

УЛЬТРАСТРУКТУРА И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Л.М.Сомова¹, Е.И.Дробот¹, И.Н.Ляпун¹,
Е.В.Пустовалов¹, Е.В.Матосова¹, М.Ю.Щелканов^{1,2}

¹ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, РФ; ²ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, РФ

Одной из причин возникновения хронических инфекций является способность возбудителей к переходу в некультивируемое состояние, что в немалой степени связано с применением антибиотиков. Исследована ультраструктура покоящихся бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, полученных из вегетативной формы штамма 512 путём ингибирования канамицином. На модели возбудителя псевдотуберкулёза показано, что переход прокариот в покоящееся состояние осуществляется посредством апоптоза бактерий. В цитоплазме ингибированных бактериальных клеток в зоне нуклеоида обнаружена фрагментация и конденсация хроматина с образованием электронно-плотных фибрилл, глыбок и крупных конгломератов, свойственных апоптозу. Полученные результаты имеют большое значение для понимания механизмов существования патогенов в разных условиях обитания, а также для идентификации возбудителей инфекционных болезней.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*; ультраструктура; дормантное состояние; некультивируемые бактерии; апоптоз бактерий

Некультивируемыми называют такие формы микроорганизмов, которые в ответ на действие неблагоприятных факторов прекращают рост на питательных средах, но сохраняют жизнеспособность, а при улучшении условий культивирования возобновляют пролиферацию [3]. В настоящее время известно около 45 видов микроорганизмов, относящихся к 30 родам, у которых обнаружено некультивируемое состояние. Среди бактерий, для которых установлено некультивируемое состояние, есть возбудители таких грозных инфекций, как чума [4], холера [9]. Более 60% видов бактерий, образующих некультивируемые формы, являются грамотрицательными. Высказано предположение, что

температура от 0.5 до 7°C является основным фактором, индуцирующим образование некультивируемых форм бактерий [10].

Переход бактерий в некультивируемое состояние зависит не только от температуры культивирования, но и от вида микроорганизма, его физиологического состояния, сопутствующих факторов. Накоплен экспериментальный материал, демонстрирующий способность некультивируемых форм возобновлять рост в благоприятных условиях. Сообщается о влиянии цитокинов на реверсию некультивируемых форм [2]. Некультивируемые вирулентные штаммы сальмонелл реверсировали *in vitro* и *in vivo* в присутствии ФНО [2]. Широкое распространение некультивируемых форм в природе, способность патогенных и условно-патогенных бактерий переходить в некультивируемое состояние, индукция некультивируемых форм ан-

Адрес для корреспонденции: l_somova@mail.ru. Сомова Л.М.

DOI 10.47056/0365-9615-2021-172-12-724-728

тибиотиками обуславливают социально-экономическое и санитарно-гигиеническое значение некультивируемых бактерий. Сведения о морфологии некультивируемых форм патогенных бактерий практически отсутствуют.

Цель данного исследования — определить ультраструктуру жизнеспособных, но некультивируемых бактерий штамма 512 *Y. pseudotuberculosis*, полученных из его вегетативной формы путём ингибирования канамицином.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовался штамм 512 *Y. pseudotuberculosis* первого серовара из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, хранившийся в полужидком агаре Хоттингера рН 7.2±0.1 под вазелиновым маслом при 4-8°C. Покоящаяся форма *Y. pseudotuberculosis* была получена из культуры вегетативного штамма 512 путём воздействия антибиотика канамицина с большой ингибирующей способностью в концентрации 15×10⁵ мкг/мл. На 21-е сутки наблюдения из колоний ингибированного штамма 512 *Y. pseudotuberculosis* была приготовлена бактериальная суспензия для электронной микроскопии. В качестве контроля исследована ультраструктура вегетативного штамма 512 *Y. pseudotuberculosis* до воздействия канамицина.

Образцы бактерий для трансмиссионной электронной микроскопии отбирали путём центрифугирования культуральных сред в течение 20 мин при 1800 об/мин. Полученные бактериальные суспензии фиксировали при комнатной температуре (20-22°C) в течение 1 ч фиксатором Ито, содержащим 1.25% параформальдегида,

2.5% глутарового альдегида, 0.03% хлорида кальция и 0.03% пикриновой кислоты на 0.15 М фосфатно-буферном растворе рН 7.3. Отмытые от фиксатора суспензии дофиксировали 1% раствором OsO₄ в течение 18 ч. Затем клетки обезживали в этаноле возрастающей концентрации при 4°C, проводили при комнатной температуре через смесь абсолютного этанола с акриловой смолой LR white Resins (Sigma-Aldrich) и заливали в чистую акриловую смолу LR white Resins (Sigma-Aldrich).

