

УДК 579.083.13

## ИНДУКЦИЯ ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФОРМ У НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

А.Б. Маргулис, О.Н. Ильинская, А.И. Колпаков, К. Муффер

### Аннотация

Одной из проблем снижения эффективности средств антибактериальной терапии является образование гипометаболических, в частности некультивируемых, форм микроорганизмов, не подверженных действию препаратов. Показано, что гомосеринлактон и пара-2-гидроксиэтилфенол ускоряют реверсию штамма *B. subtilis spo0E* к спорообразующему фенотипу. Для *Staphylococcus aureus* индуктором гипометаболизма явился только гексилрезорцин. Индукция гипометаболических форм при длительном культивировании штаммов не приводит к образованию новых морфотипов колоний и не связана с синтезом собственных алкилрезорцинов.

### Введение

Регулирование перехода микроорганизмов в состояние покоя имеет большое значение для биотехнологии и медицины. Прикладной аспект этой проблемы связан с потенциальной возможностью управления такими процессами, как образование некультивируемых форм патогенов, устойчивых к фармакологическому воздействию, и сохранение целевой активности промышленных штаммов микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ. В настоящее время хорошо известна способность многих патогенных бактерий существовать и размножаться в объектах внешней среды – почвах, водоемах и др. Феномен перехода в некультивируемое состояние в последнее время привлекает внимание исследователей, поскольку образование некультивируемых форм, по-видимому, может обеспечивать сохранение патогенных бактерий в межэпидемические и межэпизоотические периоды [1]. Способность к переходу в некультивируемое состояние к настоящему времени выявлена для многих (около 30 видов) патогенных бактерий, но механизмы этого процесса остаются неясными [1, 2].

Известно, что микроорганизмы в условиях стресса вступают на путь образования анабиотических форм, позволяющих выжить в неблагоприятных условиях. Подобные формы описаны для многих бактерий [3], в том числе и спорообразующих бацилл в условиях репрессии спорообразования [4]. Снижение интенсивности обмена веществ вегетативных клеток может быть усилено веществами – индукторами гипометаболического состояния. Подтверждено участие в этом процессе ряда химических факторов эндогенного происхождения, в частности алкилрезорцинов [4, 5]. Физиологическое состояние бактерий может ре-

гулироваться по принципу «кворум-эффект», т. е. при достижении эндогенным регулятором определенной концентрации, создаваемой культурой определенных плотности и возраста. В химической коммуникации у бактерий принимают участие различные соединения [6, 7]. Для ацилированных лактонов гомосерина установлено участие в «эффектах кворума» у грамотрицательных бактерий [8, 9]. У стафилококков плотностно-регулируемые процессы осуществляются с участием низкомолекулярных пептидов, также содержащих лактонные структуры [10]. Исследование регуляции физиологического состояния микроорганизмов экзогенными алкилрезорцинами и гомосеринлактоном у грамположительных бактерий, как неспорообразующих, так и с нарушенной системой регуляции, было целью настоящей работы.

### 1. Постановка задачи

Объектом исследования служили грамположительные бактерии: мутантный по спорообразованию штамм *Bacillus subtilis spo0E* (*phe A1*, *spo0E 11*, *trp C2*) из коллекции ATCC (IDA), США, и штамм *Staphylococcus aureus OK*, клинический изолят из коллекции Медицинской Академии Республики Татарстан. Работали с соединениями класса алкилрезорцинов (AR): химические аналоги ауторегуляторных факторов  $d_1$  бактерий – метилрезорцин и гексилрезорцин. Для установления возможного неспецифического действия ауторегуляторного фактора дрожжей по отношению к бактериям был выбран пара-2-гидроксиэтилфенол – регулятор группы  $d_1$  у дрожжей [5], а также применяли индуктор включения *luxI-luxR*-оперона – гомосеринлактон, являющийся зависимым от плотности культуры регулятором физиологического состояния бактерий [11]. Исходные растворы веществ готовили в диметилсульфоксиде (DMSO) в концентрации 10 мг/мл, рабочую концентрацию (50 мкг/мл) получали, делая разведение стерильной дистиллированной водой. Гомосеринлактон растворяли в воде.

