

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА L-ТРАНСФОРМАЦИИ В ПОПУЛЯЦИИ САЛЬМОНЕЛЛ МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОННОЙ И ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.Ю. АРСЕНЮК¹, И.Б. ПАВЛОВА¹, П.С. ИГНАТЬЕВ²

Существование бактерий в отсутствие клеточной стенки — весьма своеобразное и широко распространенное явление, к которому неприменимы принципы классической микробиологии. L-трансформация бактерий с образованием L-форм затрудняет обнаружение патогенов и служит причиной многочисленных ложноотрицательных заключений по результатам биопроб, так как L-формы находятся в некультивируемом состоянии. Процесс L-трансформации при воздействии абиотического (тетрациклин) и биотического (биологически активные вещества *Bacillus subtilis*) факторов, а также реверсию нестабильных L-форм исследовали в популяции *Salmonella enterica* serovar *turphimurium* методами просвечивающей и сканирующей электронной (ПЭМ и СЭМ), а также лазерной модуляционной интерференционной (МИМ) микроскопии. Выявлены закономерные морфологические признаки L-форм, способных реверсировать в исходное состояние. С появлением методов оптической микроскопии, обладающих сверхразрешением, стало доступно изучение процесса L-трансформации в режиме реального времени на живых бактериях (без фиксации и окрашивания). Полученные на лазерном интерференционном микроскопе МИМ-321 (Россия) трехмерные фазовые портреты позволили не только однозначно идентифицировать L-формы бактерий, но и с высокой точностью определить их основные морфологические параметры (диаметр, периметр, высота, площадь, объем). С применением современных алгоритмов обработки этих данных внутри нестабильных L-форм зарегистрированы колыевые структуры, идентифицированные нами как ДНК. Гетероморфизм со всеми проявлениями L-трансформации характерен для патогенных и условно патогенных бактерий (как в норме, так и при действии любых абиотических и биотических факторов), что способствует выживанию вида. Изучение биологических особенностей L-трансформации имеет важное значение для понимания процессов существования потенциальных резервуаров возбудителей в природе, а также в патогенезе рецидивов хронических заболеваний.

Ключевые слова: L-трансформация, гетероморфизм, биологическая изменчивость, абиотические и биотические факторы, биологически активные вещества, популяции патогенных бактерий, стабильные и нестабильные L-формы, реверсия, просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия, лазерная интерференционная микроскопия.

Keywords: L-transformation, heteromorphism, biological variability, abiotic and biotic agents, BAS, pathogenic bacteria populations, stable and unstable L-forms, reversion, electron microscopy, interference microscopy.

Изучение теоретических аспектов биологической изменчивости патогенных микроорганизмов и их выживаемости при воздействии L-трансформирующих агентов до сих пор остается актуальным. Как известно, под влиянием неблагоприятных факторов популяции патогенных бактерий способны переходить в состояние гетероморфизма с различными проявлениями L-трансформации, включая образование клеток сферопластного или протопластного типа разного размера и конфигурации, а также мелких L-форм, лишенных клеточных стенок (1-4).

Нестабильные L-формы представляют собой клетки, изменившие морфологические, физиологические и биохимические характеристики и утратившие типичный бактериальный характер, но сохранившие геном и при благоприятных условиях (питательный субстрат, температура, pH) способные к реверсии за счет саморегулирующейся системы, необходимой для построения новой клеточной стенки. Стабильные L-формы — это клетки, потерявшие способность к реверсии в исходное состояние. До настоящего времени нет единого мнения об их роли в биологических процессах как в окружающей среде, так и в организме хозяина.

Целью настоящей работы было изыскание новых способов выявления

L-форм, а также объективной оценки их стабильности, поскольку до недавнего времени реверсия оставалась основным критерием при идентификации нестабильных L-форм.

Методика. В качестве модельного объекта использовали *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (штамм 1951 из коллекции музея Всероссийского НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии).

Для изучения ультраструктуры сальмонелл препараты фиксировали 4 % глутаровым альдегидом в фосфатном буфере (рН 6,9-7,0), образцы обезвоживали и заливали в эпоксидные смолы. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и изучали с использованием просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) со сканирующей приставкой Hitachi-800 (Япония).