Серийные ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB-V, контрастировали насыщенным раствором уранилацетата на 8% забуференном формалине и дополнительно щелочным 0.02 М раствором цитрата свинца (Serva). Срезы толщиной ~80 нм просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100 S (JEOL) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микрофотосъёмку проводили на фотопластинки ПФП-01 Т (ОАО "Компания Славич"). Фотопластинки обрабатывали в проявителе Д-19 в течение 1.5 мин при 20°C и фиксировали в водном растворе тиосульфата натрия 20 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольной культуре *Y. pseudotuberculosis* выявлены бактерии палочковидной и овоидной формы со слегка извилистой клеточной стенкой, с отчётливо выраженным периплазматическим пространством и зоной нуклеоида, содержащего диспергированный хроматин (рис. 1, а). В некоторых клетках наблюдалось разрежение зоны нуклеоида, имевшего мелкопузырчатый вид (рис. 1, б).

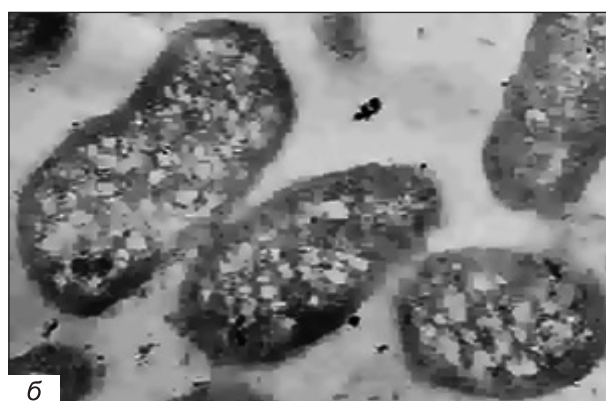
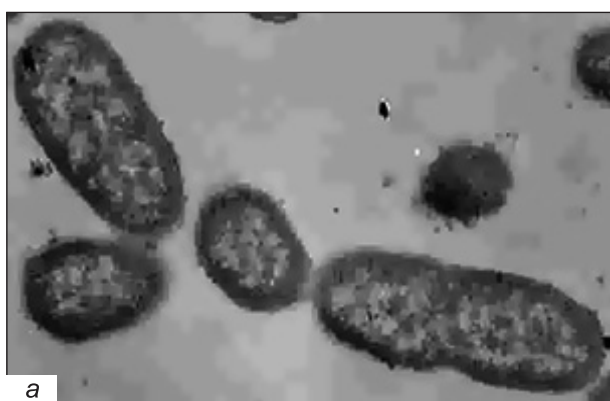


Рис. 1. Ультраструктура вегетативных бактерий *Y. pseudotuberculosis* до воздействия канамицином. Трансмиссионная электронная микроскопия, ×15 000.

а — бактерии с центральной, отчётливо выраженной зоной нуклеоида и периферической зоной, насыщенной хромосомами; б — бактерии с разреженной зоной нуклеоида.

В ингибированной канамицином культуре *Y. pseudotuberculosis* в подавляющем большинстве бактериальных клеток наблюдались выраженные ультраструктурные изменения в зоне нуклеоида, которые являются проявлением апоптоза бактерий. Эти изменения характеризовались фрагментацией и конденсацией хроматина с образованием несвойственных вегета-

тивным клеткам электронно-плотных фибрилл и глыбок, а также более крупных конгломератов в цитоплазме бактерий (рис. 2, а, б). Электронно-плотные конгломераты хроматина преимущественно локализовались в периферической зоне бактериальных клеток. Вследствие разной степени повреждений нуклеоида в популяции бактерий *Y. pseudotuberculosis*, ингибированных

