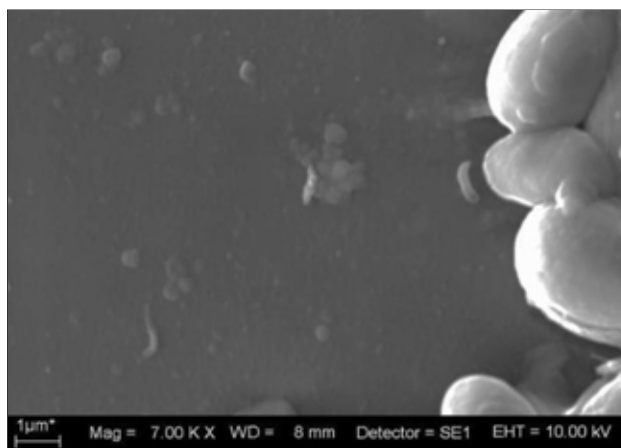
плексов и ферментных систем цитоплазматической мембраны. По мере количественно-качественной деградации клеточной стенки образуются огромные округлые, овальные и вытянутые сферопласты (рис. 4, 5).



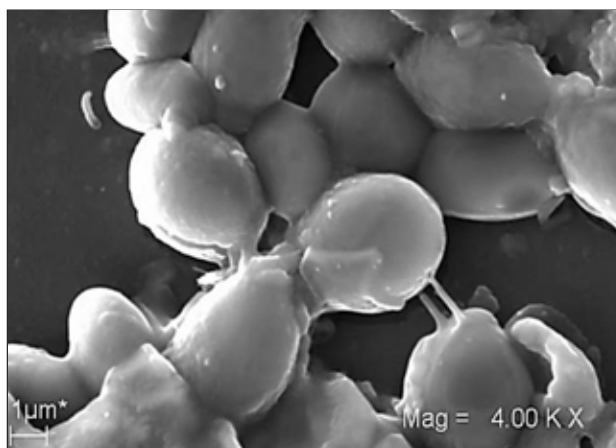
1



2



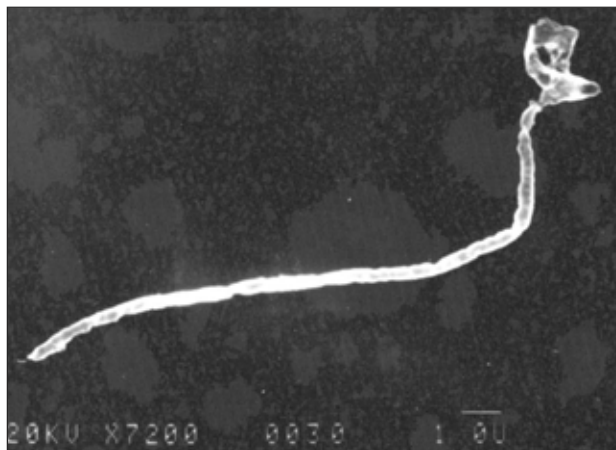
3



4



5



6

Рис. 1-6: 1 – клетка *M. tuberculosis* H37Rv, стрелки указывают на повреждения и отслоения ее микрокапсулы (просвечивающая электронная микроскопия, $\times 17000$); 2 – шаровидные клетки L-трансформированных *M. tuberculosis* H37Rv (сканирующая электронная микроскопия, $\times 10000$); 3-4 – сферопласты, продуцирующие элементарные тельца, отдельно локализованные элементарные тельца и палочковидные клетки (сканирующая электронная микроскопия, $\times 7000$ и 4000 соответственно); 5 – сферопласты, шаровидные клетки и палочковидные клетки *M. tuberculosis* с «завитком» на нижнем полюсе (сканирующая электронная микроскопия, $\times 7000$); 6 – сегментированная нить *M. tuberculosis* с завитком на верхнем полюсе (сканирующая электронная микроскопия, $\times 7200$).

