

## ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ МОРФОТИПОВ КОЛОНИЙ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ПРИ ПЕРЕХОДЕ КУЛЬТУР В СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ И В ОРГАНИЗМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Характеристика морфотипов колоний *Burkholderia pseudomallei* 110, полученных в различных условиях культивирования, изучение их фенотипических свойств и переключения морфологии колоний после снятия стрессового воздействия и в организме экспериментальных животных. *Материалы и методы.* Морфотипы индуцировали при пассаже *B. pseudomallei* 110 в LB, стерильной речной воде и клетках *Tetrahymena pyriformis*, идентифицировали на среде Эшдауна, классифицировали по схеме Chantratita et al. и определяли некоторые фенотипические свойства. Культуры хранили 6–10 месяцев в 0,4% Nutrient agar под вазелиновым маслом и анализировали морфологию колоний. *Результаты.* Идентифицировали 7 морфотипов колоний, обозначенных I Chl, II, III Chl, IV Chl, V, VI, VII Chl. Вариабельность морфотипов и их соотношение зависели от условий культивирования. Морфотипы отличались активностью внеклеточных ферментов, подвижностью, увеличением продукции поринов, варьированием белковых масс-спектров и снижением вирулентности. От животных при заражении всеми морфотипами выделялись культуры I Chl; при хранении отдельные морфотипы приобретали структуру исходного варианта VI (VII Chl), сходную с ним ферментативную активность и частично восстанавливали вирулентность. *Заключение.* Морфотип VI (VII Chl) *B. pseudomallei* 110 в стрессовых условиях дает начало 5 другим морфотипам, которые в организме животных переключаются в морфотип I Chl, а после снятия стрессового воздействия ревертируют в исходный морфологический вариант и восстанавливают его фенотипические свойства.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 8–13

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, морфотипы, фенотипические свойства

Л.К.Мерино́ва, Е.В.Коро́ль, Т.В.Сени́на, О.А.Мерино́ва, Т.Н.Шаро́в, Н.Г.Плехано́ва

## SWITCHING OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* COLONY MORPHOTYPES IN STATIONARY CONDITION AND IN THE ORGANISM OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Characterization of *Burkholderia pseudomallei* 110 morphotypes, obtained under various cultivation conditions, studying phenotypic characteristics and switching of colony morphology after removal of stress and in the organism of experimental animals. *Materials and methods.* Morphotypes were induced by passage of *B. pseudomallei* 110 in LB, sterile river water and in *Tetrahymena pyriformis* cells, identified on Ashdown medium, classified according to Chantratita et al., some phenotypic characteristics have been determined. Cultures of morphotypes were stored for 6–10 months in 0,4% Nutrient agar under liquid petrolatum and colony morphology was analyzed. *Results.* Seven morphotypes of colonies were identified and designated I Chl, II, III Chl, IV Chl, V, VI, and VII Chl. The variability of morphotypes and their ratio depended on cultivation conditions. Morphotypes were distinguished by the activity of extracellular enzymes, mobility, characterized by increase of porin proteins production, variation in protein mass-spectrums, and decrease of virulence. From animals infected with all morphotypes was obtained I Chl morphotype; during storage, all cultures acquired the structure of morphotype VI (VII Chl) of the original strain, similar enzymatic activity and partially restored virulence. *Conclusion.* The morphotype VI (VII Chl) *B. pseudomallei* 110 under stress conditions gives rise to 5 other morphotypes that in the animals are switched to the morphotype I Chl; after removal of the stressful effect they are reverted to the initial morphological variant and its phenotypic properties are restored.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 8–13

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, morphotypes, phenotypic characteristics

## ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, является сапрофитным микроорганизмом, обитающим в воде и почве эндемичных территорий Юго-Восточной Азии, Северной Австралии и других тропических и субтропических регионов мира [5, 7]. Культуры *B. pseudomallei*, выделенные из объектов внешней среды, также как клинические изоляты, образуют на плотных питательных средах различные морфологические варианты колоний [9, 10], которые в работе Chantratita N. et al. на среде Эшдауна впервые были дифференцированы на отдельные морфотипы [3].

