

МОРФОЛОГИЯ И СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ НАНО- И МИКРОМИРА

Пономарев А.П., Белик Е.В., Шилиев Р.Р., Гарасько Е.В.

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава

Кафедра микробиологии и вирусологии

РЕЗЮМЕ В крови животных и в различных биоматериалах методом электронной микроскопии наряду с известными микроорганизмами выявлен новый тип, обозначенный как нанобактерии. Полученные нами данные по их морфологии, размерам, повышенной устойчивости к воздействию физико-химических факторов, по способности к росту и размножению на искусственных питательных средах соответствуют известным в литературе сведениям о нанобактериях.

Ключевые слова: электронная микроскопия, вирионы, бактерии, нанобактерии, устойчивость, размножение, кровь.

За последнее столетие описано 4 000 различных вирусов и около 5 000 видов бактерий, разделенных на 20 типов [5]. Данное количество бактерий совершенно незначительно в сравнении с грибами, которых насчитывают порядка 120 000 [6]. Можно ожидать увеличения числа типов прокариот в 2-5 раз, так как в естественных местах обитания бактерии существуют преимущественно в виде некультивируемых форм, симбионтов, биопленок и проявляют сложное социальное поведение.

Подтверждением вышесказанному являются сообщения в мировой литературе об открытии нового типа микроорганизмов — нанобактерий, или самовоспроизводящихся наночастиц. Найденные в природе бактерии нанометровых размеров (1 нм = 10⁻⁶мм) исследователи описывали как экзотику, подчеркивая её специфичность терминами «ультрамикробактерии», «наночастицы», «нанобактерии», «наноформы», «нанобы», «живые везикулы» [3].

До последних лет к самым мелким прокариотам в соответствии с классификацией бактерий по Берджи относили микоплазмы. Честь открытия

живых микроорганизмов, по размерам значительно меньших, чем микоплазмы, принадлежит геологам. Американский исследователь Р. Фольк в сернистых источниках выявил микроорганизмы размером 50—500 нм, которые по всем научным канонам не должны быть живыми. Однако вопреки всему они существуют, активно размножаясь в горячих сернистых источниках, в разлагающихся листьях, облаках, воде, раковинах моллюсков, скорлупе яиц, в организме человека и животных: волосах, фекалиях, крови, камнях желчного пузыря, в зубном налете [14, 15].

Дальнейшее развитие данного направления исследований подтвердило наличие нанобактерий не только в природных геологических образцах, но и в биологических материалах. Нанобактерии были выявлены в эмбриональных сыворотках телят, крови млекопитающих и целом ряде других объектов биологического происхождения. Финский исследователь О. Кайяндер [17] выявил цитотоксическое повреждение фибробластов и В-лимфоцитов при внесении культуры нанобактерий. При внутривенной инокуляции кроликам нанобактерии аккумулируются

Ponomaryov A.P., Belik E.V., Shilyaev R.R., Garasko E.V.

MORPHOLOGY AND CHARACTERISTICS OF SOME MICROORGANISMS FROM NANO- AND MICROWORLD

ABSTRACT A new species of microorganisms defined as nanobacteria along with the known species was revealed in animal blood and in different biomaterials by electronic microscopy. The obtained data in their morphology, size, increased resistance to physicochemical factors, ability to grow and propagate on artificial nutrient media corresponded to the known information on nanobacteria.

Key words: electronic microscopy, virions, bacteria, nanobacteria, resistance, propagation, blood.

в почках [16]. Уникальность этой формы жизни заключается в исключительно малых размерах клеток, сопоставимых с размером мельчайших вирусов, что вызвало совершенно справедливую критику существования живых микроорганизмов подобной величины.

Скептики и критики указывали на то, что нанобактерии слишком малы, и в них физически не смогут разместиться молекулы и структуры, без которых никакой обмен веществ, никакое размножение невозможно. Молекулярные механизмы, способные обеспечить жизненные функции, нуждаются в пространстве определенного объёма, и диаметр такой сферы, согласно всем расчетам, никак не может быть меньше 150 нм. Поэтому многие ученые оценили открытие биологов во главе с О. Кайяндером не как размножение неких загадочных бактерий, а самый обычный рост минеральных кристаллов.

