

2. Гончарук Е.И., Сидоренко Г.И. Гигиеническое нормирование химических веществ в почве: руководство. – М.: Медицина, 1986. – 132 с.
3. Елисеева И.И., Юзбашев Н.Н. Общая теория статистики. – М.: Статистика, 1991.
4. Куценко С.А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание. – СПб.: ООО "Издательство Фолиант", 2004. – 720 с.
5. Методические рекомендации по обоснованию ПДК химических веществ в почве. – Изд. 2-е. – М., 1982. – Гос. № 2609-82. – 57 с.
6. Методические указания по санитарно-микробио-

логическому исследованию почвы. – М., 1977. – 47 с.

7. Шкодич П.Е., Желтобрюхов В.Ф., Клаучек В.В. Эколого-гигиенические аспекты проблемы уничтожения химического оружия. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2004. – 236 с.

8. Федеральная целевая программа Российской Федерации "Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации", утверждена Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 марта 1996 г., № 305 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 5 июля 2001 г., № 510).

УДК 616.982.27-039:576.858.9:579.25

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИД НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК САПНОГО МИКРОБА К МЕЛИОИДОЗНОМУ БАКТЕРИОФАГУ

В.А. Антонов, Л.К. Меринова, Д.В. Викторов, Н.П. Агеева, В.С. Замараев, В.И. Илюхин
Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Передача плазмид RP4 и RP1::Tn10 Rep ts в штамм *Burkholderia mallei* Ц4 приводила к появлению лекарственной резистентности, детерминируемой плазмидными генами, изменению состава общеклеточных белков и антигенного спектра трансконъюгантов, а также чувствительности микроорганизма к мелиоидозным бактериофагам и снижению вирулентности.

Ключевые слова: плазмидные гены, мелиоидоз, бактериофаг, вирулентность, лекарственная резистентность, сап.

INFLUENCE OF PLASMIDS ON GLANDERS MICROBE CELLS VIRULENCE AND SENSITIVITY TO MELIOIDOSIS BACTERIOPHAGE

V.A. Antonov, L.K. Merinova, D.V. Victorov, N.P. Ageeva, V.S. Zamaraev, V.I. Ilyukhin

Abstract. The transfer of RP4 and RP1:: Tn10 Rep ts plasmids to *Burkholderia mallei* Ц4 invoked occurrence of drug resistance determined by plasmid genes, to changes in composition of whole proteins and antigenic spectrum in transconjugants and also change of microbe sensitivity to melioidosis bacteriophages and decrease of virulence.

Key words: plasmid genes, melioidosis, bacteriophage, virulence, drug resistance, glanders.

Возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*) известны как опасные для человека и некоторых видов животных патогенные микроорганизмы, обладающие высокой степенью филогенетического родства [2]. Вместе с тем они отличаются по ряду фенотипических признаков, связанных с вирулентностью, резистентностью к антибиотикам, биохимической активностью, продукцией внеклеточных ферментов и т. д. [4].

К отличительным биологическим свойствам возбудителя мелиоидоза следует отнести также лизогению. Практически все штаммы этого микроорганизма способны продуцировать бактериофаги, эффективно размножающиеся в клетках родственного вида *B. mallei*, который используют как индикатор фагопродукции мелиоидозных культур [7].

Оба микроорганизма воспринимают в конъюгации R-плазмиды Inc P-1 группы, приобретая детерминируемую их генами резистентность к ан-

тибиотикам [1]. Известно, что влияние R-плазмид различных групп несовместимости не исчерпывается только появлением у их хозяев признаков антибиотикорезистентности, при этом могут изменяться и другие свойства микроорганизмов, в частности способность поддерживать развитие бактериофагов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияния плазмид P-1 группы несовместимости RP4 и RP1::Tn10 Rep ts на чувствительность *B. mallei* к мелиоидозным бактериофагам, вирулентность и продукцию некоторых поверхностных биополимеров.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перечень использованных штаммов и плазмид приведен в табл. 1. Для культивирования микроорганизмов использовали L-бульон, L-агар, а также среды ВН1 на основе сердечно-мозгового перевара ("Difco", США).

