

УДК 579.22 - 861.1:616.9-036.2:504.53: 622.271. 4:579.887.111:57.086.3

ФОРМЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО «ПОКОЯ» В РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПАХ

В.М. Катола

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт геологии и природопользования ДВО РАН, г. Благовещенск

С помощью электронной микроскопии в воде реки Амур, питьевой воде муниципальной водопроводной сети, городской почве и многолетних отходах золотодобычи, независимо от содержания в них тяжелых металлов, в том числе ртути, содержатся как типичные палочковидные клетки, так и элементарные тельца, их агрегаты и дочерние особи неидентифицированных бактерий, конвертированных в L- формы. Все эти формы существуют как в планктонном состоянии, так и в виде биопленки, препятствующей их обнаружению и идентификации рутинными бактериологическими методами. В отличие от цистоподобных покоящихся клеток некультивируемых форм бактерий некоторые элементарные тельца делятся (размножаются) непосредственно в воде, почве и отходах золотодобычи.

Ключевые слова: *некультивируемые формы бактерий, речная и питьевая вода, почва, отходы золотодобычи, L- формы бактерий, электронная микроскопия.*

Forms of bacterial "rest" in different biotopes

V.M. Katola

Federal State Institution of Science, Institute of Geology and Nature Management FEB RAS, Blagoveshchensk

Regardless of the content of heavy metals, including mercury, in the water of Amur River, drinking water of municipal water-supply, urban soil and long-term gold mining wastes, there are typical rod-shaped cells, elementary bodies, their aggregates and subsidiary species of unidentified bacteria converted into L-forms, detected by electron microscopy. All of these described forms exists in planktonic and biofilm states, which impedes their detection and identification by routine bacteriological methods. In contrast to the cyst-like resting uncultured cells, some forms of bacteria divide (multiply) into elementary bodies directly in the water, soil and gold mining wastes.

Key words: *nonculturable forms of bacteria, river and drinking water, soil, gold mining wastes, L-forms of bacteria, electron microscopy.*

Введение

Реагируя на разнообразные физические, химические и биологические стрессоры, ограниченный круг микроорганизмов образует анабиотические формы (эндо- и экзоспоры, микроспоры, цисты). Большая же часть микробного населения для сохранности вида в условиях измененной среды переходит в некультивируемые формы (НФ) или VBNC (viable but non cultivable) [2, 3, 11]. Экспериментальным путем доказано, что в такое состояние переходят культуры почти 50 видов неспорообразующих потенциально- патогенных и патогенных бактерий (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* и др.) [8, 10, 12, 13, 20]. У НФ изменяется ультраструктурная организация клетки, резко понижается метаболизм, энергетический заряд, мембранный потенциал и др. Они не способны формировать колонии на плотных питательных средах, но сохраняют жизнеспособность, вирулентность и продукцию токсинов [7, 11, 14, 15, 17, 18]. Такие «перестроенные» клетки было рекомендовано называть цистоподобными покоящимися клетками (ЦПК) [7]. Молекулярный механизм инициации перехода бактерий в НФ или выхода из них мало изучен. Однако с улучшением качества среды, при проникновении в организм хозяина или модификации условий роста (лимит по N и P) НФ возобновляют пролиферацию [8]. С помощью полимераазной цепной реакции (ПЦР) НФ идентифицированы в организме животных и растений, в природных водоемах, питьевой воде, почве, горячих источниках и пр. [11, 14, 16].

В настоящей работе представлены результаты изучения внешней структуры бактериальных популяций непосредственно в речной, питьевой воде и почве города Благовещенска и многолетних отходах золотодобычи. Во- первых, размеры экспансии НФ в объектах окружающей среды остаются недостаточно исследованными. Во- вторых, на их расселение могут воздействовать климато-