Но как бы там ни было, в том, что эти частицы существуют, уже никто не сомневается. Все дискуссии ведутся лишь вокруг вопроса, что же они собой представляют. Уже тот факт, что они способны размножаться, позволяет считать их некой формой жизни. Но оппоненты правы — это действительно не бактерии в привычном понимании этого слова.

В связи с активным обсуждением перспектив нанотехнологий следует отметить, что данное направление в нашей стране пока находится на начальной стадии развития и предполагает манипуляцию частицами, размеры которых находятся в нанометровом диапазоне (10—500 нм). Основываясь на общепринятых обобщениях, следует отметить, что бактерии и различные клетки с размерами от 10^{-6} до 10^{-3} мм относятся к микромиру, а молекулы белков, вирусные частицы, нуклеиновые кислоты и нанобактерии с размерами от 10^{-9} до 10^{-6} мм — к нанобиомиру.

Один из важнейших аспектов в области биологической нанотехнологии — это познание и моделирование принципов построения живой материи, структура которой основана на самоорганизации. Обширной областью применения нанотехнологий является медицина — это лекарственные составы, содержащие включения в виде микрокапсул и микросфер, измерение и обнаружение составляющих элементов в жидкостных средах организма. При этом область нанобиотехнологии, как часть нанотехнологии, относящаяся к решению медицинских проблем, определяется термином «наномедицина», что говорит о некотором упорядочении структуры исследований [7, 10].

В настоящей статье представлены результаты электронно-микроскопических исследований некоторых представителей нано- и микромира, выявляемых в различных биоматериалах, в том числе и в крови млекопитающих.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалами для исследований служили суспензии, содержащие вирусы животных, культуральные жидкости, получаемые при репродукции различных перевиваемых культур клеток, суспензии, приготовленные из фрагментов органов от павших и вынужденно убитых животных, сыворотки крови, а также образцы крови млекопитающих.

Биоматериалы в виде жидких образцов использовали для подготовки препаратов для электронной микроскопии по следующей методике: предварительно кровь и сыворотки крови разводили в буферном растворе в соотношении 1:10. Разведенные образцы замораживали и хранили до момента использования. После оттаивания проводили первое центрифугирование при 3 000 об/мин в течение 10 минут на настольной центрифуге ОПн-8УХЛ4.2. Затем из каждой пробирки отбирали надосадочную жидкость и переносили в стерильные пробирки для повторного центрифугирования, а осадки отбрасывали. Осветленные жидкости центрифугировали при 7 000 об/мин в течение 30 минут. После этого надосадочные жидкости удаляли, а к полученным осадкам добавляли 30—50 мкл буферного раствора pH 7,4, ресуспендировали активным перемешиванием и использовали при подготовке препаратов для электронной микроскопии.

Препараты для электронной микроскопии готовили методом негативного контрастирования по общепринятой методике с использованием 4% раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты pH 6,8. Исследования проводили на электронном микроскопе JEM-100B (Япония) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты электронной микроскопии позволили провести оценку контаминации биоматериалов, в том числе крови человека и животных, что иллюстрировано микрофотографиями. Рисунок 1а представляет собой электронную микрофотографию граммотрицательной бактерии типа *Haemophilus parasuis* с признаками деления клеток путем образования перетяжки. Поверхность клеток палочковидной формы имеет губчатое строение, что позволяет существенно увеличить отношение поверхности к объёму и, как следствие, способствует более активному обмену веществ с окружающей средой.

