

Л.М. Михайлов, А.И. Калиновский, Н.Л. Баранникова

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БРУЦЕЛЛ НА ЭТАПАХ L-ТРАНСФОРМАЦИИ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
Роспотребнадзора (Иркутск)

Изучены культурально-морфологические свойства бруцелл в процессе L-трансформации на плотных питательных средах с нарастающей концентрацией антибиотика и представлена визуализация особенностей морфологии клеток различных пассажей при световой микроскопии с фазово-контрастным устройством. Показаны отличия культурально-морфологических свойств L- от S-форм бруцелл.

Ключевые слова: S- и L-формы бруцелл

CULTURAL-MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF BRUCELLA AT THE STAGES OF L-TRANSFORMATION

L.M. Mikhailov, A.I. Kalinovskiy, N.L. Barannikova

Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Cultural-morphological properties of Brucella are studied during L-transformation on solid nutrient media with increasing antibiotic concentration and visualization of morphology features of cells with various passages is presented by light phase-contrast microscopy. Differences of cultural-morphological properties of Brucella L- and S-forms are shown.

Key words: Brucella S- and L-forms

ВВЕДЕНИЕ

Способность бактерий к существованию в условиях частичного или полного отсутствия клеточной стенки — широко распространенное явление [2]. В настоящее время процесс L-трансформации бактерий рассматривается как один из приспособительных механизмов, способствующих их сохранению [3]. Отличительной особенностью бруцелл в L-форме является выраженный полиморфизм клеток, индуцированных *in vitro* или *in vivo*, одни авторы выделяют 15 [4], другие — 7 фенотипов L-форм бруцелл [8]. До настоящего времени при идентификации бруцелл в L-форме большое значение придается их культурально-морфологическим свойствам [2, 6]. По данным литературы, наряду с описанием морфологических признаков бруцелл в L-форме недостаточно материала по визуализации этих признаков, поэтому получение новых данных актуально.

Цель работы — культурально-морфологическая характеристика бруцелл на этапах L-трансформации на искусственных питательных средах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 18 штаммов бруцелл: *Brucella melitensis* 342 (S, R), 201, 203 (S, R); *B. abortus* И-206, 82 (вакцинный), 292 (S, R); *B. suis* И-103 (S, R), *Thomsen* (S, R); *B. rangiferi* 283 (S, R); *B. ovis* И-65; *B. canis* 6/66 (S, R). L-трансформацию проводили на четырех питательных средах для культивирования L-форм бруцелл, приготовленных на основах: эритроцит агара, печеночного настоя, переваров селезенки и сердечной мышцы крупного рогатого скота, с постепенным увеличением

концентрации бициллина-3 от 10 до 13000 ЕД/мл питательной среды. Мазки готовили из культур L-трансформантов бруцелл на различных стадиях L-трансформации и просматривали с использованием светового микроскопа с фазово-контрастным устройством «Liaka» при 400 кратном увеличении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенностью процесса L-трансформации является замедление роста культур бруцелл на питательных средах (8–18 суток) по сравнению с исходными культурами (2–3 суток). Рост бруцелл, особенно на первых пассажах, скудный, в виде голубовато-сероватого впадающего и прозрачного янтарно-желтого цвета проходящего света налета, плохо снимающегося петлей. Отдельные колонии различаются по размеру от мелких (меньше 0,5 мм) до крупных (5 мм в диаметре), отмечаются колонии с более темным центром и светлыми краями (в виде яичницы). При получении L-трансформантов из 18 штаммов наиболее глубокий процесс перехода в L-форму зарегистрирован у бруцелл наиболее эпидемиологически значимых видов *Melitensis* и *Abortus*, где максимальное число пассажей достигало 14, тогда как у остальных оно не превышало восьми. При этом рост на питательной среде на основе перевара сердечной мышцы наблюдали также только у представителей бруцелл видов *Melitensis* — 5 штаммов и *Abortus* — 1 штамм.

