

Е. А. Денисова, В. В. Светличкин, З. А. Канарская

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГЕТЕРОМОРФИЗМ БАКТЕРИЙ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕГЕТАТИВНЫХ И L-ФОРМ *Staphylococcus aureus* В ОБЪЕКТАХ ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОГО КОНТРОЛЯ

Ключевые слова: Staphylococcus aureus, гетероморфизм, L-формы, ДНК-гибридизация.

Изучено влияние различных факторов, вызывающих гетероморфизм популяции Staphylococcus aureus в объектах ветеринарно-санитарного контроля и разработка методов дифференцированного определения вегетативных и L-форм этого возбудителя.

Keywords: Staphylococcus aureus, heteromorphism, L-form of DNA hybridization.

In this paper we study the influence of various factors causing population heteromorphism Staphylococcus aureus in objects veterinary and sanitary control and development of methods of vegetative and differentiated determination of L-forms of the pathogen.

Актуальность. Присутствие в исследуемых образцах измененных бактериальных клеток затрудняет их определение общепринятыми микробиологическими методами. Выявление не только вегетативных форм бактерий, но и клеток находящихся в стадии гетероморфного роста и L-трансформации, часть из которых при благоприятных условиях может реверсировать в исходное состояние с восстановлением патогенных свойств, является важным элементом при изучении зависимости микробной обсемененности объектов ветеринарно-санитарного контроля от различных факторов [1, 3].

Классические способы идентификации бактерий основаны на применении селективных питательных сред, позволяющих разделять микроорганизмы по их культурально - биохимическим свойствам. Недостаток данного анализа заключается в длительности и трудоемкости.

Для объективной оценки, не выявляемых традиционными методами L-форм бактерий наиболее перспективным являются методы ДНК-анализа.

Целью данных исследований являлось изучение влияния различных факторов, вызывающих гетероморфизм популяции *Staphylococcus aureus* в объектах ветеринарно-санитарного контроля и разработка методов дифференцированного определения вегетативных и L-форм этого возбудителя.

Для достижения цели решались следующие задачи:

1. Изучение популяции *Staphylococcus aureus* после воздействия неблагоприятных факторов (антибиотиков, температуры) микробиологическими и электронно-микроскопическими методами.

2. Разработка ускоренной методики индикации и идентификации вегетативных и L-форм различных бактерий в объектах ветеринарно-санитарного контроля с помощью двойных мембранных фильтров и последующей ДНК-гибридизации.

3. Разработка модифицированных методик ускоренного определения *Staphylococcus aureus* в водных объектах и мясных продуктах.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований служили музейные штаммы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и *Bacillus subtilis* а также микроорганизмы выделенные из объектов ветеринарно-санитарного контроля (мясо, мясопродукты и водные объекты).

Для исследования действия негативных факторов на популяцию бактерий применяли методику с использованием мембранных фильтров. Бактериальную культуру обрабатывали антибиотиками (ампициллином, гентамицином, кефзолом и актиномицином в концентрациях от 12,5 мкг/мл до 600,0 мкг/мл) и также определяли воздействие температуры в интервале от 4 до 65°C.

Для изучения L-трансформации с последующей реверсией клеток *S. aureus* использовали антибиотики различных групп.

На твердую питательную среду помещали систему двойных мембранных ацетатцеллюлозных фильтров с различным диаметром пор (0,45 мкм, 0,22 мкм). На верхний фильтр наносили культуру *S. aureus* с различными разведениями антибиотиков в полужидком агаре и оставляли на 24 часа при температуре 37°C.

Для разработки методики на основе ДНК-гибридизации использовали искусственно контаминированные бактериями образцы. Дифференциальное разделение различных форм бактерий осуществляли фильтрацией на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах. При исследовании мяса и мясопродуктов образцы предварительно гомогенизировали, элюировали бактерии физраствором, концентрировали дифференциальным центрированием, фильтровали через сэндвич мембран с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм на специальном фильтродержателе, позволяющем проводить точечную фильтрацию. Далее отдельно каждый фильтр обрабатывали растворами лизостафина и

гуанидинтиоизоцианата, проводили щелочную денатурацию ДНК и фиксацию ее стандартно соевым раствором при высокой ионной силе. Имобилизованную на фильтрах ДНК гибридизовали с мечеными тритием или биотином ДНК-зондами.