При исследовании популяций в колониях и микроколониях с сохранением естественной архитектоники был использован метод, основанный на способности биологически активных веществ (БАВ), продуцируемых *Bacillus subtilis*, диффундировать через поры мембранных фильтров в плотную питательную среду. Культуру бактерий-антагонистов *B. subtilis* (ТНП-3, получен из коллекции музея Якутского НИИ сельского хозяйства) (50 мкл, плотность суспензии 10^9 кл/мл) наносили в виде капли в центр мембранных фильтра Владипор (ООО «Владипор», Россия) с диаметром пор 0,22 мкм, помещенного на поверхность плотной питательной среды МПА, и культивировали при 37 °С. Через 48 ч выявлялся обильный рост колоний. Такие фильтры удаляли и вместо них помещали новые, на поверхность которых наносили взвесь исследуемых сальмонелл (10^5 кл/мл). Контролем служили варианты, в которых сальмонеллы росли без воздействия БАВ *B. subtilis*. Для установления стабильности L-форм и выявления процесса реверсии клеток в исходную форму часть фильтров с отсутствием видимого роста бактерий помещали для подращивания на поверхность свежей питательной среды (МПА) и культивировали в течение 5 сут при 37 °С. Выросшие на поверхности мембранных фильтров колонии фиксировали парами 25 % глутарового альдегида, 2-кратно обезвоживали парами пропиленоксида, монтировали на медные подложки и напыляли золотом на установке Hitachi-E-102 (Япония). Морфологию популяций сальмонелл исследовали на электронном микроскопе Hitachi-800 со сканирующей приставкой Hitachi-8010 (Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и инструментальном увеличении от $\times 1$ до $\times 30\,000$.

Для сравнения морфологии выявленных стабильных и нестабильных L-форм бактерий использовали модуляционный интерференционный микроскоп (МИМ, модель МИМ-321) производства ООО «Лаборатории АМФОРА» (Россия). Препараты готовили следующим образом: на зеркальную подложку, предварительно покрытую тонким слоем парафина, наносили 10 мкл культуры сальмонелл (10^5 кл/мл), которую, как при подготовлении мазка крови, с помощью специального стекла равномерно тонким слоем распределяли по поверхности. Для исследования процесса L-трансформации на поверхность бактерий помещали каплю глицерина с растворенным в нем тетрациклином (25 мкг).

Данные обрабатывали статистически с использованием программных пакетов MIM-Visualizer производства ООО «Лаборатории АМФОРА» (Россия) и Microcal ORIGN

Результаты. Ультраструктурный анализ (ПЭМ) выявил у сальмонелл характерное для грамотрицательных бактерий строение клеточной стенки. Она состояла из наружного липопротеидного и внутреннего муко-пептидного (пептидогликан) слоя в виде одноконтурной структуры, оп-

ределяющей ригидность клеточной стенки. За ней располагался жизненно важный органоид — цитоплазматическая мембрана, представленная характерной трехслойной липопротеидной структурой (мембрана Робертсона). Основной генетический компонент бактерии — молекула ДНК (нуклеоид, не имеющий оболочки) была свободно распределена среди рибосом и полирибосом цитоплазмы (5).

В то время как ультраструктурный анализ (ПЭМ) позволяет выявлять только статическое состояние органоидов, МИМ дает возможность без трудоемкой предварительной пробоподготовки изучать в режиме реального времени нативную структуру бактериальной клетки и естественное состояние ее органоидов.

Принцип действия использованного нами микроскопа МИМ основан на измерении разности фаз $\Delta\phi$ при прохождении лазерного излучения через микрообъект (6, 7). На рисунке 1 (цветная вклейка после стр. 56) схематично показано возникновение локальных задержек фазы в случае модельного объекта — эритроцита человека. Для нахождения искомой функции $\Delta\phi$ объект освещают плоским волновым фронтом. При прохождении через объект фронт приобретает локальные задержки фазы, которые зависят от плотности и геометрии объекта. Для определения величины задержки используется интерферометр, в котором световая волна, прошедшая через объект, складывается с плоской опорной волной. Возникающая таким образом интерференционная картина позволяет вычислить искомую задержку фазы $\Delta\phi$.