Морфотипы могут быть получены *in vitro* в условиях физиологического для бактерий стресса (лимитирования факторов питания, неоптимальной температуры выращивания, присутствия в среде антибиотиков) или *in vivo* при экспериментальной инфекции в организме животных [3, 4, 8]. Образование морфотипов связывают с феноменом переключения морфологии колоний в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды, наряду с изменением других фенотипических свойств (вариабельной экспрессией липополисахарида, экзополисахаридов, биопленкообразованием, подвижностью, внеклеточной секрецией ферментов) [3, 6, 12].

Исследование морфологической вариабельности представляет значительный интерес не только с точки зрения оценки адаптационных возможностей *B. pseudomallei*, но является важным для идентификации мелиоидозных культур, так как шероховатые (R) варианты колоний микроорганизма, часто выделяемые при бактериологическом анализе, отличаются широким спектром морфотипов [3, 4, 9].

В настоящей работе мы индуцировали образование морфотипов штамма *B. pseudomallei* 110 путем многократного пассажа в LB бульоне и стерильной речной воде. Дополнительно для этого использовали цилиарные инфузории *Tetrahymena pyriformis*, в которых выживание и размножение *B. pseudomallei in vitro* было установлено ранее [1].

Цель исследования заключалась в характеристике морфотипов колоний *B. pseudomallei* 110, полученных в различных условиях культивирования, изучении у них фенотипических свойств и переключения морфологии колоний после снятия стрессового воздействия и в организме экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали вирулентный штамм *B. pseudomallei* 110 из коллекции ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ. Аксеническая культура *T. pyriformis* получена из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Тетрахимены выращивали в Luria-Bertani (LB) бульоне (HiMedia) при температуре 28°C.

Буркгольдерии культивировали на агаре LB при 32°C 24 ч, суспендировали в стерилизованной автоклавированием речной воде, соединяли с тетрахименами в соотношении 100:1 ( $1 \times 10^6$  м. к./мл бактерий и  $1 \times 10^4$  кл/мл тетрахимен) в LB бульоне и воде, сокультуры инкубировали при температуре 28°C. Спустя 3-4 суток, когда внутриклеточное размножение микроорганизма достигало максимума, сокультуры осаждали центрифугированием при 8000 об/мин 10 мин, отмывали в свежей среде LB или воде и вновь соединяли с проверенной на аксеничность культурой тетрахимен. С такой же периодичностью проводили пересевы в этих средах культур микроорганизма без тетрахимен. После 15 пассажей колонии из образцов культур на среде Эшдауна [2] фотографировали и анализировали полученные изображения. При идентификации морфотипов основывались на схеме Chantratita N. et al. [3].

Культуры каждого отдельного морфотипа, выделенные в условиях стресса среды, оставляли при комнатной температуре в течение 6-10 месяцев в 0,4 % Nutrient agar (HiMedia) под вазелиновым маслом, после чего исследовали морфологию колоний. У всех морфотипов до и после хранения определяли на средах с необходимыми субстратами протеазную, лецитиназную, гемолитическую активность и подвижность. Вирулентность культур оценивали по динамике гибели животных при внутрибрюшинном заражении золотистых хомячков в дозе  $1 \times 10^2$  м. к., мышей линии BALB/c и белых мышей в дозе  $1 \times 10^3$  м. к.