Исходный титр бактерий в суспензии, полученной смывом культур с L-агара, составлял для бацилл  $3.4 \times 10^7$  и для стафилококков  $6.1 \times 10^7$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл дистиллированной воды. Суспензию инкубировали в стационарных условиях при 30°C в колбах на 100 мл, содержащих 30 мл дистиллированной воды с каждым из соединений (50 мкг/мл, опытный вариант) и без вещества (контрольный вариант).

Каждые две недели проводили оценку КОЕ с описанием морфологии колоний. 0.1 мл суспензии наносили на поверхность L-агара в чашки Петри и распределяли равномерно по поверхности агара. При высеве использовали метод предельных разведений. Каждые две недели проводили проверку инкубируемого материала на наличие спор (для штамма *B. subtilis spo0E*) и оценку числа некультивируемых клеток (для штамма *S. aureus*) с использованием теста *Kogure*, основанного на положении, что жизнеспособные клетки увеличиваются в размерах при добавлении богатого питательного субстрата в условиях одновременного блокирования репликации и деления [12]. Для этого образец, в котором присутствовали различные по жизнеспособности клетки, инкубировали 4 ч и 24 ч при 30°C в присутствии 250 мкг/мл дрожжевого экстракта и 20 мкг/мл налидиксовой кислоты. После инкубации каплю из суспензии фиксировали на предметном стекле формальдегидом. Число различных по морфо-

логии клеток регистрировали под микроскопом в 20 полях зрения и выражали в процентах по отношению к общему числу бактерий.

Для установления возможности синтеза АР рабочими штаммами проводили культивирование их в жидкой питательной среде (L-бульон) в течение 6 недель при 30°C без добавления исследуемых веществ. По окончании срока культивирования бактерии осаждали центрифугированием (20 мин. при 3000 g). Надосадочную жидкость и осадок, разведенный в 1 мл дистиллированной воды, отдельно проверяли на наличие алкилрезорцинов в цветной реакции с Fast Blue В (FBB, Sigma) [13]. 2.5 мг FBB растворяли в 5 мл 5%-ной уксусной кислоты и доводили объем *n*-пропанолом до 25 мл. 0.5 мл исследуемой суспензии смешивали с 1.5 мл реактива. Смесь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность при  $\lambda = 490$  нм, используя в качестве контрольного варианта стерильный L-бульон. Содержание АР рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием гексилрезорцина.

## 2. Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что гексилрезорцин, индуцирующий переход спорообразующего штамма *Bacillus subtilis SK1* в гипометаболическое состояние, в концентрации 50 мкг/мл не обладал токсичностью, но индуцировал повреждение генетического материала [14]. В этой концентрации другие регуляторы были также нетоксичны. Отсутствие токсичности позволило выбрать концентрацию 50 мкг/мл для изучения индукции гипометаболического состояния исследуемых микроорганизмов.

Как *S. aureus OK*, так и дефектный по спорообразованию штамм *B. subtilis spo0E* сохраняли жизнеспособность в течение всего срока инкубации в условиях голодания (28 и 12 недель соответственно). Было установлено, что характер динамики числа КОЕ при высеве из суспензий штаммов *B. subtilis spo0E* (рис. 1) и *S. aureus OK* (рис. 2), подвергавшихся длительному инкубированию, принципиально различен.

Число КОЕ *B. subtilis spo0E* в течение первых 6-и недель резко падало, а затем в течение всего последующего времени инкубации оставалось практически на одном уровне. Вероятно, это связано с поддержанием популяцией роста на лизате погибших клеток. Однако при сходстве общих тенденций изменения кривых роста *B. subtilis spo0E* в каждом из вариантов необходимо отметить, что в вариантах с веществами число колоний в каждой временной точке было достоверно меньше, чем в контроле. Наименьшее количество КОЕ регистрировали при высеве бактерий из суспензии с добавлением гомосеринлактона. Также незначительное число КОЕ регистрировали при высеве суспензий с метил- и гексилрезорцином. Кривая роста бактерий в присутствии пара-2-гидроксиэтилфенола имела аналогичный предыдущим кривым характер при несколько большем числе КОЕ по сравнению с другими опытными вариантами (рис. 1).

