

**ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ПАТОГЕННЫХ ЛИСТЕРИЙ В ОБЪЕКТАХ  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКАНИРУЮЩЕЙ  
ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ****И.Б. ПАВЛОВА, Д.А. БАННИКОВА, А.Б. КОНОНЕНКО**

В отношении ряда инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными и условно-патогенными бактериями, происходит постепенный пересмотр места возбудителя в различных экосистемах, актуальными остаются вопросы распространения, адаптации, способности их жизненных форм к развитию в популяциях в среде обитания. Известно, что листерии устойчивы к внешним факторам, при этом существенно участились случаи передачи листериоза с растительными продуктами. Однако данные об экологических аспектах существования возбудителя листериоза ограничены. Одно из перспективных направлений в изучении экологии патогенных бактерий — популяционный подход, основанный на исследовании колоний бактерий, а не отдельной клетки. В статье приведены данные экспериментальных исследований, проведенных с применением метода сканирующей электронной микроскопии, позволяющим анализировать колонии бактерий без нарушения их естественной архитектоники. Выполнено сравнение морфологических особенностей популяций листерий в широком диапазоне температур (от  $-18$  до  $37$  °C) в различных объектах среды обитания, таких как молочные и мясные продукты, корма, вода, зеленые растения. Морфологическая пластичность клеток листерий и особенности существования популяций листерий в окружающей среде продемонстрированы на приведенных сканограммах. Показано, что листерии адаптируются к меняющимся условиям существования, приобретая способность переходить к гетероморфизму с различными проявлениями L-трансформации, что обеспечивает им длительную персистенцию в окружающей среде. Полученные данные позволили выявить основные закономерности адаптационных механизмов выживаемости у этих бактерий. К таким механизмам, в частности, относится гетероморфизм с различными проявлениями L-трансформации; способность к формированию микроколоний и колоний по типу многоклеточного организма; целостность популяции в процессе развития за счет внутрипопуляционных связей; способность популяции реагировать на воздействие среды обитания.

**Ключевые слова:** патогенные бактерии, популяции листерий, гетероморфизм, L-трансформация, окружающая среда, сапрофитизм, сканирующая электронная микроскопия.

Накопление данных о сапрофитическом существовании патогенных микроорганизмов привело к пересмотру места возбудителей ряда инфекционных заболеваний в различных экосистемах (1–4). В последнее десятилетие специалисты по пищевым токсикоинфекциям все больше внимания уделяют возбудителю листериоза, случаи передачи которого с растительными продуктами существенно участились.

Несмотря на значительное число публикаций по эпизоотологии, эпидемиологии, молекулярной биологии патогена, фармакологии, иммунологии, генетике и клиническим особенностям заболевания, экология возбудителя листериоза изучена мало (1, 5, 6). В то же время известно, что листерии достаточно устойчивы к неблагоприятным факторам, могут расти при низких значениях рН, высокой концентрации NaCl, проявляют свойства микроаэрофилов и психрофилов. Как типичные представители сапронозов листерии способны размножаться в почве, перемещаться с грунтовыми водами и подниматься в слои с вегетирующими побегами однолетних растений, в том числе кормовых.

Впервые вопрос о существовании природных резервуаров возбудителей инфекций во внешней среде поднял В.И. Терских (4). В настоящее время признается, что изучать фундаментальные и прикладные аспекты этой проблемы необходимо с широких биологических позиций на основе популяционно-экологических подходов (7, 8). Адаптация патогенов сопровождается гетероморфизмом и изменением физиологии клеток, способствующим уменьшению энергии роста (в частности, снижением фермента-

тивной активности в отношении ряда субстратов) (9), что часто осложняет идентификацию изолятов.

При изучении жизненных форм листерий в разных средах мы использовали 48-часовую культуру *Listeria innocua* (10) в S-форме с типичными культурально-биохимическими свойствам. Взаимодействие листерий с растениями исследовали по авторской методике моделирования проникновения листерий через корневую систему в вегетативные органы с применением метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и оценкой динамики выживаемости бактерий (10). СЭМ проводили на электронном микроскопе Hitachi-800 со сканирующей приставкой Hitachi-8010 (Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и инструментальном увеличении  $\times 1-10$  тыс. (10). Пищевые продукты в стерильных емкостях контаминировали взвесью листерий ( $5 \times 10^8$  КОЕ/мл) и оставляли при комнатной температуре на 3 ч, затем помещали в разные температурные условия (18-22 °С на 3 сут, 4 °С на 3 сут, -8 и -18 °С на 10 сут), после чего отбирали пробы для бактериологического анализа и СЭМ.