Трехмерное представление функции $\Delta\phi(x, y, z)$ называется фазовым портретом, который относят к классу функциональных изображений, где информация представлена в виде распределения количественного параметра — разности фаз $\Delta\phi(x, y)$ световой волны, связанной с оптической плотностью исследуемого микрообъекта. Для простоты восприятия и интерпретации фазовых портретов разность фаз, измеряемая в градусах, может быть выражена в нанометрах. Для визуализации внутренних структур клетки использовался метод градиентной фильтрации изображения, который позволяет визуализировать области с максимальной крутизной рельефа. У МИМ-321 разрешение превосходит таковое у классических оптических микроскопов и достигает от 150 до 15 нм в зависимости от оптических свойств измеряемого объекта и техники исследования.

На изображениях сальмонелл в контроле, полученных методами ПЭМ (рис. 2, А, см. цветную вклейку после стр. 56) и МИМ (см. рис. 2, Б), видна многослойная клеточная стенка, цитоплазма и нуклеоид. Разница в размерах сальмонелл была обусловлена неодинаковыми способами пробоподготовки: для изучения ультраструктуры проводили фиксацию, обезвоживание и заливку в эпоксидные смолы, что уменьшает объем и размеры структурных элементов бактериальной клетки, в то время как прижизненное исследование на МИМ-321 дает реальный фазовый портрет поверхностных и внутренних структур.

Поскольку при сканирующей электронной микроскопии применялись щадящие методы фиксации и обезвоживания, не нарушающие естественную архитектонику в микробном сообществе, удалось получить объективную информацию о нативном состоянии бактерий в популяциях (8–10). Было установлено, что бактерии формируют колонии и микроколонии, где тесно связаны между собой благодаря наличию экзопродуктов различной природы, продуцируемых клеточной стенкой и образующих межклеточный матрикс, от степени развития которого зависит образование покровов — биопленок (см. рис. 2, Б, слева).

Как известно, неблагоприятное воздействие на бактерии приводит к нарушению нормального бинарного деления. Использование МИМ-321 позволило на ранних стадиях в реальном времени регистрировать влияние L-трансформирующего фактора. Так, при воздействии тетрациклина зафиксировали нарушения целостности клеточной стенки, что свидетельствует о начальной стадии проявления гетероморфизма (рис. 3, б, в; см. цветную вклейку после стр. 56).

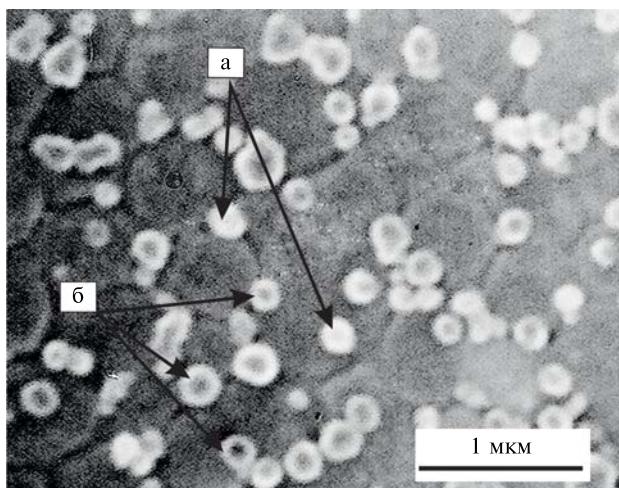


Рис. 4. Нестабильные (а) и стабильные (б) L-формы *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* после воздействия биологически активных веществ, продуцируемых *Bacillus subtilis*. Электронный микроскоп Hitachi-800 (Япония) со сканирующей приставкой Hitachi-8010.

(рис. 4, б; 5, ж).

Для изучении закономерностей процессов L-трансформации исследовали воздействие биотических (биологически активные вещества, продуцируемые *B. subtilis*) и абиотических (антибиотик тетрациклин) факторов на популяции сальмонелл.

На фазовых портретах содержащей и лишенной ДНК L-формы (см. рис. 5, цветная вклейка после стр. 56) четко видно, что нестабильные L-формы (см. рис. 5, а, г, е), в которых присутствует ДНК, представляли собой сферу с выпуклой вершиной, в то время как стабильные L-формы (см. рис. 5, б, д, ж) были уплощенными, с пустым центром, что отражено на профилях фазовых портретов (см. рис. 5, в).

При сравнении градиентных фазовых портретов, полученных на МИМ-321, у части L-форм в центре выявлялись плотные кольцевидные структуры, предположительно идентифицированные нами как ДНК (см. рис. 5, г), которые, однако, обнаруживались не всегда (см. рис. 5, д).