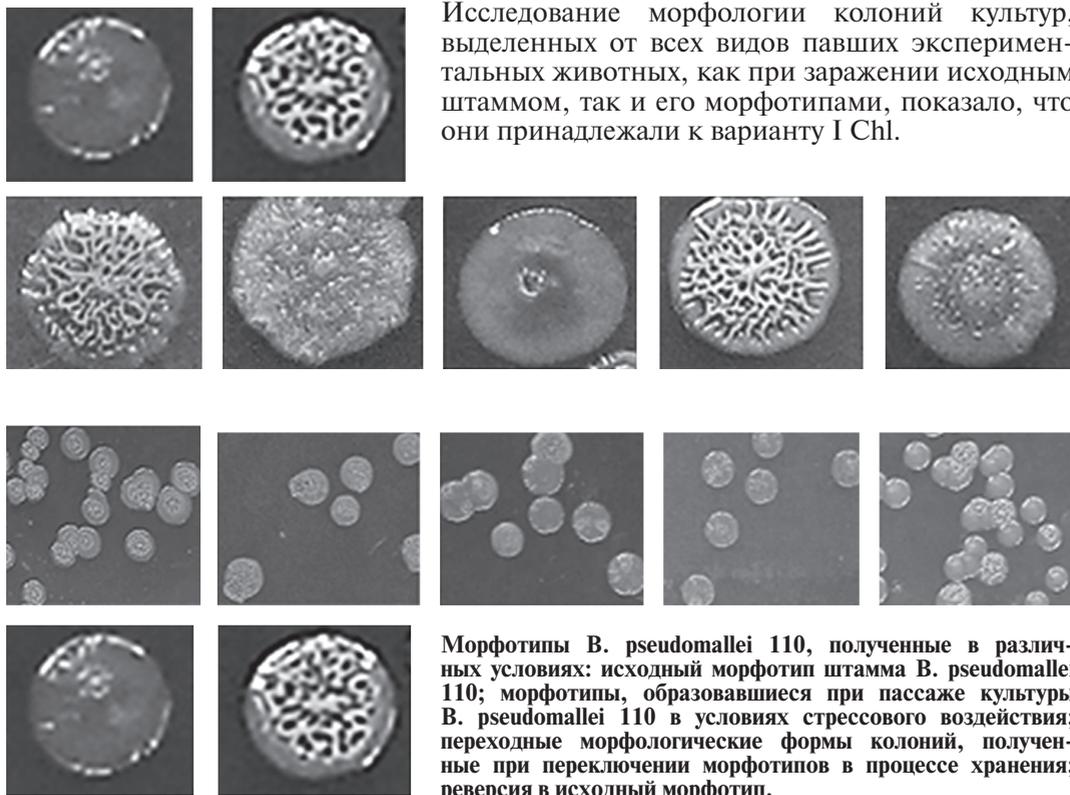
Анализ белковых спектров наружных мембран микроорганизма проводили в SDS-PAAG [11]. Регистрацию масс-спектров обшклеточных белков *B. pseudomallei* осуществляли на приборе Axima Performance (Shimadzu, Япония). При характеристике масс-спектров учитывали количество пиков, их интенсивность и места расположения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование на среде Эшдауна колоний *B. pseudomallei* 110 из культур, полученных в различных условиях, показало, что они могут быть отнесены к 7 отдельным морфотипам. Четыре морфотипа по идентификационным морфологическим признакам имели сходство с вариантами I, III, IV и VII Chantratita N. et al. и получили обозначение ChI (Chantratita like variant), в отличие от трех других (II, V, VI), пронумерованных в произвольном порядке. Исходная культура *B. pseudomallei* 110 состояла более чем на 90% из морфотипа VI в ассоциации с небольшим количеством VII ChI.

Как показано на рис., морфотип VI имел структуру гладких, глянцевых, слегка выпуклых колоний, тогда как практически все, вновь образовавшиеся при его переключении морфотипы, кроме III ChI, представляли собой шероховатые колонии, отличавшиеся текстурой поверхности, центра или края, а также цветовым оттенком. Вариабельность морфотипов в различных образцах, также как образование доминирующих вариантов, зависели от условий культивирования *B. pseudomallei* 110: наибольшее разнообразие морфотипов наблюдалось при пассаже в LB бульоне, тогда как в воде формировался в основном морфотип I ChI (95-97 % колоний), в клетках тетрахимен в LB бульоне и воде доминировали V и I ChI морфотипы.