Рост бруцелл других видов не наблюдался дальше пятого пассажа. L-субкультуры бруцелл образуют мелкие колонии, округлой формы с

ровным краем, вросшие в агар, в проходящем свете янтарно-желтые, голубоватые в падающем свете или в виде скудного, нежного голубовато-серого налета. При снятии петлей колонии трудно снимаются, имеют крошковатую консистенцию. Бруцеллы в L-форме грамотрицательны, спор и капсул не образуют.

Отличительной особенностью бруцелл в L-форме является выраженный полиморфизм клеток, при этом морфология клеток всех 18 штаммов бруцелл меняется в зависимости от концентрации трансформирующего агента в питательных средах. При фазово-контрастной микроскопии бруцеллы, выросшие на питательных средах с концентрацией бициллина-3, составляющей 10 ЕД/мл (1-й пассаж), имели обычный вид — мелкие кокко-бактерии, не отличающиеся от исходных форм (рис. 1). При концентрации антибиотика — 50 ЕД/мл (2-й пассаж) в мазках, наряду с обычными клетками, наблюдалось слипание клеток с формированием глыбок и появлением резко увеличенных, «раздутых» клеток неправильной формы (рис. 2). В мазках третьего пассажа (концентрация бициллина-3 — 500 ЕД/мл) наблюдали небольшое содержание клеток с обычной морфологией, при этом основное поле зрения занимали клетки неправильной формы в виде прямых и изогнутых палочек различной величины (рис. 3). При концентрации бициллина-3 1000 ЕД/мл (4-й пассаж) в питательной среде в дополнение к имеющимся формам появились клетки округлой формы в виде цепочек (рис. 4). Бруцеллы с пятого по восьмой пассаж представлены преобладающим наличием сферических и палочковидных клеток, в которых оптически более плотные участки выглядели в виде полуколец или колец с просветлением в центре (рис. 5, 6, 7). L-трансформанты 9 — 14-го пассажей характеризовались преобладанием клеток протопластического типа: овальные или кругло-овальные, оптически плотные или с просветлением в центре (рис. 8). В отдельных случаях в мазках наблюдались клетки нитевидной (рис. 9) и веретенообразной формы (рис. 10).

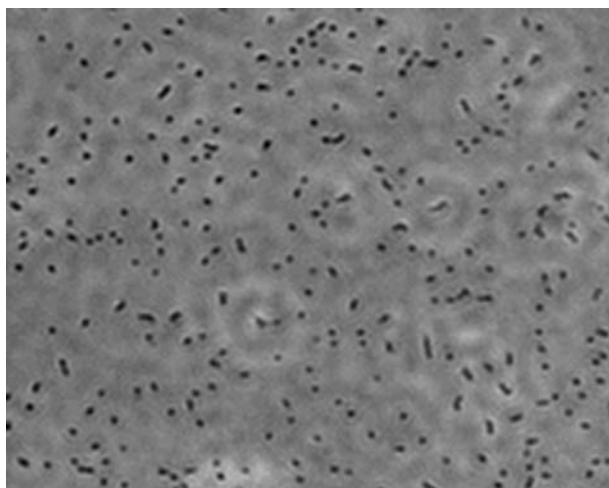


Рис. 1. Исходная форма бруцелл.

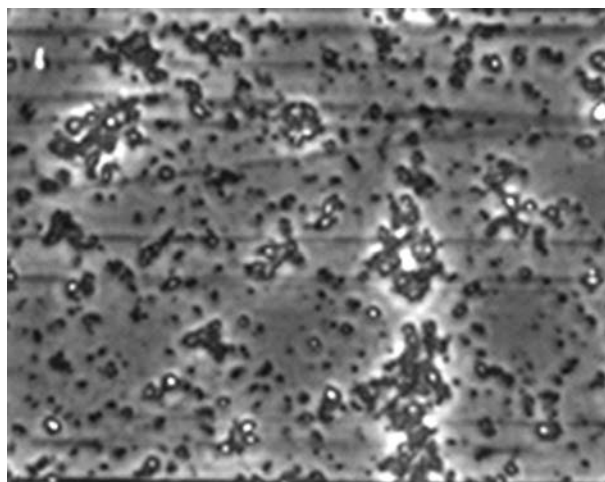


Рис. 2. Второй пассаж (бициллин-3, 50 ЕД/мл питательной среды).