После воздействия тетрациклина число нестабильных L-форм, содержащих ДНК и потенциально способных к реверсии, в популяциях не превышало 25 % исследуемых клеток. Полученное нами в результате статистической обработки процентное соотношение стабильных и нестабильных L-форм — величина непостоянная, которая зависела в первую очередь от L-трансформирующего агента, а также от ряда других факторов, требующих дальнейшего изучения.

Следует отметить, что процесс реверсии клеток в исходное состояние занимал больше времени, чем нормальное развитие бактериальной популяции (5 сут). После подращивания на мембранных фильтрах наблю-

При исследовании L-трансформирующего действия БАВ, продуцируемых *B. subtilis*, на популяции сальмонелл с использованием СЭМ мы наблюдали образование мелких L-форм разного размера (0,2-0,5 мкм) (рис. 4).

Было установлено, что по морфологическим критериям L-формы различались между собой. Часть мелких клеток имели вид выпуклого однородного шара (см. рис. 4, а; рис. 5, е), в то время как другие представляли собой уплощенную сферу с выраженным темным центром (см.

дался трудноразличимый неконтрастный рост культуры в виде уплощенных мелких колоний (рис. 6, а).

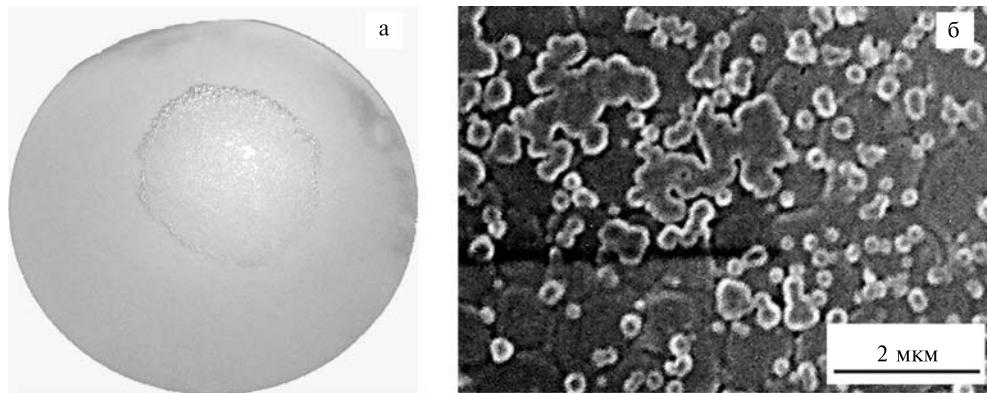


Рис. 6. Реверсия нестабильных L-форм в популяции *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*: а — рост на мембранных фильтрах Владивосток (ООО «Владивосток», Россия) на МПА, б — изображение микроколоний, полученное методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Электронный микроскоп Hitachi-800 (Япония) со сканирующей приставкой Hitachi-8010.

Исследование методом СЭМ продемонстрировало, что в центральной части популяции имеются клетки, способные к реверсии в исходное состояние, на что указывало формирование на поверхностях покровов, которые могут образовываться только при полной репарации клеточных стенок. Процесс реверсии свидетельствовал о том, что эти нестабильные L-формы содержали полноценный геном и полностью сохраняли морфологические, биохимические и патогенные свойства. В то же время по периферии колонии обнаруживались единичные разрозненные уплощенные клетки с темным центром — стабильные L-формы (см. рис. 6, б), не способные к реверсии вследствие неполноценности ДНК, что позволяет рассматривать их как морфологических мутантов, фенотип которых генетически детерминирован (3).

Таким образом, исследование процесса L-трансформации в популяции *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* методами сканирующей, просвечивающей электронной (СЭМ, ПЭМ) и лазерной модуляционной интерференционной микроскопии (МИМ) дало возможность выявить закономерные морфологические признаки L-форм, способных реверсировать в исходное состояние. С появлением методов оптической микроскопии, обладающих сверхразрешением, стало доступно изучение L-трансформации в режиме реального времени на живых бактериях (без фиксации и окрашивания). Полученные с помощью МИМ трехмерные фазовые портреты позволили не только однозначно идентифицировать L-формы бактерий, но и с высокой точностью определить основные морфологические параметры клеток (диаметр, периметр, высота, площадь, объем). С применением современных алгоритмов обработки этих данных внутри нестабильных L-форм зарегистрированы кольцевые структуры (предположительно ДНК). Следует отметить, что гетероморфизм со всеми проявлениями L-трансформации характерен для популяций патогенных и условно патогенных бактерий и способствует выживанию вида как в норме, так и при воздействии любых абиотических и биотических факторов. Изучение биологических особенностей L-трансформации имеет важное значение для понимания процессов существования потенциальных резервуаров возбудителей в природе, а также в патогенезе рецидивов хронических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