Таким образом, к 8-й неделе инкубирования способность бацилл к образованию КОЕ под воздействием исследуемых регуляторов уменьшилась на 1–2 порядка, причем наибольшим эффектом обладал гомосеринлактон. К этому времени в вариантах с гомосеринлактоном и пара-2-гидроксиэтилфенолом бы-

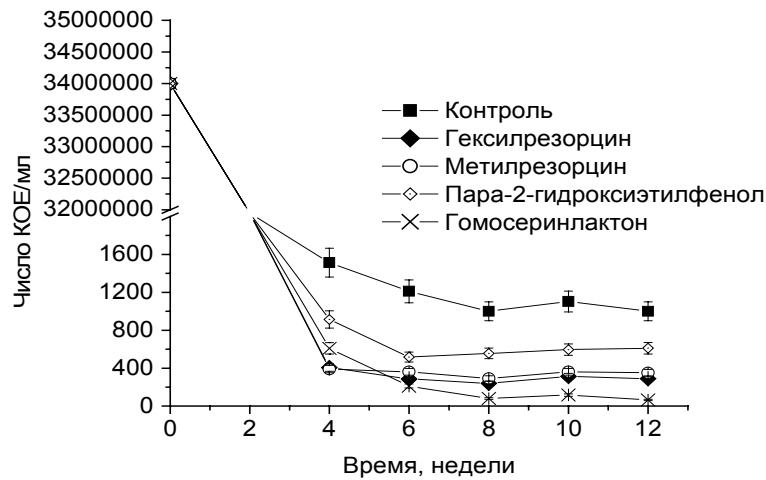


Рис. 1. Изменение числа колониобразующих единиц в процессе культивирования *B. subtilis spo0E* с добавлением 50 мкг/мл исследуемых веществ – возможных индукторов гипометаболического состояния бактерий – и без их добавления (контроль)

ли обнаружены споры, т. е. произошла реверсия штамма *spo0E* к исходному спорообразующему генотипу.

К 12-й неделе инкубирования споры появились во всех вариантах, в том числе и контрольном, и составляли до 80% всех клеток в поле зрения микроскопа. Таким образом установлено, что в присутствии гомосеринлактона и пара-2-гидроксиэтилфенола реверсия *B. subtilis spo0E* к спорообразующему фенотипу происходит раньше, чем в контроле. Гомосеринлактон и пара-2-гидроксиэтилфенол не индуцируют генетических повреждений [15, 16], поэтому вряд ли могла иметь место супрессия мутации в гене *spo0E*. Возможно, что гомосеринлактон как регулятор, вызывающий индукцию экспрессии генов определенных оперонов (*luxI-luxR*), у бацилл с нарушенной споруляцией индуцирует синтез белков, компенсирующих функции дефектного *Spo0E*. Известно, что мутантный белок *Spo0E* обладает гиперактивностью фосфатазы, что играет роль в репрессии спорообразования [17]. В условиях длительного голодания штамма *B. subtilis*, несущего мутантный белок *Spo0E*, восстановление спорообразования можно также связать с ингибированием присущей этому белку фосфатазной активности.

Динамика изменений числа КОЕ для штамма *S. aureus OK* отражена на рис. 2. К 18-й неделе инкубации наблюдали пик снижения числа КОЕ. Продолжение инкубации привело к активации вторичного роста штамма *S. aureus OK* во всех вариантах, кроме варианта с гексилрезорцином. Этот факт связали с возможной индукцией перехода стафилококков в гипометаболическое состояние под влиянием гексилрезорцина. Для подтверждения этого предположения мы провели тест *Kogure* [12] с образцом суспензии клеток *S. aureus OK* после 28 недель инкубации. Было отмечено, что около 90% клеток суспензии в варианте с гексилрезорцином не отвечали на внесение экзогенного питательного субстрата, в то время как в контрольном варианте (без гексилрезорцина) таких