географические условия, экологические факторы и степень загрязнения места обитания, особенно тяжелыми металлами. Так, воды реки Амур в районе Благовещенска нейтральны или слабощелочные, монотонны по минерализации, уровню взвешенных частиц и среднему содержанию (мг/дм^3) Hg (0,0003), Pb (0,002), Cu (0,004) и Zn (0,03) [9]. Содержание элементов в воде коммунальной водопроводной сети (из-под крана и колонок) несколько меньше (мг/л): Fe- 0,17 (0,3 ПДК), Cu- 0,003 (1 ПДК), Co- 0,0018 (0,1 ПДК), Mn- 0,029 (0,1 ПДК), Ni- 0,0055 (0,1 ПДК), Cr <0,001 (0,05 ПДК), Pb- 0,004 (0,03 ПДК), Zn- 0,007 (1 ПДК) и Hg- 0,0001 (0,0005 ПДК), тогда как в почве городских парков и скверов сверх ПДК накапливаются Co (2- 4 ПДК), Cr (6 - 10 ПДК), Cu (5 -10 ПДК), Ni (5 - 10 ПДК), Zn (2- 4 ПДК), Sb (1- 3 ПДК), Pb (1- 1,5 ПДК) и Mn (0,3-0,6 ПДК). Различается и распределение ртути, но ее количество не достигает ПДК [6]. В отличие от этих экосистем в многолетних отходах золотодобычи – хвостах шихтообогатительной установки (ШОУ) Софийского золотоносного узла (Хабаровский край) скопились промышленные запасы (г/т) Au ($18 \pm 3,51$), Ag ($160,0 \pm 36,7$), Co ($56 \pm 6,00$), Cr ($3000,0 \pm 1204, 1$), Hg ($160 \pm 36,74$), Ni ($240 \pm 74,83$), Cu ($326 \pm 49,08$), Pb ($340 \pm 92,73$), Zn ($108 \pm 18,00$), As ($5800,0 \pm 800,2$) и других элементов.

Материалы и методы

Воду из реки Амур, водопроводной сети (из-под крана и колонок) и водную вытяжку из почвы в объемах 0,1 мл наносили на поверхность липкой ленты, закрепленной на торце объектного столика электронного микроскопа. Заодно воду наносили на сеточки с формваровой подложкой, а из почвы и отходов золотодобычи получали препараты-отпечатки. Все препараты подсушивали в чашках Петри, напыляли (кроме сеточек с подложкой) углеродом в вакуумной установке ВУП-4 и просматривали в сканирующем (СЭМ) и просвечивающем (ПЭМ) электронных микроскопах LEO 1420 (Германия), JEOL jsm 35 C (Япония) и TESLA BS 500.

Результаты и обсуждение

Из рис. 1-6 видно, что при продолжительной персистенции в окружающей среде некоторые клетки неоднородной бактериальной популяции изменяют морфологию. Непосредственно в речной и питьевой воде (рис. 1, 2), в почве (рис. 3) и в отходах золотодобычи (рис. 5, 6) визуализируются различные микроскопические и субмикроскопические формы не идентифицированных бактерий: а) электронноплотные округлые образования (структуры, клетки, тельца) в количестве от единиц до многих десятков в полях зрения, с ровными четкими контурами, без каких-либо включений на поверхности или внутри клетки и диаметром 0,15 - 0,4 мкм; б) неодинаковой величины и формы их конгломераты (микроколонии); в) прямые или слегка изогнутые палочковидные клетки, хорошо видимые в ПЭМ. Не исключено, что все эти формы могут принадлежать бактериям не одного, а многих видов разных таксономических групп.

Главное же в том, что в отличие от ЦПК некультивируемых бактерий, утративших способность к росту и размножению, отдельные тельца активно делятся (размножаются) неравномерно пополам либо почкованием, образуя дочерние особи, тем самым подчеркивая свою жизнеспособность и готовность к репродукции. Такое атипичное деление позволяет оценивать эти структуры как репродуктивные единицы, иначе, элементарные тельца (ЭТ) бактерий, которые конвертированы в форме CWDB (cell wall- deficient/defective bacteria – бактерии с дефектной или отсутствующей клеточной стенкой), широко известные как L- формы.

По сведениям И.В. Елисеевой и др. [4] ЭТ являются универсальным признаком L- форм грамположительных и грамотрицательных бактерий. Они обладают бактериальным геномом, минимальным обменом веществ, могут агрегировать в конгломераты, самостоятельно развиваться, сохранять патогенные потенции и реверсировать в бактерии с полноценной клеточной стенкой. На стандартных лабораторных средах они не растут, но образуют характерные колонии L- форм на средах, содержащих триптический перевар бычьего сердца, сыворотку и дрожжевой экстракт. Особенно поражает устойчивость ЭТ к высушиванию (до 10 лет) и сохранению регенеративных свойств при нагревании до 100°C в течение нескольких минут или часа.

Обнаруженные нами бактериальные морфотипы обитают в биотопах как в свободном (планктонном) состоянии, так и иммобилизованы в биопленку. Кстати, конгломераты ЭТ также окружены тонким экзополимерным матриксом. В настоящее время считается, что 99,9% бактерий существует в природе и организме человека и животных именно в виде биопленки [1, 2, 5, 19]. Будучи частью жизненного цикла бактерий, она необходима им для выживания в неадекватных (стрессорных) местах обитания, имеет различную структуру, толщину, форму и формируется одновременно с микроколониями сразу же после адгезии клеток к любой твердой поверхности.

