

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

Е.В. Король, Л.К. Меринова, Н.Г. Плеханова, О.А. Меринова, Е.В. Шубникова, Т.В. Сенина

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Проведен пассаж культуры возбудителя мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, в клетках *Tetrahymena pyriformis*. Установлена способность микроорганизма к выживанию и размножению в простейших. После пассажа в тетрахименах отмечено увеличение продукции внеклеточных ферментов, подвижности и снижение вирулентности культур.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, пассирование, фенотипические свойства.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-2(66)-44-46

ALTERATION OF PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* DURING INTERACTION WITH *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

E.V. Korol, L.K. Merinova, N.G. Plekhanova, O.A. Merinova, E.V. Shubnikova, T.V. Senina

FPPI «Volgograd Research Anti-Plague Institute» of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare

Passaging of *Burkholderia pseudomallei* cultures has been carried out in *Tetrahymena pyriformis* cells. It has been adjusted, that microorganism multiplies in protozoa. Passaging leads to increasing of production of extracellular enzymes, motility and decreasing of virulence of microorganism.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, passaging, phenotypic characteristics.

Возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei* – сапрофитный микроорганизм, обитающий в почве и воде эндемичных регионов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии, южного Китая [2]. Некоторые исследователи предполагают, что выживание его во внешней среде может быть связано со способностью персистировать в биотических объектах, таких как *Acanthamoeba* spp., в ассоциации с которыми внутриклеточно локализованные буркхольдерии оказываются более защищенными от экстремальных воздействий среды [4].

На примере ряда патогенных микроорганизмов показано, что в клетках простейших, амёб или тетрахимен, интернированные микроорганизмы в процессе адаптационной изменчивости приобретают повышенную резистентность к факторам окружающей среды и частично утрачивают свойства, необходимые для выживания в микроорганизме [1, 3].

Природная способность возбудителя мелиоидоза к существованию как в сапрофитической, так и паразитической фазах является свидетельством высокого потенциала адаптационных возможностей, что находит подтверждение в структуре его генома [8]. Однако характер и механизмы изменчивости *B. pseudomallei* во внешней среде, в том числе, обусловленные взаимодействием с простейшими, мало изучены.

В настоящей работе, используя приемы, описанные для других микроорганизмов, мы осуществили совместное культивирование *B. pseudomallei* с цилиарной инфузорией *Tetrahymena pyriformis*, убиквитарным обитателем водных экосистем, и исследовали в процессе их взаимодействия некоторые известные фенотипические свойства микроорганизма.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить свойства буркхольдерий после пассажа в клетках *T. pyriformis* и выявить возможные отличия от фенотипа культур, выделенных от экспериментальных животных.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Были использованы дикий штамм *B. pseudomallei* 110, вирулентный для мышей линии BALB/c ($LD_{50} 1 \times 10^3$ м. к.), а также пуринзависимый аукоотрофный авирулентный мутант VPA ($LD_{50} > 1 \times 10^9$ м. к.). Аксеническая культура *T. pyriformis* получена из Института Цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Тетрахимены выращивали в Luria-Bertani (LB) бульоне (HiMedia) при температуре 28 °C.

Буркхольдерии, выращенные на агаре LB при 32 °C 24 ч, суспендировали в стерилизованной автоклавируемой речной воде и соединяли с тетрахименами в соотношении 100:1 (1×10^6 м. к./мл бактерий и 1×10^4 кл/мл тетрахимен) в LB бульоне.

Сокультуры микроорганизма и тетрахимен инкубировали в климатической камере («Sanyo», Япония) при температуре 28 °C на протяжении срока наблюдения (до 10 суток).

Для определения динамики размножения культур *B. pseudomallei*, ассоциированных с *T. pyriformis*, из сокультур ежедневно производили высев на плотную питательную среду LB agar для подсчета выросших колоний.

Наличие внутриклеточной локализации микроорганизма в простейших определяли, используя метод, предложенный в работе Inglietal [5].

Для осуществления пассажа *B. pseudomallei* в клетках тетрахимен образцы сокультур отбирали

спустя трое суток от начала совместного культивирования; материал осаждали центрифугированием при 8000 об./мин, 10 мин, отмывали в свежей среде LB и соединяли с проверенной на асептичность культурой тетрахимен.

Активность внеклеточных ферментов определяли на плотных питательных средах, содержащих необходимые субстраты: 1%-й раствор «Skim milk» («HiMedia», США), лецитин (100 мг на 100 мл среды), гемолизированную кровь (5%-ю) при определении протеазной, лецитиназной, генолитической активности соответственно. Подвижность тестировали на среде Motility («HiMedia», США) с добавлением 1%-го ТТХ (трифенилтетразолия хлорида).