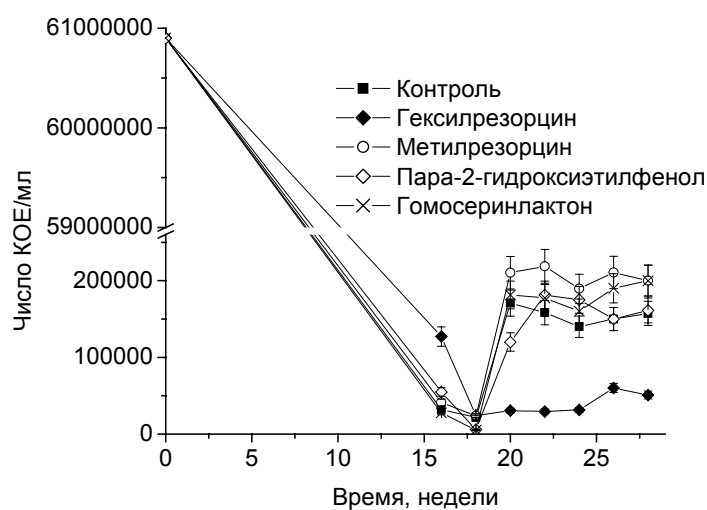


Рис. 2. Изменение числа колониеобразующих единиц в процессе культивирования *S. aureus* ОК с добавлением 50 мкг/мл исследуемых веществ – возможных индукторов гипометаболического состояния бактерий – и без их добавления (контроль)

клеток было обнаружено лишь 27% (табл. 1). Клетки, не реагирующие на внесение питательного субстрата, при этом не окрашивались метиленовым синим, что подтверждает их жизнеспособность. Это означает, что гексилрезорцин действительно способствует переходу стафилококков в гипометаболическое состояние.

Как известно, молекула гомосеринлактона является регуляторной для группы грамотрицательных бактерий [8, 9]. Грамположительные мутантные бациллы, не воспринимающие сигналы к спорообразованию из-за отсутствия белка *Spo0E*, также были подвержены влиянию гомосеринлактона, которое выражалось в значимом снижении числа КОЕ. Однако грамположительные стафилококки, в отличие от бацилл, не воспринимали гомосеринлактон как сигнал к переходу в гипометаболическое состояние.

Из серии представленных ауторегуляторов только гексилрезорцин можно рассматривать как универсальный индуктор гипометаболического состояния штаммов, не способных к спорообразованию, в то время как гомосеринлактон индуцировал переход к этому состоянию только у мутантного штамма бацилл.

Проверка способности штаммов синтезировать AR при длительном росте на L-бульоне показала, что исследуемые штаммы в данных условиях культивирования не образуют ауторегуляторов этого типа. AR не были обнаружены ни в клетках, ни в культуральной жидкости, т. е., в отличие от *B. cereus* [18], мутант *B. subtilis spo0E* не продуцирует AR в условиях старения. Тем не менее, результаты нашей работы свидетельствуют, что экзогенный гексилрезорцин функционирует как сигнальная молекула, активирующая переход грамположительных бактерий в гипометаболическое состояние.

Вероятно, описанные выше ауторегуляторы физиологического состояния бактерий в соответствии с их функциями можно рассматривать как один из компонентов механизма стрессоустойчивости. Исследования в этой области позволят создать более полное представление об универсальном ответе микро-

Табл. 1

Процентное содержание клеток в 28-недельной суспензии *Staphylococcus aureus* ОК, отвечающих на внесение экзогенного субстрата (тест *Kogure*); значение (%) ± стандартное отклонение

Размер клеток	Без гексилрезорцина	С гексилрезорцином
Крупные клетки, %	73±1.3	10±0.7
Мелкие клетки, %	27±1.1	90±0.8

организмов на стресс и сделать выводы о потенциальной возможности направленной регуляции физиологической активности патогенных бактерий. Клиническая практика нуждается в создании теоретической базы для управления процессами перехода патогенных и сапрофитных микроорганизмов в некультивируемое состояние, поскольку устойчивые формы возбудителей плохо поддаются выявлению и элиминации.

Работа выполнена при поддержке Фонда НИОКР Республики Татарстан (проект № 03-3.10-180/2003(Ф)).

#### Summary

*A.B. Margulis, O.N. Ilinskaya, A.I. Kolpakov, K. Mufer.* Induction of hypometabolic forms of nonsporeforming grampositive bacteria.