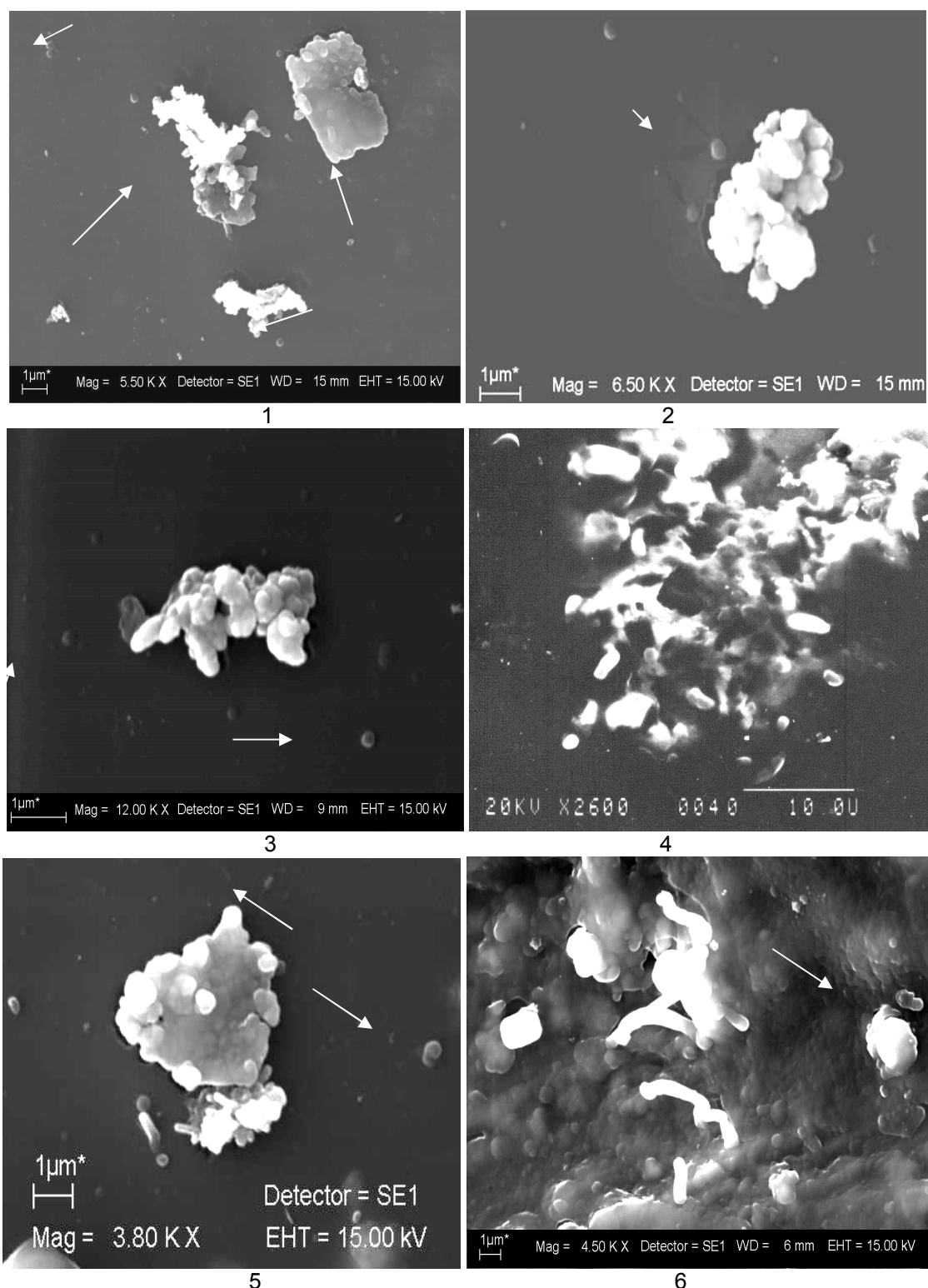


Рис. 1-6. Сканирующая электронная микроскопия: 1 – короткой стрелкой отмечены элементарные тельца (ЭТ), длинной стрелкой – их конгломераты и фрагменты биопленки в воде р. Амур (x 5500);
2 – ЭТ и их конгломерат в питьевой воде (x 6500);
3 – ЭТ и их конгломерат в городской почве (x 12000);
4 – поврежденная биопленка, палочковидные клетки и ЭТ в городской почве (препарат-отпечаток, x 2600);
5 - фрагмент биопленки с ЭТ, планктонные ЭТ (стрелкой показано их деление) и палочковидная клетка в отходах золотодобычи (препарат-отпечаток, x 3800);
6 – палочковидные клетки и ЭТ (стрелкой отмечено их деление) в биопленке из отходов золотодобычи (препарат-отпечаток, x 4500).

Биопленка объединяет функционально различные микробные популяции в сообщества, где каждая клетка имеет собственную микроэкологическую нишу, размножается, надежно защищена, обеспечена питанием и коммуникациями с другими клетками и внешней средой. В наших случаях, несмотря на повреждение биопленки при получении препаратов-отпечатков из почвы или отходов золотодобычи, в ней можно различить микроколонии, принадлежащие ЭТ (рис. 1, 5) либо их ассоциации с палочковидными клетками (рис. 4, 6). Причем, в процессе деления последних образуются разнообразные по длине и ширине нитевидные структуры, которые не ветвятся и не имеют отростков, чем и отличаются от гиф плесневых грибов.

Таким образом, в речной и водопроводной питьевой воде, в городской почве и многолетних отходах золотодобычи в виде биопленки существуют довольно однотипные бактериальные формы – ЭТ и их агрегаты, что является не только гарантией выживаемости и видовой сохранности бактерий в природных и искусственных системах. Обрывки биопленки способны переноситься с пылью, водой и продуктами питания и создавать проблемы для человека. В частности, вымываясь атмосферными осадками из почвы и отходов золотодобычи, пленочные бактерии поступают в Амур и совместно с речной биопленкой могут вызывать биообрастания и деструкцию гидрологических сооружений, систем водоснабжения, водопроводов и др. Преодолев методы водоочистки, они с питьевой водой попадают в иммунокомпрометированный организм, где восстанавливаются в исходные бактериальные клетки. В зависимости от своей концентрации и биологических особенностей ревертанты могут индуцировать инфекционную и неинфекционную патологию, в первую очередь, вспышки водных инфекций. При этом источник заболевания не всегда выявляется. Более того, биопленка влияет на развитие, диагностику, течение и исход заболевания.

Выводы

1. В воде реки Амур, питьевой воде муниципальной водопроводной сети, городской почве и в многолетних отходах золотодобычи, независимо от присутствия в объектах того или иного количества тяжелых металлов, в том числе ртути? или технологии обеззараживания воды, содержатся типичные бактериальные клетки, а также ЭТ, их конгломераты (агрегаты) и дочерние особи неидентифицированных бактерий, конвертированных в L-формы.
2. Непосредственно в воде, почве и многолетних токсичных отходах золотодобычи ЭТ, в отличие от ЦПК некультивируемы бактерий, способны делиться (размножаться).
3. Обнаруженные в речной и питьевой воде, почве и многолетних отходах золотодобычи L-трансформанты находятся как в планктонном состоянии, так и в биопленке, что препятствует их выявлению и идентификации рутинными бактериологическими методами. Но попадая в иммунокомпрометированный организм, они могут реверсировать в исходные виды и вызывать разнообразные заболевания, в том числе вспышки инфекций, передающихся водным путем.