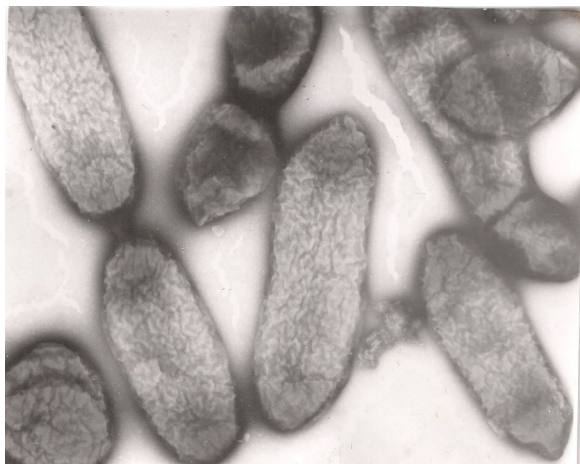


Рис. 1 а. Губкообразное строение поверхности клеток бактерий *Haemophilus*. $\times 26\ 000$

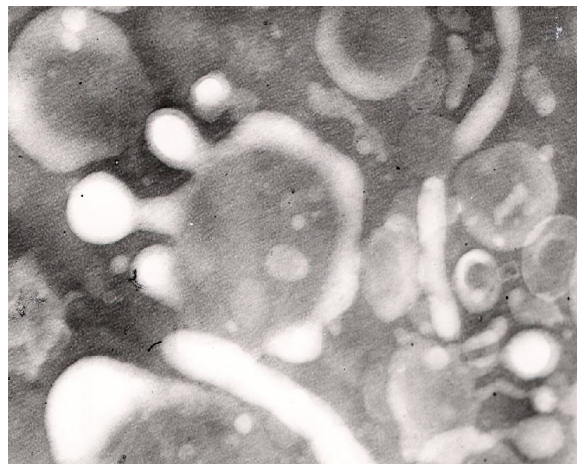


Рис. 1 б. Клетка микоплазмы диаметром 500 нм, на поверхности которой видны отпочковывающиеся элементарные тельца диаметром 80-100 нм. $\times 60\ 000$

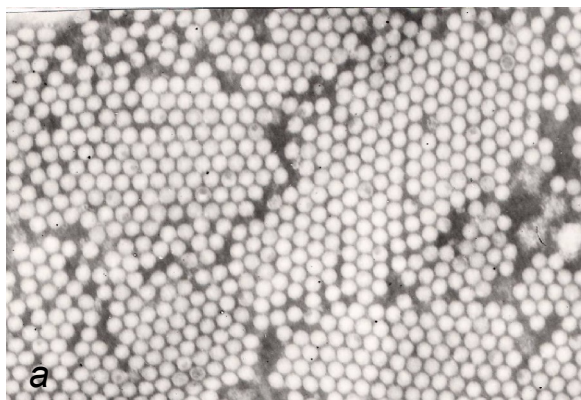


Рис. 2. Негативно контрастированные вирионы вируса ящура (а) и вируса оспы голубей (б), из очищенных и концентрированных вирусосодержащих суспензий. $\times 90\ 000$

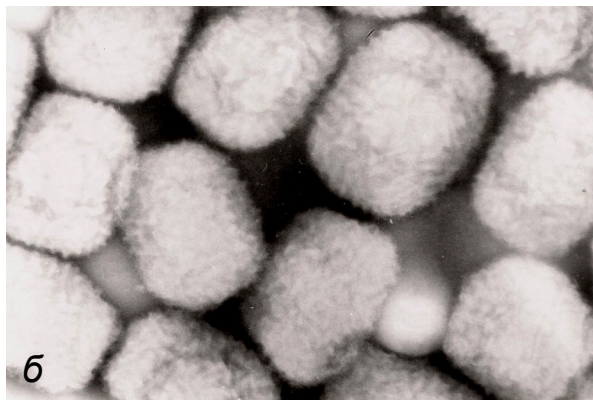


Рисунок 1б является электронно-микроскопическим изображением клеток микоплазм с выраженными признаками бесполого размножения путем почкования. При подготовке препаратов для электронной микроскопии была использована суспензия, полученная путем измельчения и суспендирования в буферном растворе фрагментов плода от абортной свиньи. Методом полимеразной цепной реакции была подтверждена принадлежность выявленных микроорганизмов к семейству микоплазм (идентификация выполнена канд. биол. наук А.В. Щербачевым). Микоплазмы, как и другие грамотрицательные прокариоты, размножаются бинарным делением и почкованием. Отмечаются трудности их культивирования на искусственных питательных средах. Они растут на средах с обязательным добавлением сыворотки крови (лошадей, свиней, крупного рогатого скота или кроликов). Отсутствие клеточной стенки у микоплазм определяет их пластичность и, как след-