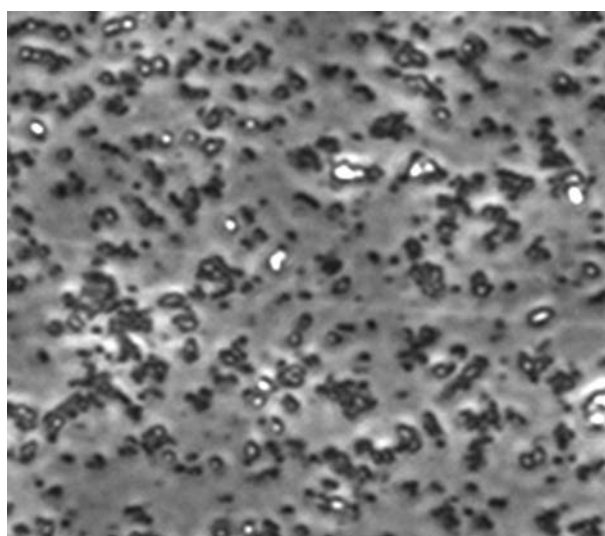


Рис. 3. Третий пассаж (бициллин-3, 500 ЕД/мл питательной среды).

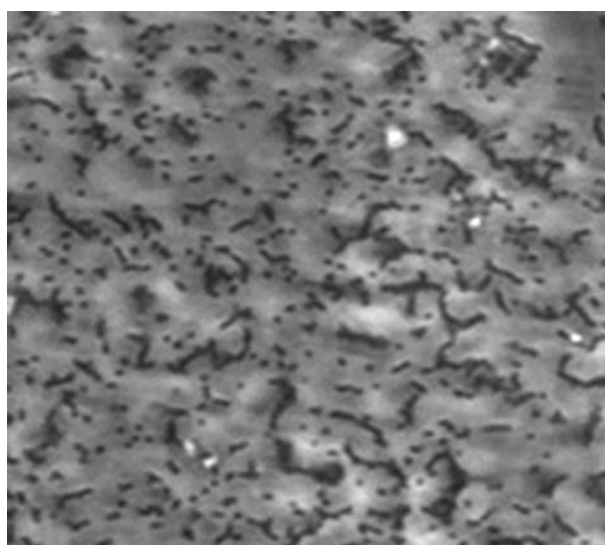


Рис. 4. *B. abortus* И-206 (бициллин-3, 1000 ЕД/мл питательной среды).

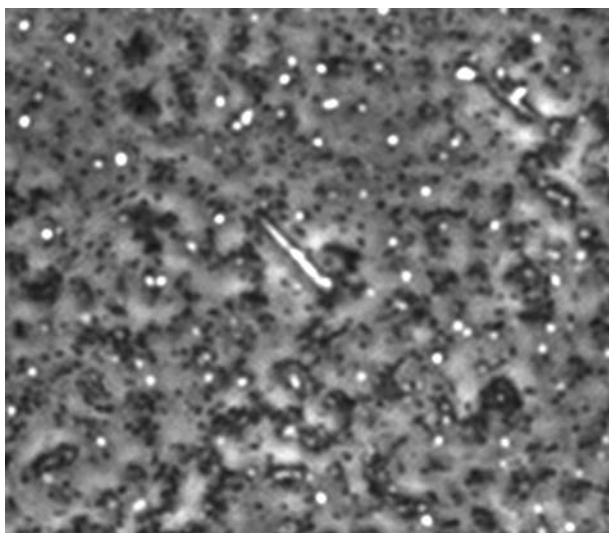


Рис. 5. *B. abortus* И-206 (бициллин-3, 2000 ЕД/мл питательной среды).