Мелиоидозные бактериофаги выделяли из лизогенных музейных штаммов *B. pseudomallei* в виде хлороформных лизатов [7]. Содержание фага в хлороформном лизате определяли методом агаровых слоев [Там же]. Для определения частоты спонтанной фагопродукции использовали суточные бульонные культуры *B. pseudomallei*. Число негативных колоний (стерильных пятен) подсчитывали на газоне индикаторного штамма *B. mallei* Ц4 Rif^R через 24 ч. Конъюгационные скрещивания проводили на плотных питательных средах на поверхности фильтров "Владипор 4" в условиях, установленных ранее для переноса в *B. mallei* и *B. pseudomallei* плазмиды RP4 [1].

Таблица 1

Характеристика штаммов и плазмид, использованных в работе

Штаммы	Характеристика	Источник получения
<i>B. pseudomallei</i> 139	Wt (дикий тип)	Коллекция ВолгоградНИПЧИ
<i>E. coli</i> C600 (RP1::Tn10)	Tc ^R Km ^R Ap ^R Rep ts	
<i>E. coli</i> C600 (RP4)	—	
<i>B. mallei</i> Ц4	Wt (Дикий тип)	Получены в данной работе
<i>B. mallei</i> 10230	Wt (дикий тип)	
<i>B. mallei</i> Z 12	Wt (дикий тип)	
<i>B. mallei</i> Ц4 (RP1::Tn10)	Rif ^R Tc ^R Km ^R Ap ^R Rep ts	
<i>B. mallei</i> Ц4 (RP4)	Rif ^R Tc ^R Km ^R Ap ^R	Авторская коллекция Н.П. Агеевой
<i>B. mallei</i> Ц4	Rif ^R	
<i>B. mallei</i> 10230-163 chr::Tn5	Km ^R Age8 ⁻	
<i>B. mallei</i> 10230-181 chr::Tn5	Km ^R Age8 ⁻	

Примечание. Age8⁻ –дефект по антигену 8.

Для обнаружения плазмидных ДНК применяли ускоренные методы выделения [10]. Электрофорез в агарозном геле проводили с использованием трис-боратного буфера [12].

Продукцию общеклеточных бактериальных белков анализировали методами электрофореза в 10–11 %-м полиакриламидном геле с SDS (SDS-PAGE) [13] и вестерн-блоттинга [14]. Конъюгаты специфических иммуноглобулинов с щелочной

фосфатазой ("Sigma") получали одноэтапно с использованием глутарового альдегида [11].

Вирулентность исследуемых культур *B. mallei* определяли на золотистых хомячках. Животных заражали подкожно суспензиями суточных агаровых культур. LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления размножения мелиоидозного бактериофага в качестве индикаторного был выбран штамм *B. mallei* Ц4 Rif^R, несущий мутацию устойчивости к рифампицину. Плазмиды RP4 и RP1::Tn10 Rep ts от доноров *E. coli* C600 (RP4) и *E. coli* C600 (RP1::Tn10) Rep ts передавали в реципиентный штамм *B. mallei* Ц4 Rif^R возбудителя сапа, используя для контрселекции доноров рифампицин в концентрации 500 мкг/мл.

При анализе свойств трансконогентов возбудителя сапа, содержащих в составе своего генома плазмиды RP4 и RP1::Tn10 Rep ts, было выявлено, что они отличались от исходного штамма по ряду фенотипических признаков.

Помимо приобретения устойчивости к антибиотикам (тетрациклину, канамицину, ампициллину), детерминированной плазмидными генами, у трансконогентов при культивировании при 40 °C наблюдали изменения в динамике размножения клеток и сокращения сроков выживания популяции. Кроме того, наличие плазмид в клетках *B. mallei* Ц4 отражалось на вирулентности культур, по существу, приводя к ее полной утрате (LD₅₀ трансконогентов превышала 1·10⁸ м.к. в сравнении с 1·10² м.к. родительского штамма). Одновременно трансконогенты оказались резистентными к мелиоидозному фагу, выделенному из лизогенного штамма *B. pseudomallei* 139 (табл. 2).

Существует множество причин, по которым клетка может стать устойчивой к инфекции фагом. Одна из них заключается в гидролизе фаговой ДНК эндонуклеазами рестрикции, кодируемыми плазмидами. Ограничение развития фага в клетках, содержащих плазмиды, может быть обусловлено и нарушением адсорбции фага. Повышенная частота лизогенизации приводит к снижению количества фаговых частиц, способных осуществлять литический цикл. Кроме того, на различные этапы развития фага могут оказывать влияние плазмидспецифические белки [6, 8].

Таблица 2

Влияние R-плазмид Р-1 группы несовместимости на фенотипические свойства трансконогентов *B. mallei*

Штаммы	Характеристика	Частота спонтанной фагопродукции	LD ₅₀	Чувствительность клеток к фагу <i>B.pseudomallei</i> 139
<i>B. pseudomallei</i> 139	Wt (дикий тип)	n·10 ⁻⁵	<1·10 ²	—
<i>B. mallei</i> Ц4	Wt (дикий тип)	0	<1·10 ²	+

<i>B. mallei</i> Ц4	Rif ^R	0	<1·10 ²	+
<i>B. mallei</i> Z 12	Wt (дикий тип)	0	<1·10 ²	+
<i>B. mallei</i> Ц4 (RP1::Tn10)	Rif ^R Tc ^R Km ^R Ap ^R Rep ^{ts}	0	>1·10 ⁸	-
<i>B. mallei</i> Ц4 (RP4)	Rif ^R Tc ^R Km ^R Ap ^R	0	>1·10 ⁸	-
<i>B. mallei</i> 10230-163 chr::Tn5	Km ^R Age8 ⁻	0	>1·10 ⁸	н
<i>B. mallei</i> 10230-181 chr::Tn5	Km ^R Age8 ⁻	0	>1·10 ⁸	н

Примечание. "+" – клетки чувствительны к фагу; "-" – клетки резистентны к литическому действию фага; н – не определяли.

У полученных плазмидсодержащих транс-конъюгантов, также как и у исходных штаммов возбудителя сапа, не выявлялась спонтанная фагопродукция на индикаторном штамме *B. mallei* Ц4 Rif^R, и можно предположить, что устойчивость клеток сапного микроба к мелиоидозному фагу была обусловлена не лизогенизацией клеток. Вероятно, причиной резистентности могло стать изменение поверхностных клеточных структур, выполняющих для данного фага рецепторную функцию.

Для подтверждения этого положения мы провели сравнение титров фага в надосадочной жидкости исходного индикаторного штамма *B. mallei* Ц4 Rif^R и полученных трансконъюгантов. С этой целью после смешивания фаголизата и индикаторной бульонной культуры (1·10⁸ м.к./мл) смесь выдерживали 20 мин для адсорбции фага, после чего микробные клетки осаждали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант стерилизовали фильтрованием. В супернатанте методом агаровых слоев определяли титр свободного неадсорбированного фага.

Как оказалось, снижение титра фага было выявлено только при исследовании надосадочной жидкости исходного индикаторного штамма *B. mallei*. В супернатанте, полученном из смеси фага и клеток трансконъюгантов возбудителя сапа, снижение титра фага не отмечали, что подтверждало нарушение адсорбции мелиоидозного фага на поверхности клеток *B. mallei*.

Известно, что наличие плазмид антибиотикорезистентности в клетках различных микроорганизмов повышает гидрофобность клеточной стенки, изменяет чувствительность к хелатирующим соединениям, а также приводит к изменению поверхностных структур и состава липосахаридов [9].

При анализе белковых и антигенных спектров исследуемых штаммов были обнаружены различия между плазмидсодержащими и исходными вариантами *B. mallei* в высокомолекулярной области белкового спектра (рис. 1). Антигенный спектр сапных штаммов, несущих плазмиды, также претерпевал определенные изменения, которые заключались в увеличении уровня продукции полисахаридсодержащих антигенов с молекулярными массами 60-120 кДа (рис. 2).

В работе D. Woods et al. [15] показано, что штаммы *B. mallei*, дефектные по синтезу капсулярных полисахаридов, были чувствительны к бактериофагу фЕ125, выделенному из *B. thailandensis*, и следовательно, данные структурные компоненты клеточной стенки не являлись рецепторами для этого фага. В то же время штаммы сапного микроба, у которых отсутствовал ЛПС О-антиген, или он синтезировался в измененной форме, становились не чувствительными к бактериофагу, что позволило авторам считать ЛПС О-антиген рецептором для фага фЕ125 [15].

В то же время штаммы сапного микроба, у которых отсутствовал ЛПС О-антиген, или он синтезировался в измененной форме, становились не чувствительными к бактериофагу, что позволило авторам считать ЛПС О-антиген рецептором для фага фЕ125 [15].

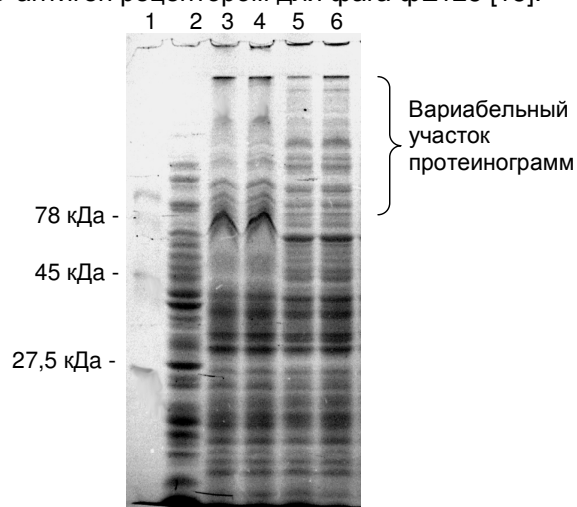


Рис. 1. Электрофореграмма общеклеточных белков штаммов *B. mallei*: 1 – Маркеры молекулярных весов; 2 – *E. coli* C600; 3 – *B. mallei* Ц-4; 4 – *B. mallei* Ц-4 Rif^R; 5 – *B. mallei* Ц-4 Rif^R (RP4); 6 – *B. mallei* Ц-4 Rif^R (RP1::Tn10) Rep^{ts}

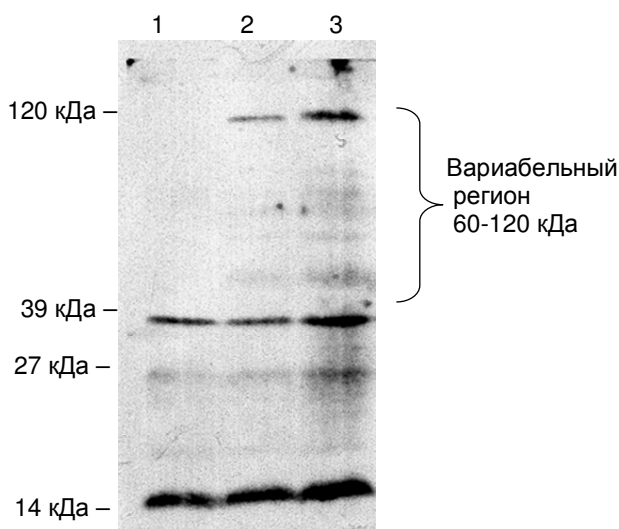


Рис. 2. Иммуноблоттинг клеточных белков штаммов возбудителя сапа: 1 – *B. mallei* Ц-4 Rif^R; 2 – *B. mallei* Ц-4 Rif^R (RP4); 3 – *B. mallei* Ц-4 Rif^R (RP1::Tn10) Rep^{ts}

Можно предположить, что появление резистентности к мелиоидозному бактериофагу у полученных нами трансконъюгантов *B. mallei* обусловлено изменением рецепторного аппарата клеток сапного микроба.

Изменение вирулентности, отмеченное нами у возбудителя сапа в связи с приобретением плазмид Р-1 группы, вероятнее всего, также определяется структурными изменениями поверхностных биополимеров микроорганизма. Собственно влияние на вирулентные свойства *B. mallei* конъюгативных репликонов показано в работе В.В. Веревкина с соавт. [5], установивших, что вирулентность трансконъюгантов зависела от полноценности Tra-оперона плазмид: плазмиды с дефектом в Tra-генах не оказывали влияния на вирулентность культур.

При анализе полученных ранее авирулентных прототрофных вариантов *B. mallei* 10230 chr::Tn5 (10230-163 и 10230-181) со вставкой в хромосому транспозона Tn5, у которых в реакции преципитации не выявлялся антиген 8, и наблюдалось изменение спектра общеклеточных белков, было также выявлено появление резистентности к бактериофагам *B. pseudo-mallei*. В частности, они утрачивали чувствительность к двум из 12 фагов, способных размножиться на исходном штамме *B. mallei* 10230.

Изучение спектра общеклеточных белков мутанта *B. mallei* 10230-163 обнаружило у него существенные отличия от исходного дикого штамма, заключавшиеся в отсутствии двух высокомолекулярных фракций (150 и 130 кДа) и протеинов с молекулярными массами 35, 39 и 40 кДа, имевшихся у штамма дикого типа (рис. 3).

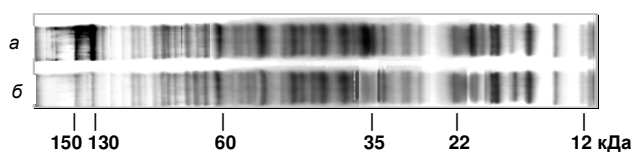


Рис. 3. Электрофорез общеклеточных белков в 10 %-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия: а – *B. mallei* 10230; б – *B. mallei* 10230-163

По данным дифференциального окрашивания протеинограмм и иммуноблоттинга с моноспецифической сывороткой к антигену 8, эти высокомолекулярные фракции представляли собой гликопротеиды, несущие антигенные детерминанты. Протеинограммы сравниваемых штаммов характеризовались значительной вариабельностью, что свидетельствовало о различном уровне экспрессии отдельных протеинов, в целом пониженном для *B. mallei* 10230-163 по сравнению с диким типом.

Изменение чувствительности обоих авирулентных штаммов *B. mallei* к мелиоидозным бактериофагам также свидетельствовало о модификации поверхностных структур клеточной стенки, являющихся рецепторами для фагов *B. pseudo-mallei*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, R-плазмиды P-1 группы несовместимости RP4 и RP1::Tn10 Rep ts опосредуют при передаче в штамм *B. mallei* Ц4 Rif^R, помимо появления лекарственной резистентности, детерминируемой плазмидными генами, также изменение чувствительности микроорганизма к мелиоидозным бактериофагам и снижение вирулентности. Трансконъюганты *B. mallei* Ц4, несущие указанные плазмиды, отличались от исходного штамма дикого типа продукцией протеинов, выявляемых в высокомолекулярной области белкового спектра, что указывает на наличие в этой области поверхностных биополимеров как фаговых рецепторов, так и детерминантов вирулентности возбудителя сапа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеева Н.П., Меринова Л.К. // Микробиол. журн. – 1986. – № 5. – С. 3–6.
2. Антонов В.А., Илюхин В.И. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 2005. – № 2. – С. 3–9.
3. Ашмарин А.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л., 1962.
4. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонозы. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
5. Вережкин В.В., Воложанцев Н.В., Мякина В.П. и др. // Вест. рос. мед. наук. – 1997. – № 6. – С. 37–40.
6. Горельшев А.С., Кульба А.М., Цыганков Ю.Д. и др. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 1985. – № 9. – С. 3–6.
7. Гришкина Т.А., Меринова Л.К. // Микробиол. журн. – 1993. – № 4. – С. 43–47.
8. Дидык О.А. // Микробиол. журн. – 1991. – Т. 53, № 8. – С. 97–103.
9. Домарадский И.В. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 1985. – № 12. – С. 3–11.
10. Замараев В.С., Антонов В.А., Илюхин В.И. и др. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 1998. – № 4. – С. 28–33.
11. Кэтти Д. Антитела 2. Методы. – М.: Мир. – 1991. – 250 с.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
13. Laemmli U. // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – № 76. – P. 4350–4354.
15. Woods D.E., Jeddloh J.A., Fritz D.L., et al. // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184, № 14. – P. 4003–4017.