О морфологической пластичности листерий (рис. 1) свидетельствовало наличие овоидных клеток (типичны для S-колоний), в разных условиях превращающихся в палочковидные, в клетки протопластного типа, нитевидные, мелкие округлые (L-формы), извитые формы, что присуще бактериям на стадиях L-трансформации. Широкая экологическая толерантность, сопровождающаяся изменением морфологических особенностей популяций, затрудняет первичную индикацию и идентификацию листерий в объектах ветеринарно-санитарного надзора.

При пониженных температурах, угнетающих большинство мезофильных патогенов, листерии не встречаются конкуренции и могут активно размножаться (11). По данным В.С. Зуева с соавт. (12), при температуре 4-6 °С у сальмонелл в воде наблюдается L-трансформация (12). Мы отмечали (рис. 2, А), что листерии в воде в колониях и микроколониях сохраняли типичную палочковидную форму и были объединены межклеточным матриксом, формирующим покровы, что свидетельствовало о наличии полноценной клеточной стенки. Отрицательные температуры (от -8 до -18 °С) не влияли на морфологию и жизнеспособность популяций листерий (13, 14). Они поддерживали жизнеспособность при низких положительных и даже отрицательных температурах, существуя в колониях и микроколониях с поверхностной биопленкой (см. рис. 2, Б, В), образованной внеклеточными продуктами, аналогичными компонентам клеточной стенки, синтезируемым и секретиремым полноценной бактерией (15). Известно, что у энтеропатогенных бактерий основу биопленки составляют адгезины белковой и полисахаридной природы (16). Стратегия выживания популяций листерий в голодной среде (водопроводная вода) при разных температурах основана на гетероморфизме с различными проявлениями L-трансформации, что расширяет возможности поддержания их численности и циркуляции в межэпидемиологические периоды (13).

Свойство листерий не только выживать, но и размножаться при пониженных температурах обусловлено адаптационными механизмами, присущими психрофилам. В первую очередь, это так называемая гомеовязкостная адаптация — изменение состава жирных кислот в липидах мембран в соответствии с температурой окружающей среды. При понижении температуры содержание ненасыщенных жирных кислот повышается, чем предотвращается замерзание липидов и избыточная жесткость мембран. К другим подобным факторам относится способность компенсировать малую эффективность рибосом при низких температурах их дополни-

тельным образованием, что проявляется в увеличении содержания РНК. Кроме того, адаптация психрофилов связана с конформационными изменениями белков под действием термолабильных ферментов (17-19).

Все чаще регистрируют вспышки листериоза при употреблении в пищу мясных и молочных продуктов (6, 20, 21). Мы показали, что после контаминации листериями их колониеобразующая активность при 4 °С за 7 сут в стерилизованном молоке увеличивалась на четыре порядка, в кисломолочных продуктах — на три, в сырах — на два (22). Следовательно, наличие даже небольшого числа листерий способно привести к бурному развитию популяции до опасного для здоровья количества. В условиях пониженных температур было установлено, что, как и в водной среде, одна часть популяции существует в колониях и микроколониях с межклеточным матриксом, формирующим покровы (био пленки), другая — находится на разных стадиях гетероморфизма, что свидетельствует о фенотипической гетерогенности популяций (рис. 3, А, Б, В).

Изучение морфологии и особенностей развития листерий в стеблях кормового овса сорта Улов (10) позволило констатировать, что эти микроорганизмы из почвы через корневую систему проникают внутрь вегетативных органов. Так, в гомогенате корней число листерий было выше, чем в гомогенате листовых пластинок. Внутри листовых пластинок на всех сроках наблюдения был выявлен гетероморфизм листерий с дефектной клеточной стенкой (рис. 4, А). Из морфологических вариантов отмечали бактерии с измененной формой, нарушенным механизмом деления, с потерей способности к адгезии и колонизации, что, как известно, ведет к утрате патогенных свойств, образование клеток протопластного типа. При благоприятных условиях гетероморфные клетки реверсировали в исходную форму с сохранением морфологических и физиологических свойств (10). Стратегия выживания популяций листерий в растении определяется комплексом его механизмов защиты, действие которых вызывает разрушение клеточной стенки, что приводит к различным проявлениям L-трансформации и образованию нестабильных L-форм, способных к реверсии в исходное состояние. Этот процесс расширяет возможности возбудителя поддерживать численность и накапливаться в зеленых кормах (23).