Результаты и обсуждение

На первом этапе нами были проведены исследования по изучению популяции *Staphylococcus aureus* после воздействия неблагоприятных факторов (действие антибиотиков, изменение температуры) с использованием методов электронной микроскопии.

Известно, что воздействие неблагоприятных факторов вызывает гетероморфизм бактерий. Задачами наших исследований было установление закономерностей действия различных групп антибиотиков и температур на популяцию *Staphylococcus aureus*.

Воздействие различных антибиотиков на культуру *S. aureus* вызывало в зависимости от дозы бактериостатический или бактерицидный эффекты. Затем проводили исследование образцов препаратов из фильтров в сканирующем электронном микроскопе. Результаты исследований представлены на рисунках 1 и 2.

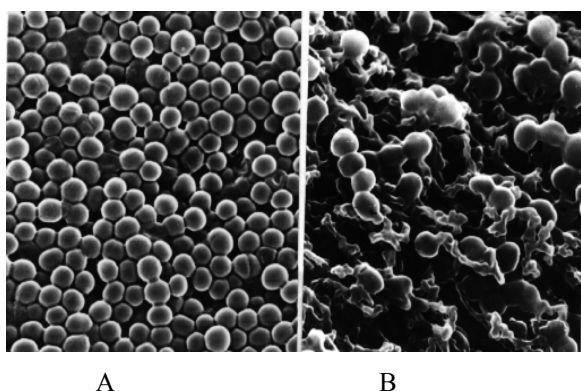


Рис. 1 - Фрагмент колонии
А - *Staphylococcus aureus* без обработки антибиотиками (контроль) (сканограмма, x10000);
В - Фрагмент колонии *Staphylococcus aureus*, обработанной антибиотиками (сканограмма, x 10000).

При исследовании культуры *S. aureus*, не подвергшейся воздействию антибиотиков (контроль), было установлено, что колонии представлены многослойными структурами, состоящими из клеток находящихся в ассоциации за счет межклеточного матрикса. При этом все клетки в популяции имели одинаковые размеры и форму, что свидетельствовало о нахождении их в S-форме.

Воздействие антибиотика на популяцию бактерий вызвало изменение морфологии клеток. Выявлены разрозненные, измененные клетки протопластного типа, свойственные грамположительной микрофлоре, а также клетки в различных стадиях L-трансформации, включая L-формы.

Бактериальные клетки после действия антибиотиков переходят в стадию гетероморфизма.

Трансформированные клетки, имеющие меньшие размеры и поврежденную клеточную стенку, проходят через поры верхнего фильтра, но удерживаются на нижнем, в результате чего происходит разделение вегетативных клеток и клеток в стадии L-трансформации.

При разведениях антибиотиков (ампициллина, гентамицина, кефзола и актиномицина) от 12,5 до 50,0 мкг/мл наблюдалась реверсия клеток на нижнем фильтре, после инкубирования на обогащенной питательной среде при температуре 37 °С через 24 часа. Были отмечены колонии по морфологическим признакам свойственные стафилококкам.

При более высоких концентрациях антибиотиков реверсия наблюдалась через 36 или 48 часов инкубирования. При концентрации кефзола от 400 до 600 мкг/мл и актиномицина от 100 до 500 мкг/мл реверсию бактерий не наблюдали.

Это зависело от механизма действия препаратов, так как ампициллин и кефзол угнетают преимущественно рост грамположительной микрофлоры, изменяя структуру клеточной стенки, гентамицин обладает широким спектром действия, нарушая синтез внутриклеточных белков, а актиномицин действует на механизм репликации ДНК в бактериальной клетке [2, 4].