Культуры идентифицированных морфологических вариантов обладали сниженной вирулентностью и вызывали гибель золотистых хомячков в более отдаленные сроки (26-34 сут) по сравнению с исходным штаммом (5 сут). При заражении отдельными морфотипами мышей линии BALB/c и мышей летальность единичных животных наблюдали в течение 30 суток. Исследование морфологии колоний культуры, выделенных от всех видов павших экспериментальных животных, как при заражении исходным штаммом, так и его морфотипами, показало, что они принадлежали к варианту I ChI.



Морфотипы *B. pseudomallei* 110, полученные в различных условиях: исходный морфотип штамма *B. pseudomallei* 110; морфотипы, образовавшиеся при пассаже культуры *B. pseudomallei* 110 в условиях стрессового воздействия; переходные морфологические формы колоний, полученные при переключении морфотипов в процессе хранения; реверсия в исходный морфотип.

У идентифицированных морфотипов была выявлена вариабельность фенотипических свойств. Повышенную, в сравнении с исходным штаммом, способность к продукции протеаз,  $\beta$ -гемолитическую активность и подвижность в наибольшей степени проявлял морфотип I Chl. Сравнение фенотипических свойств I Chl морфотипа, полученного из разных источников, показало, что культуры, выделенные от экспериментальных животных, как и культуры этого морфотипа, изолированные из воды, обладают сходным уровнем продукции внеклеточных ферментов и подвижностью (табл.).

Определение спектров белков наружных мембран в SDS-PAAG показало, что все морфологические варианты, включая выделенные от экспериментальных животных, характеризовались увеличением продукции порообразующих белков с Mr 27, 30 и 39 кДа. При определении масс-спектров общеклеточных белков наиболее вариабельным по сравнению с исходным штаммом и другими морфотипами оказался вариант I Chl, который отличался появлением нескольких пиков слабой интенсивности в диапазоне 1000-3000 m/z, а также появлением высокого пика в диапазоне 5500-6000 m/z.

Исследование культур отдельных морфотипов после 6 месяцев хранения в 0,4% Nutrient агар под вазелиновым маслом обнаружило появление переходных форм между разными морфотипами, которое предположительно можно было расценить как переключение одного морфотипа в другой. В частности, культура морфотипа I Chl приобретала структуру, соответствующую III Chl: периферическая гладкая зона колоний расширялась, центральная шероховатая часть уменьшалась в диаметре, колонии становились более плоскими и сохраняли выраженную малиновую окраску, характерную для обоих (I Chl и III Chl) морфотипов. Морфотип II в целом показал тенденцию к переключению в морфотип V, однако у части колоний выявлялись сектора малинового цвета со структурой морфотипа I Chl. Культура III Chl после 6 месяцев хранения приобретала признаки морфотипа VI. Одновременно у некоторых образовавшихся колоний VI типа были видны фрагменты с шероховатой структурой, возможно I Chl или VII Chl морфотипов, отдельно выявлялись колонии I Chl. Что касается морфотипов IV Chl и V, то основная часть их колоний отчетливо трансформировалась в морфологический вариант VI.

По истечении срока хранения, равного 10 месяцам, переходные варианты практически полностью приобрели структуру морфотипа VI (VII Chl), типичную для исходного штамма *V. pseudomallei* 110 (рис.). Определение вирулентности этих трансформированных морфотипов для золотистых хомячков показало ее частичное восстановление и сокращение жизни экспериментальных животных до 17-18 суток по сравнению с 26-34 сутками, установленными изначально для отдельных морфотипов. После продолжительного пребывания в стационарном состоянии в питательной среде ревертировавшие морфотипы приобретали ферментативную активность и подвижность, соответствующую исходному морфотипу штамма *V. pseudomallei* 110.