По всему профилю поверхностной пленки они занимают доминирующее положение, плотно соприкасаются друг с другом или объединяются широкими и тонкими мостиками. У некоторых из них заметны глубокие «пробои» клеточной стенки, намечается бинарное деление, а также почкование на поверхности элементарных телец. Многочисленными экспериментами доказано, что сферопласты могут продуцировать белки, липиды, нуклеиновые кислоты, способствуют развитию бактериофагов, проявляют чувствительность к осмотическому шоку. В то же время не могут длительно пассивироваться на питательных средах и с удалением стрессора быстро реверсируют в исходные клетки [1, 7]. В значительных количествах встречаются шаровидные клетки округлых очертаний, расположенные чаще в глубине поверхностной пленки. Им присущи бинарное деление, наличие нуклеоида и мембранных структур. Среди визуализированных структур самыми мелкими (диаметр 0,2–0,3 мкм) являются элементарные тельца (рис. 2). Вместо клеточной стенки у них имеется трехслойная мембрана. Они формируют скопления, обладают низким обменом веществ, неравновеликим делением пополам и почкованием дочерних особей. Это указывает не только на их жизнеспособность, но и присутствие полного генома. Высокая резистентность к защитным факторам организма, ферментам и антибиотикам позволяет элементарным тельцам быть основной фазой внутриклеточного персистирования бактерий, а благодаря небольшим размерам занимать любые экологические ниши. Разрозненные исходные клетки *M. tuberculosis* H37Rv представлены отдельными изогнутыми палочками различной величины и толщины. Наряду с перечисленными клеточными формами обращают на себя внимание единичные сегментированные нити длиной от нескольких десятков до сотен мкм, причем, с причудливой петлей (узелком) на одном полюсе (рис. 5, 6). В природной и антропогенной среде бактериальные нити обнаруживаются довольно часто, однако причина их формирования, сегментации и петлеобразования не изучены [2]. Предполагается, что клеточная стенка нитей может быть дефектной [7]. Ранее у L-форм микобактерий туберкулеза многие авторы описывали клетки с нитевидными отростками. В наших препаратах-отпечатках они не визуализированы. Необходимо отметить, что в благоприятных условиях L-трансформанты микобактерий могут возвращаться в исходный бактериальный вид с восстановлением вирулентности, следовательно, к рецидиву болезни. Действительно, если перенести фрагменты L-трансформированной поверхностной пленки из среды Сотона на среду Левенштейна-Йенсена, то закономерно вырастают R-колонии чистой культуры. *M. tuberculosis*.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что многолетние отходы золотодобычи, внесенные в жидкую питательную среду Сотона, в закрытой системе, где исключен обмен с окружающей средой веществом, энергией и информацией, оказывают токсичное воздействие на популяцию *M. tuberculosis* H37Rv

как систему клеток, неоднородных по биологическим признакам. В целях самосохранения популяция, используя свои сенсорные и регуляторные механизмы, перестраивает работу генетического аппарата и расщепляется на L-формы, морфологически не отличающиеся от L-форм других бактерий. Таков адаптивный потенциал микобактерий, способ выживания и накопления в различных условиях существования.

Выводы

1. Многолетние отходы золотодобычи модифицируют жидкую питательную среду Сотона в стрессорный раствор, в котором у *M. tuberculosis* H37Rv происходят глубокие изменения морфологии, роста и деления клеток и синтеза клеточной стенки. Такой раствор, вызывающий различные формы изменчивости бактерий в экотопе, постоянно образуется во время увлажнения отходов золотодобычи атмосферными осадками.

2. Пластичность популяции *M. tuberculosis* H37Rv в стрессорном растворе в закрытой системе проявляется в виде сферопластов, шаровидных клеток, нитевидных структур, элементарных телец и типичных исходных клеток, способных на среде Левенштейна-Йенсена реверсировать в исходный вид.

3. Элементарные тельца, нитевидные структуры и палочковидные клетки микобактерий туберкулеза являются природным резервуаром, который поддерживает эпидемиологическую обстановку.