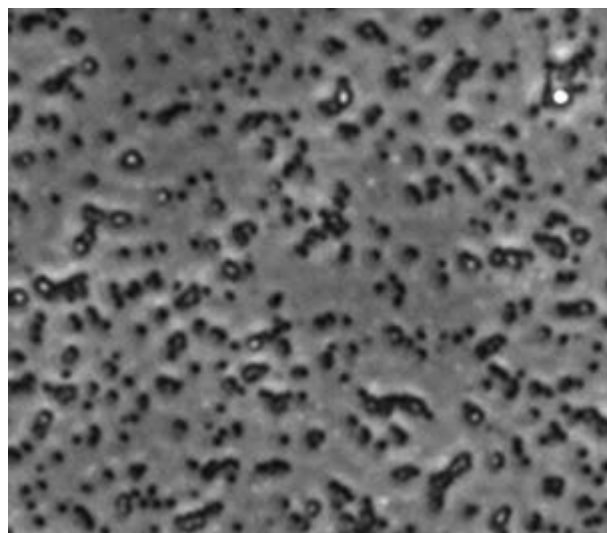


Рис. 8. *B. abortus* И-206 (бициллин-3, 8000–14000 ЕД/мл питательной среды, формирование протопластов).

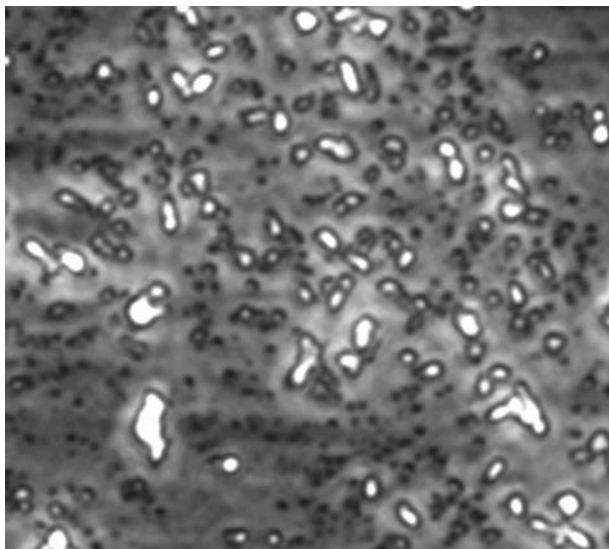


Рис. 6. *B. abortus* И-206 (бициллин-3, 3000 ЕД/мл питательной среды).

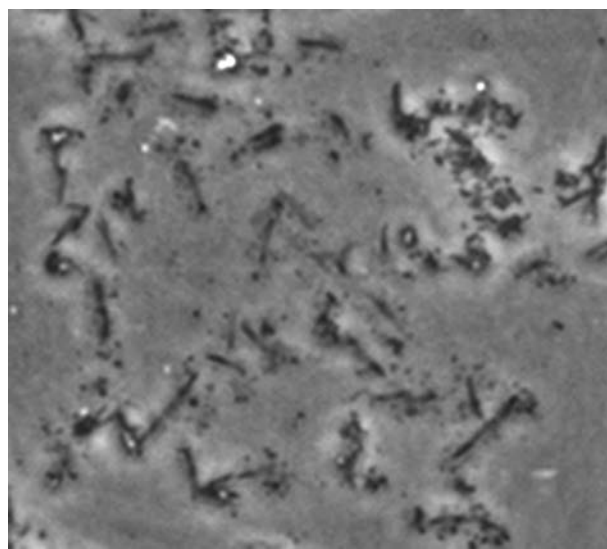


Рис. 9. Нитевидные формы L-трансформантов.

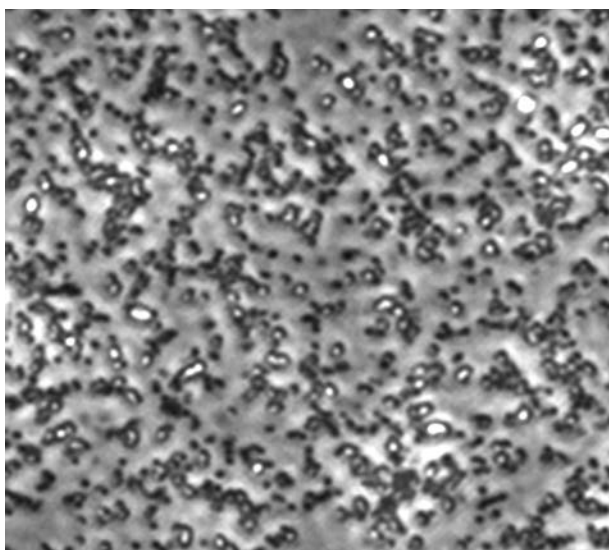


Рис. 7. *B. abortus* И-206 (бициллин-3, 5000–7000 ЕД/мл питательной среды).

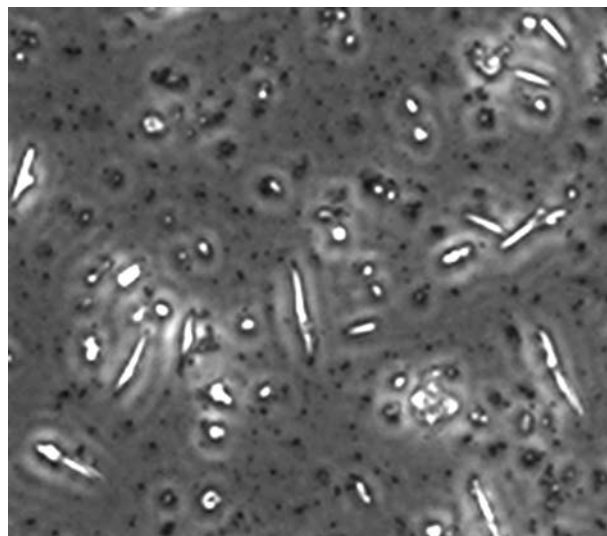


Рис. 10. Веретенообразные формы L-трансформантов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что культурально-морфологические свойства L-трансформантов отличаются от S-форм бруцелл увеличением времени роста на плотных питательных средах и формированием более мелких колоний иногда с плотным центром, что согласуется с результатами других авторов [1, 8]. С использованием фазовоконтрастного микрофотографирования представлены и визуализированы особенности морфологии бруцелл при L-трансформации с различными концентрациями антибиотика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко Л.Н. Фенотипическая изменчивость бруцелл в процессе L-трансформации *in vitro* // Вест. Алтайского гос. аграрного университета. — 2011. — № 8. — С. 71–73.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней / Практическое руководство; под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. — М.: Медицина, Шико. — 2009. — 470 с.

Сведения об авторах

Михайлов Леонид Михайлович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (6664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Калиновский Александр Иннокентьевич – доктор медицинских наук, заведующий отделом зоонозных инфекций, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Баранникова Наталья Леонидовна – врач-бактериолог отдела зоонозных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

3. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Н.М. Романова, Г.И. Эль-Регистан — М.: Медицина, 2005. — 367 с.

4. Морфо- и сероварианты L-форм *B. abortus* начального этапа трансформации и их биологические свойства / В.Г. Ощепков, Л.Н. Гордиенко, А.Ю. Шварева, Д.В. Будыгин // Акт. пробл. бруцеллеза и туберкулеза животных: сб. науч. тр. СО ВНИИБТЖ РАСХН. — Омск, 2000. — С. 257–270.

5. Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий. — М.: Медицина, 1981. — 239 с.

6. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных: Методические указания МУ, 3.1.7.1189-03. — М., 2003. — 38 с.

7. Толмачева Т.А., Кац Л.Н., Грекова Н.А. Структура клетки и патогенность бруцелл на разных этапах L-трансформации // Ж. микробиол. — 1979. — № 8. — С. 63–67.

8. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. — Л.: Колос, 1976. — 279 с.