Исследование верхних фильтров показало наличие клеток находящихся в стадии гетероморфизма с проявлением L-трансформации в виде L-форм.

При изучении нижних фильтров с микроколониями реверсировавших бактерий, были выявлены шаровидные клетки различного размера с морфологическими признаками, свойственные клеткам – ревертантам.

При изучении действия температурного фактора, культуру *Staphylococcus aureus*, в концентрации 10 ед. высевали на двойные мембранные ацетатцеллюлозные фильтры, помещенные на твердую питательную среду (МПА) и инкубировали в интервале температур от 40°С до 65°С в течение 24 часов.

Как показали исследования при температуре 20°С и 37°С наблюдали оптимальный рост колоний бактерий через 2°С 4 часа инкубации.

При 4°С на верхних фильтрах были зафиксированы мелкие, плоские, непигментированные колонии.

Исследование в сканирующем электронном микроскопе нижних фильтров при 4 °С показало наличие гетероморфных клеток на различных стадиях L-трансформации. При инкубировании этих фильтров на обогащенной питательной среде была выявлена реверсия клеток в исходное состояние.

При температуре 65°С рост культуры *S. aureus* не наблюдали.

Приведенные данные показали, что температура 4°С вызывает переход популяции *S. aureus* в гетероморфный рост с образованием L-

форм и возможностью реверсии клеток в исходное состояние при благоприятных условиях.

Таким образом, микробиологическими и электронно-микроскопическими исследованиями показано, что при действии различных неблагоприятных факторов на культуру *Staphylococcus aureus* часть популяции переходит в гетероморфный рост. При этом образование L-форм и степень их реверсии зависит как от вида действующего фактора, так и от его количественных характеристик.

Как было уже отмечено для практики ветеринарно-санитарного и экологического контроля большое значение имеет продолжительность определения, как вегетативных, так и L-форм микроорганизмов. Микробиологические методы анализа позволяют проводить идентификацию вегетативных клеток в течение 48 часов, а L-форм в 1,5 – 2 раза дольше. Поэтому следующим этапом наших исследований являлась разработка ускоренных способов дифференциальной диагностики бактерий на основе ДНК-гибридизации.

После отмывки неспецифической сорбции определяли радиоактивность гибридных молекул ДНК на фильтрах в жидкостном сцинтилляционном счетчике или интенсивность окрашивания точек с этими молекулами на цифровом рефлектометре, в случае использования биотиновой метки.

В таблице 1 приведены результаты гибридации меченных реперных ДНК с иммобилизованными на фильтрах ДНК микроорганизмов, которые не были обработаны антибиотиками, т.е. вегетативные формы.

Таблица 1 - Индикация микроорганизмов, выращенных на питательной среде без антибиотика и иммобилизованных на фильтрах с диаметром пор 0,45 мкм при использовании H³ ДНК

| *Радиоактивность фильтров с гибридными молекулами H ³ ДНК, имп. мин ⁻¹ | | | | | |
|--|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>S. aureus</i> | | <i>E. coli</i> | | <i>Pr. vulgaris</i> | |
| Верхний фильтр | Нижний фильтр | Верхний фильтр | Нижний фильтр | Верхний фильтр | Нижний фильтр |
| $\frac{751 \pm 23}{687}$ | $\frac{69 \pm 5}{4}$ | $\frac{842 \pm 19}{755}$ | $\frac{58 \pm 5}{0}$ | $\frac{655 \pm 24}{593}$ | $\frac{55 \pm 4}{0}$ |
| Контроль сорбции | | | | | |
| 64±5 | 65±5 | 67±4 | 64±5 | 62±3 | 58±5 |

* Числитель – реперные ДНК, гибридные с иммобилизованными на верхних фильтрах ДНК гомологичных микроорганизмов; Знаменатель - не гибридные с гетерологичными ДНК.

Как видно из представленных данных, реперные ДНК гибридируются с иммобилизованными на верхних фильтрах ДНК гомологичных микроорганизмов и не

гибридизуются с гетерологичными ДНК (степень связывания на уровне контроля сорбции). Электронно-микроскопические исследования показали, что после фильтрации на верхних фильтрах присутствуют, в основном, вегетативные формы бактерий, а на нижних L-формы.