Литература

1. Белобородова Н.В., Байрамов И.Т. Микробные биопленки // Сб. материалов V ежегодной Московской конф. «Гнойно-септические заболевания у детей» с участием регионов России и СНГ 5-6 июня 2009 г. Москва. – М. 2009. – С. 7-38.
2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. – М.: Медицина, 2005. – 363 с.
3. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию: Учебное пособие. – М.: Книжный дом «Университет», 2001. – 256 с.
4. Елисеева И.В., Бабич Е.М., Волянский Ю.Л. и др. О роли латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека // Анналы Мечнивского Института. – 2006. – № 1. – С. 12-46.
5. Заславская Н. В., Артеменко Н. К., Чижевская М. М., Тец. В. В. Особенности выживаемости бактерий в микробных сообществах // Клини. микробиол., антимикроб. химиотер. – 2000. – № 2. – С. 2-19.
6. Катола В.М. Токсичные металлы в окружающей среде Благовещенска // Экол. и пром. России. – 2010. – № 3. – С. 27-29.
7. Мулюкин А. Л. Покоящиеся формы неспорообразующих бактерий: свойства, разнообразие, диагностика. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2010. – 48 с.
8. Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П., Стоянова Л.Г. Роль некультивируемых форм неспорообразующих бактерий в поддержании гомеостаза популяции // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2010, – № 4. – С. 57-66.
9. Радомский С.М., Радомская В.И., Катола В.М. Токсичные металлы в элементах биоценозов реки Амур // Проблемы региональной экологии. – 2007. – № 6. – С. 37-42.
10. Салина Е.Г. «Некультивируемые» формы бактерий *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* И *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* и их биохимическая характеристика. Автореф. дис. ... канд. биол.

наук. – М., 2006. – 26 с.

11. Соколенко А.В. Некультивируемые формы бактерий: распространение в природе, индукторы некультивируемого состояния и реверсии / Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 2. – С. 11- 15.

12. Тафельштейн Э.А., Голубинский Е.П., Марамович А.С. и др. Экспериментальное получение некультивируемых форм *Vibrio cholerae* eltor и характеристика их биологических свойств // Журн. микробиол. – 2004. – № 1. – С.13- 18.

13. Шлеева М.О. Покоящиеся формы бактерий рода *Mycobacterium*: получение, биохимические факторы реактивации. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Москва, 2004. – 22 с

14. Aulet O., Silva C., Fraga S.G. et al. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucuman rivers, Argentina // Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. – 2007. – № 40. – P. 385- 390.

15. Chaivanan S., Sitthipan C., Grim C. et al. Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae* // Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 9, № 2. – P. 393-400.

16. Dong-Geun L., Park S.J., Kim S-J. Influence of Pipe Materials and VBNC Cells on Culturable Bacteria in a Chlorinated Drinking Water Model System. // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007; – № 17. – 1558-1562.

17. Ganesan B., Stuart M.R., Weimer B.C. Carbohydrate Starvation Causes a Metabolically Active but Nonculturable State in *Lactococcus lactis* // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – № 73. – P.2498- 2512.

18. Haque M.M., Khan S.I., Ahsan C.R. Influence of Some Physicochemical Stresses on the Survival of *Vibrio cholerae* O1 at Non-Culturable State / Bangladesh J Microbiol. – 2007. – № 24. – P. 133- 136.

19. Kaplan J.B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications and Potential Therapeutic Use // J. Dent. Res. – 2010. – Vol. 89, № 3. – P. 205- 218.

20. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria // Microbiol Rev. – 2010. – Vol.34, № 4. – P. 15-25.

Сведения об авторе

Катола Виктор Моисеевич, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник,
Институт геологии и природопользования ДВО РАН.

E-mail: katola-amur@list.ru.