Formation of hypometabolic forms of microorganisms is connected with the decrease of efficiency of antibacterial therapy. It was shown that homoserine lactone and *para*-2-hydroxyethylphenole increase the frequency of reversion of strain *B. subtilis spo0E* to spore-forming phenotype. Hexylresorcinol only was showed to be an Inductor of hypometabolic state of *Staphylococcus aureus*. Induction of hypometabolic forms during long time cultivation of strains doesn't result in formation of new morphotypes of colonies and synthesis of their own alkylresorcinols.

#### Литература

1. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И., Романова Ю.М. Обратимый переход патогенных бактерий в покоящееся (некультивируемое) состояние: экологические и генетические механизмы // Вестник РАМН. – 2000. – № 1. – С. 7–13.
2. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И. и др. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. – М., 1998.
3. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н. и др. Образование покоящихся форм *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus* // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 1. – С. 42–49.
4. Грязнова М.Н., Эль-Регистан Г.И., Козлова А.Н. и др. Микроорганизмы, их роль в плодородии почвы и охране окружающей среды. – М.: ТСХА им. К.А. Тимирязева, 1985. – С. 88–93.
5. Батраков С.Г., Эль-Регистан Г.И., Придачина Н.Н. и др. Тирозол – ауторегуляторный фактор *d<sub>1</sub>* *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. – 1993. – Т. 62, Вып. 4. – С. 633–638.
6. Oleskin A.V. Social behavior of microbial populations // J. Basic Microbiol. – 1994. – V. 34, No 6. – P. 425–439.

7. Oleskin A.V., Samuilov V.D. Technical bioenergetics and ecosystem biotechnology // J. Basic Microbiol. – 1992. – V. 32. – P. 129–149.
8. Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176, No 2. – P. 269–275.
9. Salmond G.P.C., Bycroft B.W., Stewart C.S.A.B., Williams P. The bacterial “enigma”: cracking the code of cell-cell communication // Mol. Microbiol. – 1995. – V. 16, No 4. – P. 615–624.
10. Mamson M.D., Armitage J.D., Hoch J.A., Macnab R.M. Bacterial locomotion and signal transduction // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 5. – P. 1009–1022.
11. Givskov M., Ostling J., Eberl L., et al. Two separate regulatory systems participate in control of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MGI // J. Bacteriol. – 1998. – V. 18, No 3. – P. 742–745.
12. Kogure K., Simudu U., Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria // Can. J. Microbiol. – 1979. – V. 25. – P. 415–420.
13. Pluscik F., Kozubek A., Mejbaum-Katzenellenbogen W. Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B // Act. Soc. Bot. Pol. – 1981. – V. 50, No 7. – P. 645–651.
14. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленихин П.В. и др. Влияние аутоиндукторов анабиоза бактерий на геном микробной клетки // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 2. – P. 164–168.
15. Бушманова О.В., Ожиганова И.В., Маргулис А.Б. Оценка генотоксических свойств гомосеринлактона // Докл. конф. молодых ученых «Туполевские чтения». – Казань: Изд-во КГТУ им. Туполева, 2003. – Т. 1. – С. 154.
16. Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Эль-Регистан Г.И. Индукция SOS-ответа клетки под действием ауторегуляторных факторов микроорганизмов // Генетика. – 2003. – № 9. – С. 1180–1184.
17. Ohlsen K.L., Grimsley J.K., Hoch J.A. Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA. – 1994. – P. 1756–1760.
18. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н. и др. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 811–819.

Поступила в редакцию  
15.06.05

---

**Маргулис Анна Борисовна** – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [Anna.Margulis@ksu.ru](mailto:Anna.Margulis@ksu.ru)

**Ильинская Ольга Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [Olga.Ilinskaya@ksu.ru](mailto:Olga.Ilinskaya@ksu.ru)

**Колпаков Алексей Иванович** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий НИЛ ББФ Казанского государственного университета.

E-mail: [Alexei.Kolpakov@ksu.ru](mailto:Alexei.Kolpakov@ksu.ru)

**Муфер Консолар** – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.