Современный взгляд на морфологическую изменчивость культур *V. pseudomallei* основывается на представлении о морфотипах колоний и их переключении [3]. Многообразие описанных морфотипов этого микроорганизма свидетельствует о чрезвычайной вариабельности признака морфологии колоний. При этом спектр и разнообразие морфотипов являются особенностью штаммов, выделенных в различных географических регионах [3, 4, 8]. Несмотря на то, что механизм переключения морфотипов не изучен, признано, что образование морфотипов является частью процессов адаптации микроорганизма к неблагоприятным воздействиям среды, включая среду макроорганизма [3, 6, 12].

#### Фенотипические свойства культур морфотипа I Chl из различных источников

Штамм, морфотип	Зона (мм), 48 ч		
	Exp	Hem	Mot
<i>V. pseudomallei</i> 110	10±2	2±1	15±2
I Chl от золотистых хомячков	14±2	2*±1	20±2
I Chl от мышей BALB/c	15±2	2*±1	25±3
I Chl от мышей	15±2	5*±1	22±3
I Chl из воды	16±2	2*±1	30±3

Примечание. Exp — экзопротеаза, Hem — гемолизина, Mot — подвижность; \*  $\beta$ -гемолитическая активность.

В настоящей работе мы использовали несколько физиологических факторов воздействия на культуры *B. pseudomallei*, способных вызвать нестабильное состояние морфологии колоний: культивирование в питательной среде путем многократных пересевов, пассаж культур в стерильной речной воде и отдельно — в клетках *T. pyriformis* при температуре 28 °С, оптимальной, как для поддержания простейших, так и соответствующей условиям среды обитания и размножения возбудителя мелиоидоза. Это позволило охарактеризовать морфотипическую вариабельность колоний штамма *B. pseudomallei* 110 в различных условиях, выявить структуру исходного морфотипа и показать его переключение в ряд других морфологических вариантов.

Наибольший интерес среди идентифицированных морфотипов представляет I Chl — морфологический вариант, обладающий сходством с морфотипом I, преобладающим в клинических изолятах от больных мелиоидозом, исследованных Chantratita N. et al. [3]. В нашей работе I Chl является доминирующим морфотипом культур *B. pseudomallei* 110, пассированных в стерильной речной воде, а также выделенных от экспериментальных животных при заражении любым другим морфотипом.

Образование какого-либо одного морфотипа в результате переключения различных морфологических вариантов в организме мышей линии BALB/c при острой мелиоидозной инфекции наблюдали и другие исследователи [4, 8]. В частности, Gierock P. et al., выделившие *in vitro* из двух мелиоидозных штаммов в общей сложности 14 морфотипов, показали, что в организме экспериментальных животных или *in vitro* в культурах макрофагов происходит синхронизация их структуры в один из идентифицированных морфотипов одновременно с синхронизацией варьирующих у отдельных морфотипов показателей метаболической активности — поглощения глюкозы, синтеза аминокислот [8].

Возможно, выявленное в нашем исследовании переключение в I Chl представляет собой заключительный этап трансформации исходного или другого отдельного морфотипа *B. pseudomallei* 110 в наиболее стрессовой среде (воде или среде макроорганизма), тогда как наибольшее разнообразие морфотипов наблюдается в LB бульоне, где, в целом, поддерживаются благоприятные условия для размножения культур. В работе Chantratita N. et al. отмечено, что при длительном культивировании возбудителя мелиоидоза по мере истощения питательной среды соотношение из нескольких морфотипов также заменяется каким-либо одним вариантом, который становится доминирующим и, по-видимому, обладает фенотипическими свойствами, в наибольшей степени соответствующими условиям среды [3].