ствие, полиморфность строения клеток. Сферическая форма характерна для большинства видов микоплазм. При этом клетки одной и той же микоплазмы могут иметь как форму сферы (иногда несколько вытянутой) 300—800 нм в диаметре, так и нитевидных ветвящихся тяжей, которые, проходя фазу кокковидных структур, распадаются на ряд сферических клеток [2, 9]. Эти клетки самых мелких прокариот — микоплазм (минимальные размеры — 150—200 нм) имеют выраженные признаки живого организма и наиболее близко расположены к вирусам — представителям наномира.

Электронная микрофотография демонстрирует размер вирионов представителя семейства *Picornaviridae* — вируса ящура от 22 до 30 нм (рис. 2, а) в сравнении с наиболее крупными вирионами семейства *Poxviridae* — вируса оспы, размеры которых 220—450 нм (длина) на 140—260 нм (ширина) на 140—260 нм (толщина) (рис. 2, б).

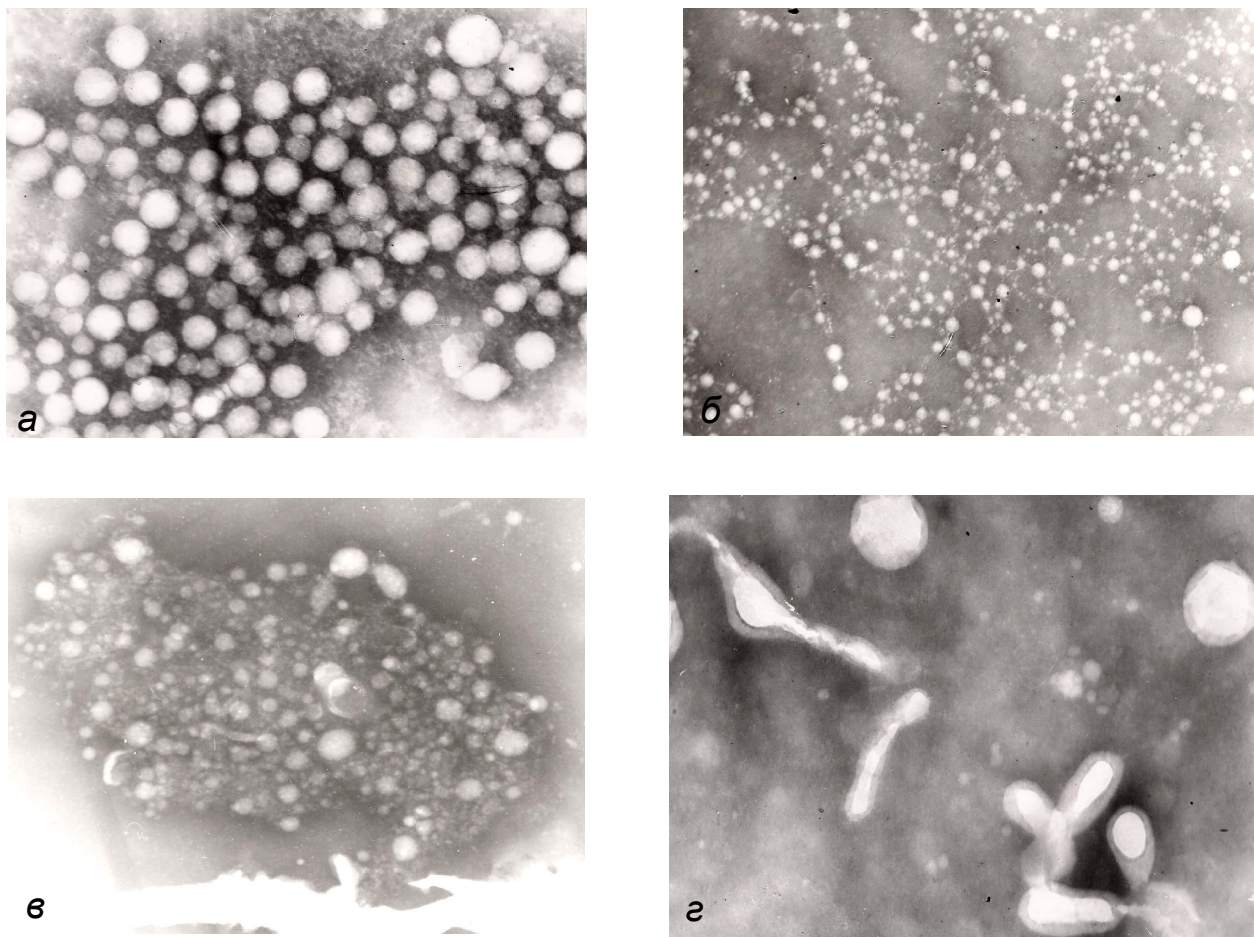


Рис. 3. Морфология структур нанометрового размера, выявляемых в культуральных жидкостях и сыворотках крови крупного рогатого скота. $\times 56\,000$ — а, б, в; $\times 70\,000$ — г.

В процессе исследований культуральных ростовых сред, полученных при культивировании перевиваемых культур клеток с добавлением сыворотки крови крупного рогатого скота и используемых в дальнейшем для репродукции вирусов животных, были выявлены структуры сферической формы диаметром от 10 до 500 нм. Данные структуры, в соответствии с общепринятыми представлениями, относили к так называемым вирусоподобным частицам и считали за досадную помеху.