ЛИТЕРАТУРА

1. О роли латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека / И.В.Елисеева [и др.] // Анналы Мечниковского Института. 2006. №1. С.12–46.
2. Катола В.М. Влияние условий жизни на нитеобразование у бактерий // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2008. Вып.29. С.7–11.
3. Катола В.М. Бактериальные биопленки в отходах золотодобычи // Вопросы геологии и комплексного освоения природных ресурсов Восточной Азии: сб. докл. II Всерос. науч. конф. Благовещенск, 2012. С.202–205.
4. Катола В.М. Некультивируемые L- варианты бактерий в экосистемах Благовещенска // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2012. Вып.46. С.86–90.
5. Коровкин В.С. Молекулярные основы лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза // Мед. новости. 2003. №9. С.8–13.
6. Пиневич А.В. Микробиология. Биология прокариотов. В 3-х т. Т.3. СПб: Изд-во СПб. ун-та, 2009. 457 с.
7. Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий (механизм образования, структура, роль в патологии). М.: Медицина, 1981. 236 с.
8. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA / B.Böddinghaus [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1990. Vol.28, №8. P.1751–1759.
9. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence / S.T.Cole [et

al.] // *Nature*. 1998. Vol.393, №6685. P.537–544.

10. Ernst J.D., Trevejo-Núñez G., Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis and diagnosis of tuberculosis // *J. Clin. Invest.* 2007. Vol.117, №7. P.1738–1745.

11. Kapur V., Whittam T.S., Musser J.M. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? // *J. Infect. Dis.* 1994. Vol.170, №5. P.1348–1349.

12. 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.

13. Onwuamaegbu M.E., Belcher R.A., Soare C. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance // *J. Int. Med. Res.* 2005. Vol.33, №1. P.1–20.

14. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis* / N.H.Smith [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. Vol.4, №9. P.670–681.

15. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome / I.Vergne [et al.] // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004. Vol.20. P.367–394.

REFERENCES

1. Eliseeva I.V., Babich E.M., Volyanskiy Yu.L., Sklyar N.I., Belozerskiy V.I. *Annali Mechniv'skogo Institutu* 2006; 1:12–46.

2. Katola V.M. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2008; 29:7–11.

3. Katola V.M. *II Vserossiyskaya nauchnaya konferentsiya «Voprosy geologii i kompleksnogo osvoeniya prirodnikh resursov Vostochnoy Azii»* (The Second All-Russian Scientific Conference «The questions of geology and complex development of natural resources in Eastern Asia»). Blagoveshchensk; 2012:202–205.

4. Katola V.M. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2012; 46:86–90.

5. Korovkin V.S. *Meditinskije novosti* 2003; 9:8–13.

6. Pinevich A.V. *Mikrobiologiya. Biologiya prokariotov. Tom 3.* [Microbiology. Biology of prokaryotes. Vol. 3]. St. Petersburg; 2009.

7. 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.

8. Böddinghaus B., Rogall T., Flohr T., Blöcker H., Böttger E.C. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(8):1751–1759.

9. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3rd, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393(6685):537–544.

10. Ernst J.D., Trevejo-Núñez G., Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis and diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(7):1738–1745.

11. Kapur V., Whittam T.S., Musser J.M. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? *J. Infect. Dis.* 1994; 170(5): 1348–1349.

12. 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.

13. Onwuamaegbu M.E., Belcher R.A., Soare C. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance. *J. Int. Med. Res.* 2005; 33(1):1–20.

14. Smith N.H., Gordon S.V., de la Rua-Domenech R., Clifton-Hadley R.S., Hewinson R.G. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006; 4(9): 670–681.

15. Vergne I., Chua J., Singh S.B., Deretic V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004; 20:367–394.

Поступила 16.08.2013

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-mail: katola-amur@list.ru

Correspondence should be addressed to

Viktor M. Katola,

MD, PhD, Leading staff scientist,

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

1 Relochny Lane, Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: katola-amur@list.ru