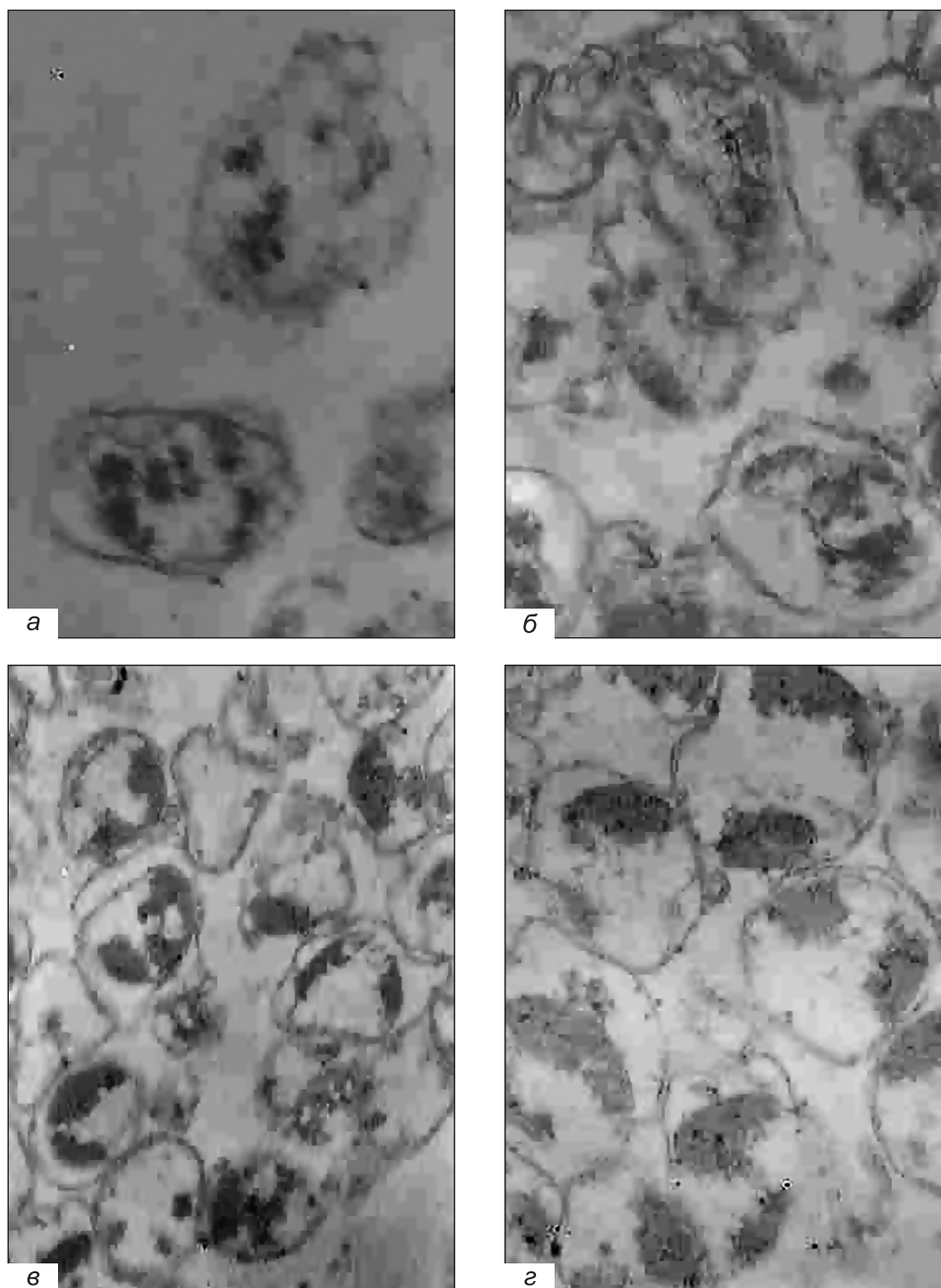


Рис. 2. Ультраструктура покоящихся бактерий *Y. pseudotuberculosis*, полученных из их вегетативной формы при воздействии канамицином. Трансмиссионная электронная микроскопия, $\times 15\ 000$ (а, б, в), $\times 10\ 000$ (г). а — электронно-плотные глыбки хроматина в зоне нуклеоида; б — апоптотические повреждения с фрагментацией и конденсацией хроматина; в — электронно-плотные конгломераты с локализацией по периферии клеток; г — бактерии с тёмным и пустым цитозолем.

канамицином, формировались клетки с тёмным и пустым цитозолем (рис. 2, в, г), которые были аналогичны клеточным формам, выявленным нами в статических бактериальных культурах при длительном хранении в условиях низкой температуры [7].

До 1990 г. сообщений о программированной клеточной гибели бактерий (Programmed Cell Death, PCD) было немного [1], но в последние годы увеличилось количество доказательств апоптозоподобных процессов у бактерий [12,14]. Показано [8], что клетки *E. coli*, обработанные повреждающими ДНК агентами и антибиотиками, обладают несколькими характеристиками, обычно связанными с апоптозом, включая фрагментацию ДНК, конденсацию хромосом, внеклеточное воздействие фосфатидилсерина (PS) и деполяризацию мембраны [11]. В работе [13] также описана апоптозоподобная гибель *E. coli*, которая характеризуется воздействием фосфатидилсерина на внешний листок плазматической мембраны и конденсацией хромосом. Этими же исследователями показано, что апоптозоподобная гибель индуцируется не только агентами, повреждающими ДНК, но и различными антибиотиками. По данным [11], прокариоты обладают необходимым биохимическим механизмом для облегчения своего собственного уничтожения в ситуациях, когда гибель клеток была вызвана функционально различными антибактериальными препаратами.