Взаимное расположение данных структур на поверхности пленки-подложки может быть представлено или в виде крупных колоний (рис. 3а), или в виде цепочечных образований из мельчайших наносфер диаметром от 10 до 50 нм (рис. 3б), или в виде биопленок (рис. 3в). Кроме того, наряду со сферическими формами диаметром от 20 до 100 нм отмечено присутствие структур нитевидной и палочковидной форм, вытянутых эллипсоидов, в структуре которых просматривалась негативно окрашенная сердцевина, окруженная оболочкой (рис. 3г).

Логическим продолжением исследований послужили опыты по электронно-микроскопическому контролю образцов крови и сывороток крови лабораторных животных — кроликов, а также крови крупного рогатого скота. Результаты опытов показали, что в крови клинически здоровых животных возможно обнаружить присутствие в различных концентрациях структур сферической, нитевидной, гантелевидной и других форм. Кроме того, в образцах крови кроликов присутствовали и клетки, соответствующие по форме и размерам классическим бактериям. В сыворотках отдельных особей были выявлены палочковидные, тороидальные и сферические формы клеток (рис. 4а). Идентичные структуры с отчетливо выраженными признаками бинарного деления с образованием перетяжки обнаружены в крови двухгодовалых телят (рис. 4б).

Наряду со свободным расположением данный вид микроорганизмов выявлен также в составе частично или полностью лизированных лимфоцитов (рис. 5).

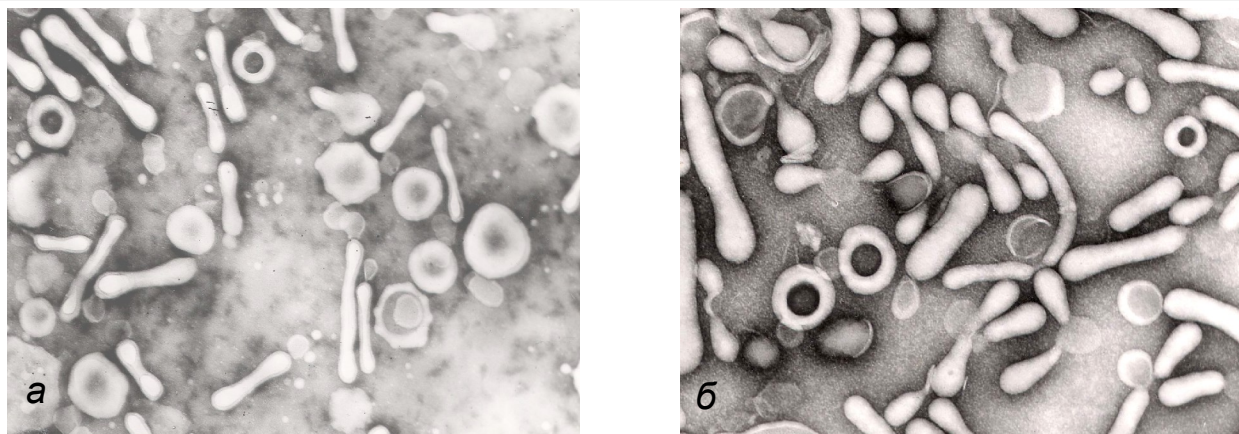


Рис. 4. Палочковидные структуры с начальной стадией образования перетяжки и концентрацией цитоплазматического вещества по полюсам из сыворотки крови кролика, а также клетки в виде дисков и торов (а). × 40 000. Палочковидные, тороидальные, делящиеся клетки с образованием дочерних клеток грушевидной формы в образце крови теленка (б). × 65 000

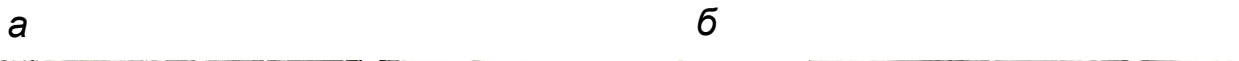


Рис. 5. Лимфоциты крови кролика, один из которых поражен нанобактериями, а второй свободен от них (а), × 17 500. Нанобактерии различных размеров и формы в вакуолях лимфоцита (б), × 38 000

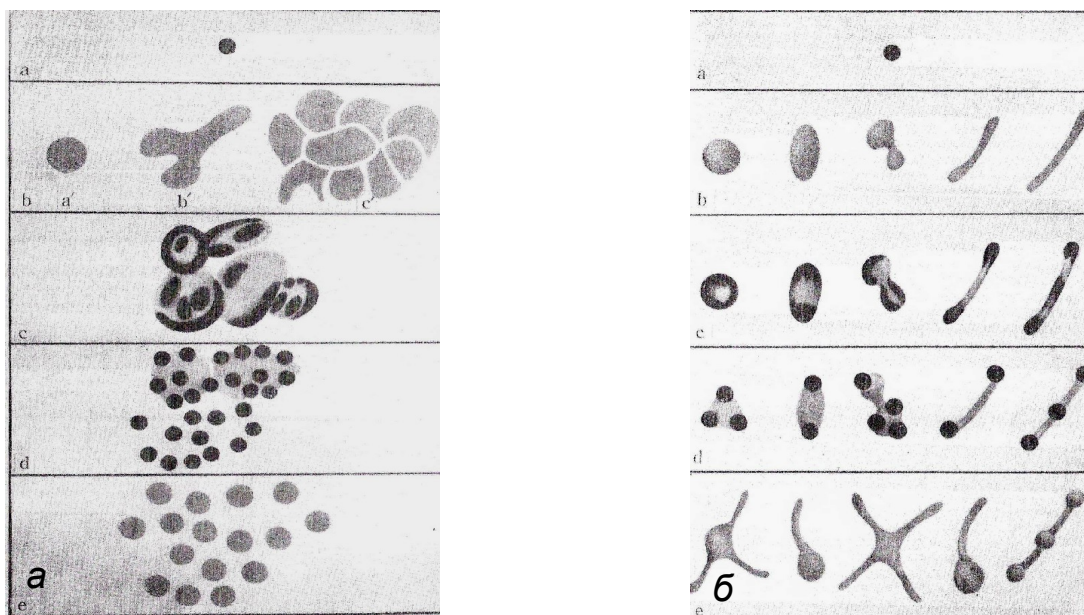


Рис. 6. Развитие микоплазм на плотной (а) и жидкой (б) питательной среде [1]