Контаминации кормов листериями также способствует адгезия и колонизация твердых частиц кормов (24). С использованием СЭМ было показано, что при пониженных температурах и повышенной влажности в течение 24 ч клетки прикреплялись к поверхности дробленого зерна с последующим формированием микроколоний и колоний (см. рис. 4, Б), то есть происходило активное размножение листерий. При повышении температуры адгезия и колонизация замедлялись вследствие психрофильности этих бактерий.

Таким образом, популяции листерий в разных объектах (вода, зеленые растения, зерно, продукты питания) в диапазоне температур от –18 до +37 °С адаптируются к меняющимся условиям, проявляя гетероморфизм с различными элементами L-трансформации, что обеспечивает длительную персистенцию. L-трансформация существенно затрудняет индикацию листерий, так как нередко видимого роста при культивировании таких бактерий на питательных средах не наблюдается.

Собственные исследования и анализ данных литературы позволили нам назвать основные адаптационные механизмы, обеспечивающие сохранение жизнеспособности у листерий. Это фенотипическая гетерогенность (гетероморфизм с различными проявлениями L-трансформации); возможность формировать микроколонии и колонии по типу многоклеточного

организма; целостность популяции за счет внутрипопуляционных связей, отсутствующих у единичных клеток, и ее способность реагировать на воздействие среды обитания (9).

Из-за способности нестабильных L-форм инициировать новые колонии посредством реверсии в исходную форму В.Д. Тимаков и Г.Я. Коган назвали процесс L-трансформации «транзитной системой» (25). Такой адаптационный механизм, проявляющийся изменением биохимических и морфологических свойств в популяциях, способствует выживанию вида бактерий и создает опасность возникновения инфекционного очага (9).

Итак, с применением неинвазивной сканирующей электронной микроскопии изучен гетероморфизм, воздействие абиотических и биотических факторов среды на популяцию, способность к реверсии, процессы адгезии и колонизации и пр. у листерий, что дало объективную информацию об их популяциях в среде обитания и расширило представление о структурно-функциональных особенностях патогенных организмов в целом. В широком смысле это позволяет по-новому подойти ко многим практическим проблемам воздействия на возбудителей как в среде обитания, так и в макроорганизме, в том числе обосновать подбор новых дезинфицирующих средств и лекарственных препаратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Литвин В.Ю. Патогенные бактерии в природных экосистемах. Екатеринбург, 1997.
2. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С., Костенков Н.М. Влияние свойств почв на сохранение и размножение листерий и иерсиний. Почвоведение, 2006, 2: 237-243.
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М., 2002.
4. Терских В.И. Сапронозы (о болезнях людей и животных, вызываемых микробами, способными размножаться вне организма во внешней среде, являющейся для них местом обитания). Журнал микробиологии, 1958, 8: 118-122.
5. Бакулов И.А., Васильев Д.А., Колбасов Д.В., Кольпикова Т.И., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю. Листерии и листериоз. Ульяновск, 2008.
6. Родина Л.В., Маненкова Г.М., Тимошков В.В. и др. Состояние заболеваемости и эпизоотическая ситуация по листериозу в Москве. Дезинфекционное дело, 2002, 4: 12-13.
7. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток, 2004.
8. Swift S., Throup J., Yucroft V. Quorum sensing: bacterial cell-cell signaling from bioluminescence to pathogenicity. In: Molecular microbiology /S. Busby, C. Thomas, N. Brown (eds.). Springer-Verlag, Berlin, 1998: 85-208.
9. Павлова И.Б., Ленченко Е.М., Банникова Д.А. Морфология популяций патогенных бактерий. М., 2007.
10. Власов А.А., Павлова И.Б. Выживаемость и морфология листерий в тканях растений кормового овса. Сельскохозяйственная биология, 2009, 4: 89-92.
11. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Микробиологическая характеристика *Listeria monocytogenes*, изолированных из различных источников в Приморском крае. ЖМЭИ, 2006, 3: 3-6.
12. Зуев В.С., Павлова И.Б. Выживание популяций *S. typhimurium* в воде (сканирующая электронная микроскопия). ЖМЭИ, 2004, 5: 33-36.
13. Банникова Д.А., Павлова И.Б., Кононенко А.Б., Бритова С.В., Болотский М.Н. Морфология популяций листерий при различных условиях культивирования (СЭМ). I сообщение. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, 2009, 2: 50-59.
14. Павлова И.Б., Банникова Д.А. Морфология популяций листерий в мясных продуктах при низкотемпературных режимах хранения (СЭМ). II сообщение. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, 2009, 2: 60-66.
15. Павлова И.Б. Существование и развитие популяций патогенных бактерий в окружающей среде. В сб.: Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (науч. тр. ВНИИВСГЭ). М., 2005, т. 117: 361-378.
16. Ботвинко И.В. Экзополисахариды бактерий. Успехи микробиологии, 1985, 20: 79-122.
17. Бузолева Л.С., Бурцева Т.И., Сомов Г.П. Влияние температуры культивирова-