- Пешков М.А. Сравнительная цитология синезеленых водорослей, бактерий и актиномицетов. М., 1966.
- Тимаков В.Д., Каган Г.Я. L-формы бактерий и семейство *Mycoplasmataceae* в патологии. М., 1973.
- Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий (механизм образования, структура, роль в патологии). М., 1981.
- Павлова И.Б., Куликовский А.В., Ботвинко И.В. Электронно-микроскопическое исследование развития бактерий в колониях. Гетероморфный рост бактерий в процессе естественного развития популяций. ЖМЭИ, 1990, 12: 12-15.
- Авакян А.А., Кац Л.Н., Павлова И.Б. Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных. М., 1972.
- Лопарев А.В., Игнатьев П.С., Индукаев К.В., Осипов П.А., Мазалов И.Н., Козырев А.В. Высокоскоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований. Измерительная техника, 2009, 11: 60-64.
- Игнатьев П.С., Индукаев К.В., Осипов П.А., Сергеев И.К. Лазерная интерференционная микроскопия для нанобиотехнологий. Медицинская техника, 2013, 1: 277.
- Павлова И.Б. Закономерности развития популяций бактерий в окружающей среде (электронно-микроскопическое исследование). Докт. дис. М., 1999.
- Павлова И.Б., Ленченко Е.М., Банникова Д.А. Атлас морфологии популяций патогенных бактерий. М., 2007.
- Павлова И.Б., Банникова Д.А., Кононенко А.Б. Сапрофитизм популяций патогенных листерий. М., 2013.

¹ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии,
123022 г. Москва, Звенигородское ш., 5,
e-mail: aarsenuk@gmail.com;

²ООО «Лаборатории АМФОРА»,
123007 г. Москва, ул. 5-я Магистральная, 11, офис 18,
e-mail: ips@amphoralabs.ru

Поступила в редакцию
24 апреля 2013 года

EXAMINATION OF L-TRANSFORMATION IN *Salmonella* BY ELECTRON AND LASER INTERFERENCE MICROSCOPY

A.Yu. Arsenyuk¹, I.B. Pavlova¹, P.S. Ignat'ev²

Summary

The existence of bacteria without a cell wall was found to be a quite specific and widespread phenomenon, which could not be explained in terms of classical microbiology. The L-transformation of bacteria makes difficult determining the pathogens and leads to the false-negative conclusions of biological assays because of L-forms are in uncultivated state. The L-transformation caused by abiotic (tetracycline) and biotic (*Bacillus subtilis*) factors as well as reversion of L-forms were studied in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* population using transmission electron and laser interference microscopy. The morphological parameters of L-forms, which are able to reverse in an initial state, were revealed. Development of super-resolution optical microscopy methods makes possible conducting real-time studies of L-transformation with the living non-modified bacteria. The 3D phase portraits obtained using laser interference microscope MIM-321 make it possible to identify L-forms clearly as well as to determine its basic morphological parameters (diameter, perimeter, height, surface, volume). The ring shaped structures (supposedly identified as DNA) were detected using the modern algorithms of signal processing. It is important to note that heteromorphism including all stages of L-transformation is inherent for all pathogenic and conditionally pathogenic bacteria (both in normal conditions and under biotic and abiotic factors treatment) to provide population survival. The study of L-transformation is extremely important for understanding of potentially infectious agent's reservoirs as well as chronic disease relapses in vivo.

Вниманию читателей! Вышли в свет книги:

И.Б. Павлова, Е.М. Ленченко, Д.А. Банникова. Атлас морфологии популяций патогенных бактерий. М.: изд-во «Колос», 2007, 180 с. (одобрено и рекомендовано к изданию секцией «Ветеринарная санитария, гигиена и экология» Отделения ветеринарной медицины Российской академии сельскохозяйственных наук)