Вирулентность буркхольдерий определяли на мышах линии BALB/c при внутрибрюшинном заражении 24 ч культурами *B. pseudomallei* в дозах 1×10^3 – 1×10^4 м.к. и оценивали ее по динамике гибели животных в группах.

При статистической обработке полученных данных применяли методы определения средних величин и доверительных границ к ним ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что взаимодействие различных патогенных микроорганизмов с *T. pyriformis*, сопровождается образованием в клетках простейших фагоцитарных вакуолей, содержащих поглощенные бактерии. При этом значительная часть интернированных бактерий в вакуолях тетрахимен подвергается лизису, но оставшиеся резистентные к фагоцитозу микроорганизмы могут размножаться в них [6, 7].

Для установления способности *B. pseudomallei* размножаться в клетках *T. pyriformis* определяли динамику роста буркхольдерий в сокультурах и параллельно в LB без простейших (рис. 1). Как показано на рис. 1, в ассоциированных культурах в первые 24 ч отмечалось выраженное уменьшение количества бактерий (на 2 порядка), а затем восстановление его до исходного уровня, свидетельствующее о размножении микроорганизмов, выживших в фагосомах.

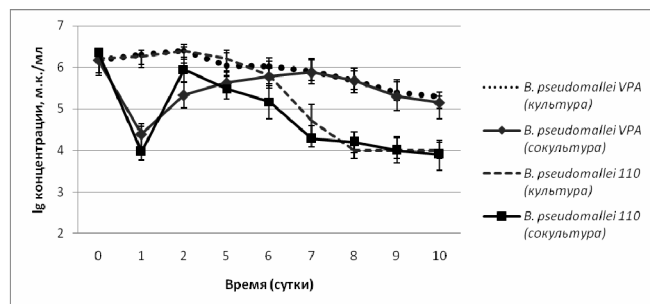


Рис. 1. Динамика размножения *B. pseudomallei* в сокультуре с *T. Pyriformis*

Кривые роста культур в ассоциации с *T. pyriformis* имели отчетливые различия, зависящие от штамма. Более медленным было увеличение и снижение концентрации клеток авирулентного штамма

B. Pseudomallei VPA (до $n \times 10^5$ м.к./мл) и относительное быстрое, за тот же период времени, нарастание и уменьшение концентрации бактерий вирулентного штамма *B. Pseudomallei* 110 (до $n \times 10^4$ м.к./мл).

Дополнительные данные о внутриклеточной локализации размножающихся интернированных буркхольдерий были получены при исследовании чувствительности к антибактериальным препаратам сокультур микроорганизма с тетрахименами в сравнении с культурами в LB. Определение минимальных бактерицидных концентраций (МБК) для *B. Pseudomallei* цефтазидима, доксициклина, меропенема показало, что ассоциированные с тетрахименами культуры отличались повышенной резистентностью к этим антибиотикам, что являлось результатом ограниченного проникновения антибактериальных препаратов в эукариотические клетки (рис. 2).

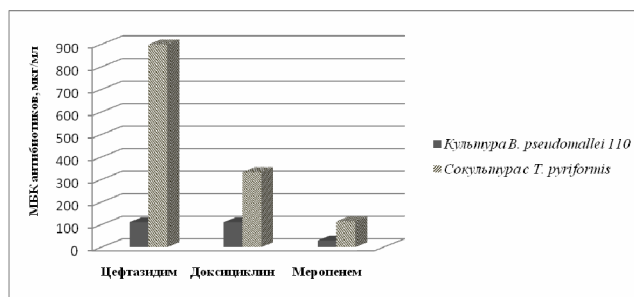


Рис. 2. Чувствительность к антибиотикам *B. Pseudomallei* 110 в сокультуре с *T. pyriformis*

При выборе режима пассажа *B. Pseudomallei* 110 в *T. Pyriformis* основывались на данных динамики размножения его культур в клетках тетрахимен. Исследованию подвергали культуры, выделенные из клеток тетрахимен после 15 пассажей: их высевали на различные селективные среды для определения продукции внеклеточно секретируемых ферментов (протеаз, лецитиназы, гемолизина), а также подвижности (табл.).

Активность внеклеточных ферментов *B. Pseudomallei*

Штамм	Диаметр зоны, мм					
	24 ч			48 ч		
	Exp	Lec	Hem	Exp	Lec	Mot
<i>B. pseudomallei</i> 110 исх.	2	2	<1	10	4	2
<i>B. pseudomallei</i> 110 з.х.	4	2	<2*	14	4	2*
<i>B. pseudomallei</i> 110 Т.р.	6	4	<2	18	8	2
<i>B. pseudomallei</i> 110 з.х. + Т.р.	6	4	<2	10	8	2
<i>B. pseudomallei</i> 110 LB	2	2	<1	10	4	2

*β-гемолитическая активность.