- ния на содержание нуклеиновых кислот у бактерий *Listeria monocytogenes* и *Jersinia pseudotuberculosis*. ЖМЭИ, 2000, 6: 22-25.
18. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. Л., 1989.
  19. Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. М., 1984: 81-83.
  20. Ефимочкина Н.Р., Карликанова С.Н. Выделение *L. monocytogenes* из молока и молочных продуктов. Молочная промышленность, 2004, 5: 36-38.
  21. Семенихина В.Ф., Гуськова Л.Д., Рожкова И.В. Влияние молочнокислых бактерий на развитие листерий при совместном культивировании в молоке. В сб.: Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ-75 лет). М., 2004.
  22. Банникова Д.А., Павлова И.Б., Власов А.А. Выживаемость и морфология популяций листерий в молочных продуктах (СЭМ). III сообщение. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, 2010, 3: 81-88.
  23. Крючкова Л.А., Маковейчук Т.И., Яворская В.К., Курчий Б.А. Содержание салициловой кислоты в листьях проростков озимой пшеницы различной устойчивости к фитопатогенам. Физиология и биохимия культурных растений, 2006, 38(1): 24-31.
  24. Павлова И.Б., Ленченко Е.М. Электронно-микроскопическое исследование адгезивности бактерий. Микробиология, 2002, 2: 3-6.
  25. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. L-формы бактерий и семейство *Mycoplasmataceae* в патологии. М., 1973.

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии,  
123022 Россия, г. Москва, Звенигородское ш., 5,  
e-mail: sanmicrobio@mail.ru

Поступила в редакцию  
20 марта 2013 года

## EXPERIMENTAL STUDY OF POPULATIONS OF PATHOGENIC *Listeria* IN ENVIRONMENT USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

*I.B. Pavlova, D.A. Bannikova, A.B. Kononenko*

All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology, Russian Academy of Agricultural Sciences, 5, Zvenigorodskoe sh., Moscow, 123022 Russia, e-mail sanmicrobio@mail.ru  
Received March 20, 2013

doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.30eng

### Abstract

Due to accumulated data, the ideas on existence and the state of pathogenic and opportunistic bacteria in different ecosystems gradually change, while distribution, adaptation, growth and development of bacterial forms in populations in different media and objects remain relevant. *Listeria* are known to be resistant to external factors, and the frequency of their transmission through plant production increases significantly. At that, the data concerning ecological aspects of living cycle of the pathogen are still limited. Ecology of the bacteria is one of the substantial sections of biology concerning development, survival and interactions of the microorganisms population and the environment. One of the perspective trends in studying ecology of the pathogenic bacteria is approach on population level being based on a study of bacterial colonies, and not a separate cell. The date of the experiments are presented in the paper being carried out with using scanning electron microscopy method resulting in ability to study bacterial colonier without violation of their natural architectonics. The morphological features of *Listeria* populations in the different objects of inhabitation medium, e.g. milk and meat products, feeds, water, green plants, in a broad temperature rang (from -18 up to 37 °C) were examined. Morphological plasticity of *Listeria* cells and the peculiarities of *Listeria* populatios existence in the environment were demonstrated on the presental scanogramms. It was shown that *Listeria* adapted to the changing conditions of existence acquiring the ability to transform into heteromorphism with the different manifestations of L-transformation resulting in their prolonged persistence in the environment. The obtained data allowed to reveal the main conformities of the survival rate of those bacteria. Specifically, heteromorphism concerns such mechanism with the different manifestations of L-transformation, as well as the ability to form the microcolonies and colonies by a type of multicellular organism, integrity of a population during a process owing to the interpopulations bonds, ability of a population to react onto influence of inhabitation medium. The data etended our ideas on the structure and functions of pathogenic organism. In a broad sense, it allows to revise a lot of practical problems concerning control of pathogens both in environment and in macroorganism, including recommendations on desinfectants, medicines, therapy and prophylaxy.

Keywords: pathogenic bacteria, *Listeria* populatios, heteromorphism, L-transformation, environment, saprophytism, scanning electron microscopy.