В таблице 2 приведены данные по гибридации меченых ДНК с иммобилизованными ДНК бактерий, предварительно обработанных антибиотиком (L-формы).

Из представленных результатов видно, что меченые ДНК гибридируются только с гомологичными ДНК, иммобилизованными на фильтрах.

Таблица 2 - Индикация микроорганизмов, выращенных на питательной среде с антибиотиком (гентамицин), с использованием H³ ДНК

| *Радиоактивность фильтров с гибридными молекулами H ³ ДНК, имп.мин ⁻¹ | | | | | |
|---|---------------|----------------|---------------|---------------------|---------------|
| <i>S. aureus</i> | | <i>E. coli</i> | | <i>Pr. vulgaris</i> | |
| Верхний фильтр | Нижний фильтр | Верхний фильтр | Нижний фильтр | Верхний фильтр | Нижний фильтр |
| 118 ± 16 | 731 ± 14 | 124 ± 61 | 722 ± 660 | 104 ± 41 | 636 ± 573 |
| Контроль сорбции | | | | | |
| 63±4 | 64±3 | 63±3 | 62±4 | 63±4 | 63±4 |

* Числитель – реперные ДНК, гибридные с иммобилизованными на верхних фильтрах ДНК гомологичных микроорганизмов; Знаменатель - не гибридные с гетерологичными ДНК.

При этом в большей степени гибридизация происходит с ДНК, иммобилизованными на нижних фильтрах (диаметр пор 0,22 мкм), где согласно электронно-микроскопическим данным выявляются клетки бактерий на разных стадиях L-трансформации. Аналогичные данные были получены при использовании ДНК-зондов меченых биотином [3, 5].

Предложенная модифицированная методика позволяет проводить дифференциальное определение вегетативных клеток и бактерий на различных стадиях L-трансформации с использованием ДНК-гибридации на мембранных фильтрах.

Для определения вегетативных и L-форм бактерий из различных объектов ветеринарно-санитарного контроля, бактерии предварительно элюировали физиологическим раствором (для твердых объектов), жидкие объекты (вода) непосредственно фильтровали через сэндвич мембран, как описано выше. Дальнейшую идентификацию бактерий осуществляли с помощью меченой ДНК [6, 7, 8, 9, 10].

Результаты проведенных исследований (табл. 3) показали возможность дифференциального

определения различных форм бактерий в исследуемых объектах.

Таблица 3 - Дифференциальное определение бактерий в объектах ветеринарно-санитарного контроля методом ДНК-гибридизации

| Объект исследования | | Размер пор фильтров, в мкм | Эффективность гибридации с Н ³ ДНК, в имп. мин -1 |
|--|---|----------------------------|--|
| Вода дистиллированная контаминированная <i>S. aureus</i> | без обработки антибиотиками | 0,45 | 2268±26 |
| | | 0,22 | 275±6 |
| | после обработки антибиотиком гентамицином | 0,45 | 379±9 |
| | | 0,22 | 2354±25 |
| Вода речная контаминированная: | <i>E. coli</i> | 0,45 | 121±9 |
| | | 0,22 | 63±4 |
| | <i>Pr. vulgaris</i> | 0,45 | 232±11 |
| | | 0,22 | 42±2 |
| | <i>Bac. subtilis</i> | 0,45 | 942±15 |
| | | 0,22 | 45±3 |
| Колбаса вареная контаминированная <i>S. aureus</i> | без обработки антибиотиком | 0,45 | 2124±31 |
| | | 0,22 | 358±8 |
| | после тепловой обработки (40 °С) | 0,45 | 233±7 |
| | | 0,22 | 1347±29 |

Полученные данные коррелировали с результатами бактериологических исследований и данными электронной микроскопии. При этом время индикации и идентификации различных форм микроорганизмов с помощью разработанных методик было в 2 - 3 раза меньше по сравнению с бактериологическим анализом.