Возбудитель псевдотуберкулёза при длительном пребывании в нестерильной почве изменяется в сторону сапрофитизации, что подтверждает парадигму о том, что этот патоген приспособлен к сапрофитному образу жизни, и это является одной из фаз его существования в природе в некультивируемом состоянии [5]. Ранее нами показано, что ультраструктурными признаками *Y. pseudotuberculosis* в состоянии сапрофитизма является сконденсированный нуклеоид по сравнению с диспергированным его состоянием у вегетативного штамма [6].

Таким образом, нами установлены ультраструктурные изменения бактерий *Y. pseudotuberculosis*, находящихся в покое (дормантном) состоянии, которые характеризуются конденсацией и фрагментацией хромосомной ДНК, появлением в цитоплазме электронно-плотных фибрилл, глыбок и конгломератов. Наблюдаемая картина деградации хроматина с исчезновением зоны нуклеоида и упаковками электронно-плотного материала в периферической зоне бактериальной клетки является проявлением

преапоптоза и апоптоза у прокариот. В покоей культуре *Y. pseudotuberculosis* идентифицированы бактерии с тёмным или пустым цитозолем при сохранении их клеточной стенки. На модели *Y. pseudotuberculosis* получены морфологические доказательства того, что переход прокариот в покоее состояние осуществляется посредством апоптоза бактерий. Можно предположить наличие общих механизмов формирования апоптотических и дормантных форм патогенов. Полученные результаты имеют фундаментальное и прикладное значение для понимания механизмов существования патогенов в разных условиях обитания, а также для идентификации возбудителей инфекционных болезней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Стратегия программированной клеточной гибели у прокариот // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 15-26. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-15-26
2. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Цитокины — возможные активаторы роста патогенных бактерий // Вестник РАМН. 1999. № 1. С. 13-17.
3. Соколенко А.В. Некультивируемые формы бактерий: распространение в природе, индукторы некультивируемого состояния и реверсии // Соврем. науч.-технол. 2006. № 2. С. 11-15.
4. Солохина Л.В., Пушкарева В.И., Литвин В.Ю. Образование покоейших форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зеленых водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001. № 3. С. 17-22.
5. Сомов Г.П., Бузалева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток, 2004.
6. Сомова Л.М., Бузалева Л.С., Плехова Н.Г. Ультраструктура патогенных бактерий в разных экологических условиях. Владивосток, 2009.
7. Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Матосова Е.В., Бынина М.П. Ультраструктурные изменения бактерий статической культуры *Yersinia pseudotuberculosis* при длительном хранении в условиях низкой температуры // Бюл. экпер. биол. 2020. Т. 170, № 8. С. 192-195.
8. Bayles K.W. Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox // Nat. Rev. Microbiol. 2014. Vol. 12, N 1. P. 63-69. doi: 10.1038/nrmicro3136
9. Campbell M.S., Wright A.C. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69, N 12. P. 7137-7144. doi: 10.1128/AEM.69.12.7137-7144.2003

10. *Currás M., Magariños B., Toranzo A.E., Romalde J.L.* Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment // *Dis. Aquat. Organ.* 2002. Vol. 52, N 2. P. 129-136. doi: 10.3354/dao052129
11. *Dwyer D.J., Camacho D.M., Kohanski M.A., Calhura J.M., Collins J.J.* Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis // *Mol. Cell.* 2012. Vol. 46, N 5. P. 561-572. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.027
12. *Erental A., Kalderon Z., Saada A., Smith Y., Engelberg-Kulka H.* Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli* // *mBio.* 2014. Vol. 5, N 4. ID e01426-14. doi: 10.1128/mBio.01426-14
13. *Erental A., Sharon I., Engelberg-Kulka H.* Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway // *PLoS Biol.* 2012. Vol. 10, N 3. ID e1001281. doi: 10.1371/journal.pbio.1001281.
14. *Lewis K.* Programmed death in bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64, N 3. P. 503-514. doi: 10.1128/MMBR.64.3.503-514.2000

Получено 12.11.21