В целях морфологической идентификации выявленных структур в образцах сывороток и крови были изучены имеющиеся изображения клеток микоплазм, так как данные структуры по форме в определенной степени соответствовали описанным в литературе. Особенности развития идентичных по морфологии клеток микоплазм на плотной и жидкой питательных средах приведены в монографии В.Д. Тимакова и Г.Я. Каган [11] (рис. 6).

Из описания представленных структур следует, что сферическая частица (а) на обеих схемах представляет собой основной структурный элемент микоплазм. Колонка с обозначением b, c — дальнейшее развитие и разрастание *PPLO*-клеток. Колонки d, e — формирование цепочек из плотных гранул и репродукция гранул с образованием разнообразных по форме *PPLO*-клеток.

Сопоставление изображений клеток на электронно-микроскопических снимках, представленных на рис. 4, и схематического строения клеток микоплазм (рис. 6) удерживало нас в убежденности, что мы имеем дело с микоплазмами. В данной интерпретации они и были представлены в наших публикациях, несмотря на то что методом полимеразной цепной реакции не удалось отнести их к семейству *Mollicutes* [8].

Появление сообщений об открытии нового типа микроорганизмов — нанобактерий — заставило нас пересмотреть отношение к микроорганизмам, выявляемым в крови и органах животных. Из данных литературы известно, что наночастицы или нанобактерии, обнаруженные в крови животных, людей, культурах клеток, почве, воде, имеют сферическую или овоидную форму с диаметром от 20 до 500 нм. Кроме того, известно, что нанобактерии обладают уникальными свойствами в плане повышенной устойчивости к внешним воздействиям. Это позволяет проводить их тестирование при воздействии различных физико-химических факторов.

К одной из современных концепций выживания микроорганизмов относится феномен нанотрансформации, представляющий собой ответную реакцию микроорганизмов на стрессорные воздействия *in vitro* [3]. В наших опытах при воздействии повышенной температуры (70°C в течение 10 мин), а также органического растворителя (хлороформа) было установлено, что микроорганизмы, обнаруженные в крови животных, претерпевают морфологические изменения или трансформацию клеток. Следствием температурного воздействия является изменение морфологии клеток от палочко- и нитевидных

форм до сферических структур диаметром 80—100 нм, а вследствие воздействия хлороформа клетки трансформируются до наносфер диаметром 10—50 нм. Эти экспериментальные данные соответствуют известным литературным сведениям о трансформации клеток *Acholeplasma laidlawii* с образованием ультрамикросфер, сопровождающейся конденсацией нуклеоида с уменьшением клеточного размера и образованием так называемых «некультивируемых, но жизнеспособных форм» [12]. При переводе в бидистиллированную воду с pH 7,5 и 11,0 морфологические параметры клеток сохраняются, что характеризует их устойчивость к воздействию осмотического шока и щелочного значения pH.

Наиболее примечательным свойством выявленных микроорганизмов является их способность размножаться на искусственной питательной среде при отсутствии сыворотки крови. В наших опытах высевы проводили на среду Игла MEM в соотношении 1:250. Экспозиция при температуре +37°C в течение 1—2 месяцев сопровождалась образованием во флаконах минерального осадка, в составе которого при электронной микроскопии были выявлены наносферы в концентрации до 10^{10} наносфер/мл, по морфологии соответствующие изображению, представленному на рис. 3а, б, в.

ВЫВОДЫ

Метод электронной микроскопии позволяет проводить прижизненную оценку возможной контаминации крови человека и животных. Присутствие в крови животных чужеродных микроорганизмов вызывает дополнительную нагрузку на иммунную систему живого организма и, как следствие, способствует развитию иммунодефицитного состояния. Выявление частично или полностью лизированных нанобактериями лимфоцитов с образованием смешанных колоний указывает на их причастность к нарушению иммунного статуса крови и её микроциркуляции, что может быть причиной различных заболеваний. Кроме того, присутствие в крови клинически здоровых животных нанобактерий в различном морфологическом состоянии является фоном, на котором происходит развитие ассоциированных инфекций, вызываемых возбудителями вирусной и бактериальной природы, что затрудняет диагностику и применение адекватных методов лечения. Учитывая вышеизложенное, следует отметить актуальность выявления контаминирующих микроорганизмов в образцах крови, которая является «зеркалом» здоровья живого организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян А.А., Кац Л.Н., Павлова И.Б. Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных. — М.: Медицина, 1972. — 182 с.
2. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. — СПб.: Наука, 2002. — 319 с.
3. Вайнштейн М.Б., Кудряшова Е.Б. О нанобактериях (обзор) // Микробиология. — 2000. — № 2. — С. 163—174.
4. Волков В., Волкова Н., Смирнов Г. и др. Биоминерализация в организме человека и животных. — Томск: Тандем-Арт, 2004. — 495 с.
5. Дебабов В.Г. Жизнь бактерий за стенами лабораторий // Молекулярная биология. — 1999. — Т. 33, № 6. — С. 1074—1084.
6. Мюллер Э., Лёффлер В. Микология. — М.: Мир, 1995. — 343 с.
7. Негуляев Г.А., Ненахов Г.С. Нанотехнологии: проблемы патентования и экспертизы // Патенты и лицензии. — 2007. — № 12. — С. 18—24.
8. Пономарев А.П., Мищенко В.А. Электронная микроскопия вирусов животных и некоторых условно-патогенных микроорганизмов. — Владимир: Фолиант, 2005. — 158 с.
9. Раковская И.В. Микоплазмы человека и микоплазменные инфекции // Клиническая лабораторная диагностика. — 2005. — № 2. — С. 25—33.
10. Решетиллов А.Н., Безбородов А.М. Нанобиотехнология и биосенсорные исследования // Прикладная биохимия и микробиология. — 2008. — Т. 44, № 1. — С. 3—8.
11. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. Семейство *Mycoplasmataceae* и L-формы бактерий. — М.: Медицина, 1967. — 336 с.
12. Чернова В.М., Мухаметшина Н.Е., Гоголев Ю.В. и др. Адаптивные реакции микоплазм *in vitro*: «жизнеспособные, но некультивируемые формы» и наноклетки *Acholeplasma laidlawii* // Микробиология. — 2005. — Т. 74, № 4. — С. 498—504.
13. Akerman K.K., Kuronen I., Kajander E.O. Scanning electron microscopy of nanobacteria. Novel biofilm producing organisms in blood, // Scanning. — 1993. — Vol. 15, suppl. III. — P. 90—91.
14. Folk R.L. Bacteria and nanobacteria revealed in hardgrounds, calcite cements, native sulfur, sulfide materials, and travertines (abstract) // Geological Society of America Annual Meeting: Program Abstracts. — 1992. — P. 104.
15. Folk R.L., Lynch F.L., Rasbury E.T. Evidence for bacterial precipitation of clay minerals upon sand grains, in soils, and in the subsurface (abstract) // Geological Society of America Annual Meeting: Program Abstracts. — 1994. — Vol. 78. — P. 567—476.
16. Kajander E.O., Kuronen I., Akerman K. et al. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth // SPIE Proceedings. — 1997. — Vol. 3111. — P. 420—428.
17. Kajander E.O. Nanobacteria // Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 1998. — P. 8270—8274.

Поступила 28.08.2008 г.