Проведенные исследования показали корреляцию данных по методу ДНК-гибридизации с микробиологическим определением стафилококка.

При этом время индикации и идентификации *Staphylococcus aureus* с использованием высокоспецифичных генных зондов составляло 6 - 8 часов, что на порядок меньше классического бактериологического анализа.

Выводы

Микробиологическими и электронно-микроскопическими исследованиями показано, что при действии различных неблагоприятных факторов на культуру *Staphylococcus aureus* часть популяции переходит в гетероморфный рост. При этом

образование L-форм и степень их реверсии зависят как от вида действующего фактора, так и от его количественных характеристик.

На основе дифференциации бактерий с помощью двойных мембранных фильтров и последующей ДНК-гибридации разработана ускоренная методика индикации и идентификации вегетативных и L-форм различных бактерий в объектах ветеринарно-санитарного контроля, позволяющая в 2 - 3 раза сократить время анализа по сравнению с общепринятым микробиологическим методом.

Разработаны модифицированные методики ускоренного определения *Staphylococcus aureus* в водных объектах и мясных продуктах в течение 6 - 8 часов с чувствительностью 10³-10⁴ клеток в пробе без предварительного обогащения, и с чувствительностью до единичных клеток с предварительным подрачиванием.

Литература

1. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Ковалёв Ю.Н., Аляпкина Ю.С., Чегаева Е.В. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. № 6. с. 3-8. (1999).
2. Кудряшова А.А., Преснякова О. Хлебопекарное производство. № 5. С. 53-57. (2006).
3. Павлова И.Б. Закономерности развития популяций бактерий в окружающей среде (электронно-микроскопическое исследование)// Диссертация в виде научного доклада. М. (1999).
4. Светличкин В.В. Автор. дисс. на соискания ученой степени д-ра биол. наук. М. (2002).
5. Haase A., Brahic M., Blum H. Meth. Virol. Vol. Orlando c. a. p.189-226. (1984).
6. Jremstein M., Hognes D. Proc. Nail. Acad. Sci. USA. p. 3961-3965. (1975).
7. Неминуца Л.А., Скотникова Т.А., Титова Е.И., Провоторова О.В., Еремец Н.К., Бобровская И.В., Канарская З.А. Вестник Казан. технол. ун-та. Т. 15. № 4. с. 69 – 74. (2012).
8. И.В. Павленко, А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец, И.В. Бобровская, А.А. Нежута, А.В. Канарский, Канарская З.А. Вестник Казан. технол. ун-та. Т. 16. № 8 (3). с. 226-232. (2013).
9. И.В. Павленко, А.Я. Самуйленко, А.А. Раевский, В.И. Еремец, А.А. Нежута, А.В. Канарский, Канарская З.А. Вестник Казан. технол. ун-та. Т. 16. № 8 (3). с. 220-226. (2013).
10. Самуйленко А.Я., Раевский А.А., Павленко И.В., Еремец Н.К., Бобровская И.В., Канарский А.В., Канарская З.А. Вестник Казан. технол. ун-та. Т. 16. № 9. с. 165-171. (2013).

© Е. А. Денисова – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела технического регулирования, стандартизации и сертификации, ГНУ ВНИИВСГЭ, ospvnii@mail.ru; В. В. Светличкин – док. биол. наук, проф., зав. отделом технического регулирования, стандартизации и сертификации, ГНУ ВНИИВСГЭ, ospvnii@mail.ru; З. А. Канарская – канд. тех наук, доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru.

© Е. А. Denisova - Ph. D., senior fellow for technical regulation, standardization and certification State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and poultry (GNU VNIIVSGE), ospvnii@mail.ru; V. V. Svetlichkin - Sc. D., professor, head of department of technical regulation, standardization and certification GNU VNIIVSGE, ospvnii@mail.ru; Z. A. Kanarskaya – Ph.D, Associate Professor, Department of Food Biotechnology, KNRTU, zosya_kanarskaya@mail.ru.