В заключение необходимо отметить, что разнообразие морфотипов возбудителя мелиоидоза, идентифицированных в нашей работе, является характеристикой определенного штамма и получено в определенных условиях стрессового воздействия. При этом доминированию одного морфологического типа колоний (в данном случае I Chl) в равной степени способствовали как условия длительного пассажа в стерильной речной воде, так и среда макроорганизма (организм экспериментальных животных). После снятия стрессового воздействия наблюдалась постепенная динамика реверсии всех морфотипов к исходному варианту VI (VII Chl) штамма *B. pseudomallei* одновременно с восстановлением вирулентности и других фенотипических свойств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Король Е.В., Меринова Л.К., Шубникова Е.В., Меринова О.А., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г. Выживаемость *Burkholderia pseudomallei* в клетках ресничной инфузории *Tetrahymena pyriformis*: влияние микроорганизма на инцистирующую активность тетрахимен. Проблемы ООИ. 2017, 3:49-52.
2. Ashdown L. R. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology*. 1979, 11(2):293-297.
3. Chantratita N., Wuthiekanun V., Boonbumrung K. et al. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *J. Bacteriol.* 2007, 189:807-817.

4. Chen Y. S., Lin H. H., Hung C. C. et al. Phenotypic characteristics and pathogenic ability across distinct morphotypes of *Burkholderia pseudomallei* DT. *Microbiol. Immunol.* 2009, 53:184-189.
5. Cheng A. C., Currie B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18:383-416.
6. Chin C. Y., Hara Y., Ghazali A. K. et al. Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence. *J. BMC Genomics.* 2015, 16:471.
7. Currie B. J., Fisher D. A., Howard D. M. et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31:981-986.
8. Gierok P., Kohler C., Steinmetz I. et al. *Burkholderia pseudomallei* colony morphotypes show a synchronized metabolic pattern after acute infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016, 10(3): e0004483.
9. Howard K., Inglis T. J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:3312-3316.
10. Inglis T. J., Sagripanti J. L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72:6865-6875.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227:680-685.
12. Tandhavanant S., Thanwisai A., Limmathurotsakul D. et al. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environments in human macrophages in vitro. *BMC Microbiol.* 2010, 10:303.

*Поступила 27.07.18*

Контактная информация: Меринова Людмила Константиновна, д.м.н., проф.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442) 37-36-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Е.Ю.Агафонова, Н.И.Смирнова, Ж.В.Альхова, Я.М.Краснов, Л.Ф.Ливанова, Ю.В.Лозовский, В.В.Кутырев*

## **НЕТОКСИГЕННЫЕ ШТАММЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА**

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

*Цель.* Сравнительный анализ секвенированных нами полных геномов нетоксигенных штаммов с разным набором генов патогенности и оценка их вирулентности при внутрикишечном заражении новорожденных крольчат. *Материалы и методы.* Полногеномное секвенирование ДНК 26 штаммов проведено с использованием технологии полупроводникового секвенирования. Филогенетические связи штаммов выявлены на основе SNP-анализа. Продукцию гемолизина и гемагглютинин-протеазы оценивали общепринятыми методами. Вирулентность штаммов для крольчат определяли путем их внутрикишечного заражения в дозе  $10^7$  КОЕ/мл. *Результаты.* На основе анализа полных геномов нетоксигенных штаммов *ctxA**tcpA*<sup>+</sup> и *ctxA**tcpA*<sup>-</sup> выявлены различия между ними по составу и стабильности структуры мобильных элементов, связанных с патогенностью. Обнаружены также существенные отличия этих штаммов друг от друга по нуклеотидным последовательностям генов *hlyA*, *hapA* и *gtxA*, кодирующих продукцию дополнительных факторов патогенности. Представлены результаты оценки их филогенетических связей. На модельных животных подтверждена неспособность нетоксигенных штаммов *ctxA**tcpA*<sup>+</sup> и *ctxA**tcpA*<sup>-</sup> вызывать развитие типичной холерной инфекции. *Заключение.* Получены новые данные о структуре геномов различных нетоксигенных штаммов и их филогенетических связях. На основании результатов заражения модельных животных клетками нетоксигенных штаммов с изученным геномом сделан вывод об их неспособности вызывать развитие типичной холерной инфекции.

Журн.микробиол., 2019, № 2, С. 13—24

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, нетоксигенные штаммы, геном, SNP-анализ, патогенность