Примечание: *B. Pseudomallei* 110 исх. – исходная культура; *B. Pseudomallei* 110 з.х. – культура от золотистых хомячков; 110 Т.р. – после пассажа в *T. pyriformis*; 110 з.х. + Т.р. – от золотистых хомячков после пассажа в *T. pyriformis*; 110 LB – после пассажа в LB; Exp – экзопроtease, Lec – лецитиназа, Hem – гемолизин, Mot – подвижность.

Как видно из табл., показатели активности внеклеточных ферментов и подвижность исходной культуры *B. Pseudomallei* 110 и культуры после пассажа в LB не имели отличий. Максимально выраженной протеазной, лецитиназной активностью и подвижностью обладали культуры, выделенные из клеток тетрахимен. Характерной особенностью культур, полученных от золотистых хомячков, было увеличение, в сравнении с исходной культурой, функции протеаз и подвижности, а также наличие β -гемолитической активности. Однако после пассажа в клетках тетрахимен культур, выделенных от животных, наблюдали исчезновение β -гемолитической активности и формирование вокруг колоний зоны неполного гемолиза.

Вирулентность культур, выделенных из клеток *T. pyriformis*, представлена на рис. 3.

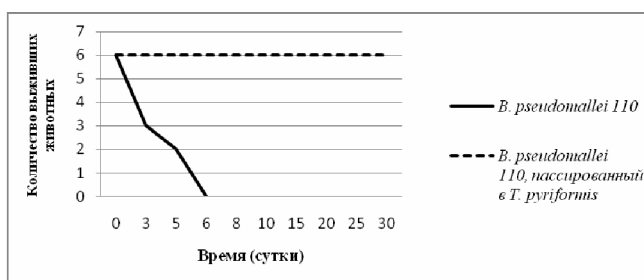


Рис. 3. Время гибели мышей линии BALB/c, зараженных культурой *B. pseudomallei* 110 в дозе 1×10^4 м.к., пассивированной в клетках *T. pyriformis*

Показано, что после пассажа в тетрахименах культура не вызывала гибели мышей линии BALB/c в течение срока наблюдения (30 дней), в то время как исходный штамм *B. Pseudomallei* 110 приводил к гибели животных на 5–6-е сутки (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, как следует из приведенных материалов, возбудитель мелиоидоза может выживать и размножаться в клетках простейших вида *T. pyriformis*. Пассаж в клетках тетрахимен оказывает влияние на фенотипические свойства *B. pseudomallei*, способствуя увеличению подвижности, продукции внеклеточно сек-

ретируемых ферментов (протеаз, лецитиназы). Одновременно с этим в результате пассажа в простейших нивелируется приобретенная в организме экспериментальных животных способность к β -гемолитической активности и снижается вирулентность для экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Белов А.Б., Куликалова Е.С. Сапронозы: экология возбудителей, эпидемиология, терминология и систематика [Belov A.B., Kulikalova E.S. Saproноses: ecology of pathogens, epidemiology, terminology and taxonomy] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика [Epidemiology and vaccine prevention]. – 2016. – № 1 (86). – С. 5–16.
2. Cheng A.C., Currie B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management // Clin. Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 18 (2). – P. 383–416.
3. Denoncourt A.M., Paquet V.E., Charette S.J. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria // Front. Microbiol. – 2014. – P. 240.
4. Inglis T.J., Sagripanti J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of Burkholderia pseudomallei // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 6865–6875.
5. Inglis T.J., Rodrigues F., Rigby P., Norton R., Currie B.J. Comparison of the susceptibilities of Burkholderia pseudomallei to meropenem and ceftazidime by conventional and intracellular methods // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48 (8). – P. 2999–3005.
6. Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. Listeria monocytogenes virulence factor Listeriolysin O favors bacteria growth in co-culture with the ciliate Tetrahymena pyriformis, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts // BMC Microbiol. – 2010. – P. 10–26.
7. Siegmund L., Burmester A., Fisher M.S., Wostemeyer J. Ingestion and digestion studies in Tetrahymena pyriformis based on chemically modified microparticles // European J. of Protistology. – 2013. – Vol. 49. – P. 552–563.
8. Tumapa S., Holden M.T., Vesaratchavest M., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., et al. Burkholderia pseudomallei genome plasticity associated with genomic island variation // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – P. 190.

Контактная информация

Король Екатерина Васильевна – научный сотрудник лаборатории сапа и мелиоидоза, Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru