

**ИЗУЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПОДВИЖНОСТИ БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SSP. AURANTIACA В-162****Ю.А. Шилова, Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова***Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: VeremeenkoKatya@yandex.ru***Введение**

P. chlororaphis ssp. aurantiaca В-162 являются флуоресцирующими ризосферными бактериями, способными к продукции широкого спектра биологически активных соединений, в том числе, феназиновых антибиотиков [1]. Ввиду выраженной антимикробной и противоопухолевой активности феназиновые антибиотики и продуцирующие их штаммы представляют особый интерес в качестве основы для создания биопестицидных и фармакологических препаратов. Все это делает актуальным изучение биологических свойств и физиологических особенностей штаммов-продуцентов данных соединений. Одним из перспективных штаммов в этом отношении является *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162, на основе которого получены мутантные и генно-инженерные штаммы, обладающие способностью к сверхпродукции феназинов [1], в том числе, и на минимальных средах [2]. Вместе с тем, особенности регуляции синтеза феназиновых антибиотиков у данных бактерий, а также у представителей других родов, способных к продукции феназинов, слабо изучены. Продемонстрировано, что у представителей рода *Pseudomonas* контроль синтеза феназинов коррелирует с регуляцией различных типов их подвижности. В управлении генами, отвечающими за эти процессы, задействованы зависимые от плотности бактерий системы регуляции транскрипции (SQ-системы) и транскрипционный фактор – PsgA [3, 4]. Особое значение сведения о подвижности бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* имеет при создании на их основе эффективных биопестицидных препаратов. Миграционные движения бактерий позволяют им распространяться по поверхности растений и занимать свою экологическую нишу, например, ризосферу, что напрямую связано с их способностью эффективно подавлять развитие патогенов.

Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* могут «передвигаться» различными способами. В жидкой среде индивидуальные клетки способны к свимминг-миграции (от англ. swimming), перемещаясь при помощи жгутика [5]. На влажной поверхности данные бактерии могут перемещаться рывкообразными движениями (от англ. twitching) при помощи пилей IV-го типа [6]. При культивировании на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри данный тип перемещения обнаруживают в пространстве между слоем агара и дном чашки. На поверхности агаризованной среды (0,5-1% агара) бактерии способны к быстрому движению по типу роения, осуществляемому при участии жгутиков и пилей IV-го типа [5]. Этот тип движения называется сворминг-миграцией (от англ. swarming). Еще один тип подвижности – скольжение. Пили и жгутики в нем участия не принимают. Это пассивная форма движения клеток, позволяющая бактериям распространяться благодаря наличию сурфактантов, изменяющих поверхностное натяжение жидкости [5].

Целью данной работы являлось изучение типов подвижности, присущих штамму *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162, способному к синтезу феназиновых антибиотиков.

Методы исследования

Объектом исследования являлся штамм *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162. Для получения ночной культуры (НК) клетки бактерий помещали в питательный бульон, приготовленный на основе сухого концентрата, производства фирмы ФГУП «НПО Микроген» (Махачкала) и инкубировали 16 ч. с непрерывным покачиванием (150 rpm) при температуре 28°C.

Способность к свимминг-миграции изучали с использованием 0,3% полноценной агаризованной среды, в которую с помощью прокола стерильной зубочисткой вносили ночной культуры бактерий [7].

Сворминг-миграцию изучали с использованием 0,5% и 1% полноценной агаризованной среды, куда с помощью прокола стерильным наконечником вносили 2 мкл ночной культуры бактерий [8].

Исследование способности бактерий к твитчинг-миграции проводили с использованием полноценной 1% агаризованной среды, куда с помощью прокола стерильной зубочисткой, вносили ночной культуры бактерий. Исследовали рост бактерий между агаром и чашкой Петри [9].

Оценку всех видов миграции проводили после 16-ти часовой инкубации или более при температуре 28°C.

Способность бактерий к синтезу сурфактантов определяли с помощью метода капель, предложенного Jain с соавторами [10]. Метод заключается в нанесении образцов на смазанную маслом пластиковую подложку имеющую, какую-либо выступающий узор, не позволяющий каплям перемещаться по жирной поверхности. Для приготовления образцов клетки из края и центральной области сворминг-мигрирующей колонии помещали в разные эппендорфы и ресуспендировали в 150 мкл дистиллированной воды, после чего клетки осаждали центрифугированием 8000g в течение 2-х минут. Центрифугирование ночной культуры проводилось при тех же условиях. Для эксперимента использовали супернатант. В качестве контролей использовали дистиллированную воду и 10% раствор СДС (анионный сурфактант), подкрашенный 1 мкл 0,025% раствора бромфенолового синего. Объем всех жидкостей наносимых на подложку составлял 100 мкл [10].

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее слабо изученных типов подвижности у бактерий рода *Pseudomonas* является твитчинг-миграция. Этот тип движения осуществляется с помощью пилей IV-го типа, которые у разных видов бактерий способны выполнять дополнительные функции: отвечать за прикрепление к поверхности, поглощение ДНК, секрецию белков, межклеточную агрегацию и даже транспорт электронов на внеклеточные акцепторы [11]. Выделяют несколько разновидностей пилей IV типа в зависимости от строения основной субъединицы белка пилина, входящего в их состав. IVa пили – широко распространенный подтип с относительно коротким консервативным N-концевым гидрофобным участком пилина. IVb представляет собой более гетерогенный подтип с длинным N-концевым гидрофобным участком пилина. Однако среди пилей IVb подтипа выделяют достаточно однородный монофилетический класс, называемый Tad или Flp (от англ. tight adherence pili), субъединица пиллина в котором значительно меньше по размерам (около 7-8 кДа), тогда как для большинства пилей IVa и IVb подтипов данный показатель составляет 15-20 кДа. Иногда пили архебактерий выделяют в третий подтип IVc. Роли пилей разных подтипов также отличаются: IVa участвуют в адгезии и движении клеток, тогда как IVb необходимы для клеточной агрегации и адгезии, но не связаны с подвижностью клеток [11; 12]. Расположение пилей на поверхности клетки может отличаться у разных видов. Известно, что у представителей рода *Pseudomonas*, клетки которых имеют палочковидную форму, пили IV-го типа могут быть локализованы на одном или обоих полюсах клетки, либо вообще отсутствовать [5]. В связи с полярным расположением пилей IV типа бактерии рода *Pseudomonas* могут передвигаться несколькими способами: ползать (от англ. crawling), «ходить» (от англ. walking), перемещаться по типу рогатки (от англ. slingshot). В первых двух случаях отличие заключается в ориентации клетки относительно поверхности перемещения – параллельной и перпендикулярной, соответственно. Третий способ описывается как внезапное быстрое боковое движение «отстающего» полюса ползущей клетки, которое приводит к смене направления движения [5; 12]. На твитчинг-миграцию могут оказывать влияние как физические, например вязкость поверхности, так и химические

параметры среды (наличие ионов железа, кальция, фосфатов). Существуют и внутриклеточные системы регуляции этого типа подвижности. Условно их можно подразделить на 2-компонентные системы, QS-системы (Quorum sensing), регуляторы хемотаксиса, различные транскрипционные факторы и циклические нуклеотиды (цАМФ и ц-ди-ГМФ) [12; 13].

Один из самых интересных типов движения – это сворминг-миграция. Данный тип подвижности требует специальной подготовки к нему бактериальных клеток, выражающейся в изменении уровня транскрипции и трансляции большого числа генов, а также достижении определенной плотности бактериальной культуры, что является необходимым условием для активации QS-системы, ответственной за синтез сурфактантов [14, 15].

Выделяют несколько особенностей, характерных для данного типа движения.

1) Увеличение количества жгутиков у бактерий, находящихся на краю колонии. Например, бактерии *P. aeruginosa*, имеющие один полярный жгутик, в условиях роения могут увеличивать их количество до двух [5]. Также предполагается, что увеличивается мощность мотора жгутика [16].

2) В движении одновременно участвует большое количество клеток. Множество бактерий перемещаются в рафте – своеобразном вихревом потоке, состоящем из параллельно расположенных плотно прилегающих клеток. Отставшие от рафта бактерии утрачивают подвижность [5; 16].

3) Синтез и выделение бактериальными клетками осмопротекторов (пролина и глутамина у *P. aeruginosa* [16]), позволяющих увеличить количество свободной жидкости, окружающей клетку. Для снижения поверхностного натяжения окружающей бактериальную клетку жидкости осуществляется синтез сурфактантов. У *Pseudomonas* эту функцию выполняют рамнолипиды и 3-(3-гидроксиалкоаноилокси) алкановая кислота [5; 16].

4) Интересной особенностью клеток, движущихся при помощи сворминг-миграции, является их устойчивость к антибиотикам. Кроме того, чтобы начать движение по типу сворминг миграции клеткам необходимо некоторое время – период отставания, или lag фаза. Имеется предположение, что оно необходимо для синтеза сурфактантов и образования дополнительных жгутиков [5]. В регуляции данного типа движения задействовано большое количество генов. Наиболее важными являются гены, продукты которых управляют энергетическим метаболизмом, синтезом и работой жгутиков и пилей IV-го типа, биосинтезом сурфактантов, а также контролируют уровень ц-ди-ГМФ. Было показано, что у клеток *P. aeruginosa*, находящихся на краю колонии, перемещающейся сворминг-миграцией, по сравнению с клеткам, формирующими неподвижные колонии на более плотном агаре, изменяется активность 378 генов [15]. В настоящее время ведется активное изучение сворминг миграции. Уже открыты и требуют изучения множество транскрипционных и посттранскрипционных регуляторов данного типа движения [17, 18]. Способность к такому движению является одним из факторов вирулентности. По-видимому, это сложное движение играет важную роль в распространении бактерий, будь то почва, поверхность растений или ткани животных [5].

В связи со всем вышесказанным особый интерес представляет изучение типов подвижности, характерных для бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162, способного к синтезу феназиновых соединений. Данный штамм и полученные на его основе мутантные варианты являются основой некоторых биопестицидных препаратов, используемых в настоящее время в Республике Беларусь [19]. Изучение типов миграционных движений позволит лучше понять природу антимикробной и ростостимулирующей активности данных бактерий, что даст возможность совершенствовать уже существующие биопестицидные препараты и разрабатывать новые более эффективные их аналоги.

Исследование подвижности бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162 показало, что они способны ко всем типам движения, характерным для псевдомонад. Получены данные о пределах области, в которых клетки способны распространиться в течение 16 часов в

полужидкой агаризованной среде (0,3% агара, свимминг-миграция) (I), на поверхности 0,5 % агара (сворминг-миграция) (II) и между агаром (1%) и стеклом чашки Петри (твитчинг-миграция) (III) (Таблица 1).

Таблица 1 – Анализ подвижности штамма *Pseudomonas chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162.

Тип движения	R, см	D, см
I Свимминг-миграция	2.1±0.3	4.03±0.55
II Сворминг-миграция	1.67±0.21	3,07±0.23
III Твитчинг-миграция	1.5±0.35	2.77±0.55

Примечание: R – радиус колонии, D – диаметр колонии.

Продемонстрировано, что бактерии *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162 обладают выраженной подвижностью твитчинг-типа (рисунок 1), что, по-видимому, позволяет им успешно колонизировать ризосферу растений.

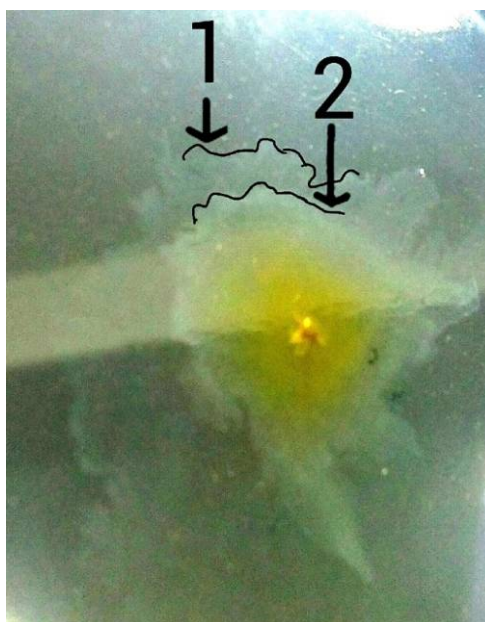


Рисунок 1 – Колонии бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162 на агаризованной среде.

Примечание: 1 – колония твитчинг-мигрирующих бактерий между агаризованным слоем и стеклом. 2 – колония сворминг-мигрирующих бактерий на поверхности 1% агара.

Известно, что перед началом сворминг-миграции при переносе бактерий из жидкой среды на поверхность агаризованной среды, наблюдается период отставания, или lag-фаза [5]. Для определения времени нахождения штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162 в lag-фазе, был осуществлен мониторинг роста бактериальной культуры после инокуляции в агаризованную среду в течение 14 ч. Продемонстрировано, что период отставания у данного штамма составляет 11 ч.

Показано, что для разных видов бактерий характерно образование различных типов колоний, образующихся при сворминг-миграции. Kearns выделяет пять типов «рисунков» колоний бактерий на агаризованной среде: совершенно ровный, Bull's eye – в виде концентрических кругов, дендритный, вихревой, а также колонии не мигрирующих бактерий [5]. Для изучаемых нами бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162 характерен дендритный тип колоний, образующихся в результате сворминг-миграции (рисунок 2).

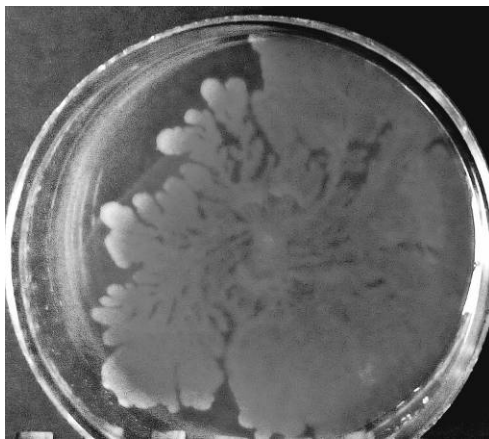


Рисунок 2 – Морфология колонии *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 при сворминг-миграции после 20 ч. культивирования на плотной агаризованной среде (1%)

Интенсивность распространения бактерий при сворминг-миграции отличается на агаризованной среде разной плотности (рисунок 3).

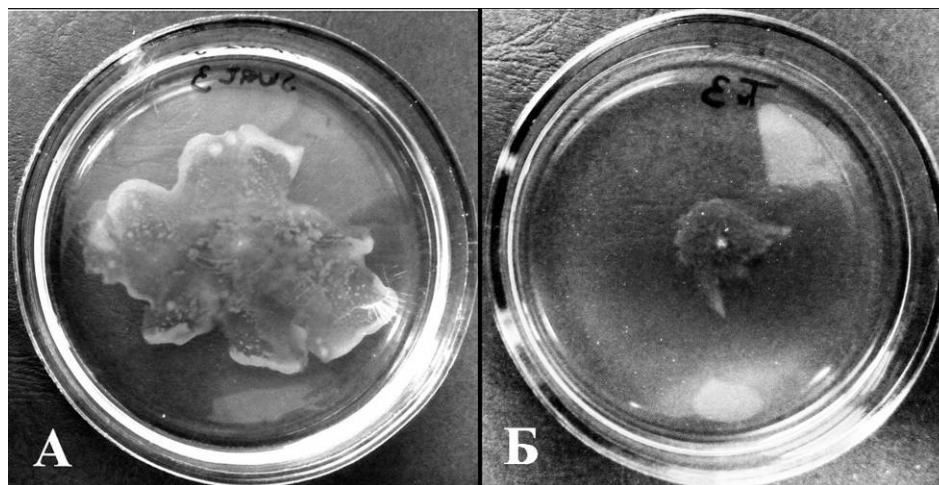


Рисунок 3 – Сворминг-миграция бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 на агаризованной среде разной плотности: А – 0,5%, Б – 1%

Рост бактерий представленных на рисунке 2 осуществлялся в течение 20 часов. На этом рисунке видно, что размеры колонии бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162, распространяющейся на менее плотной среде (А), значительно больше, чем колонии на плотной среде (Б). Это объясняется тем, что для перемещения с помощью сворминг-миграции клетки должны находиться в слое воды и на более плотном агаре притянуть воду с помощью осмотических агентов сложнее, следовательно, движение затрудняется [16].

Обязательным условием для нормальной сворминг-миграции является способность бактерий к синтезу сурфактантов [20], в связи с этим были проведены исследования способности штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 синтезировать поверхностно активные вещества. В качестве исследуемых образцов использовались супернатант ночной культуру бактерий штамма B-162, а также супернатант взвеси клеток этого же штамма, взятых из центральной и краевой областей колоний, культивируемых на плотной агаризованной среде. Последние два образца подвергались исследованию, так как существуют литературные данные, что морфология и физиологические особенности клеток в центральной и краевой зонах колоний могут существенно различаться [15].

Известно, что жидкость, не содержащая каких-либо поверхностно-активных веществ, например, вода, при нанесении на подложку будет сохранять свою форму в течение

длительного времени, а при содержании в жидкости сурфактантов – в течение 1-2 мин капля потеряют форму и растечется по поверхности, как это произошло с контрольным образцом, содержащим 10% раствор СДС. На рисунке 4 видно, что капли супернатанта ночной культуры бактерий *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162, а также супернатантов клеток бактерий из края и центральный области не способны сохранять свою форму, что указывает на наличие сурфактантов в жидкости. Можно сделать вывод, что изучаемые нами бактерии способны к синтезу сурфактантов как при сворминг-миграции, так и при культивировании в жидкой среде.

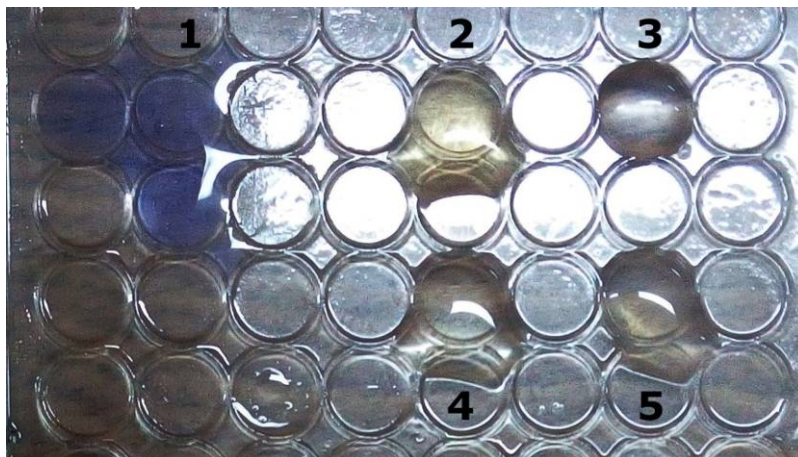


Рисунок 4 – Наличие сурфактантов в супернатанте бактериальной культуры *Pseudomonas chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162.

Примечание: 1 – 10% SDS 2 – Супернатант ночной культуры. 3 – Дистиллированная вода. 4 – Смыв с клеток находящихся на краю сворминг-мигрирующей колонии. 5 – Смыв с клеток находящихся в центре сворминг-мигрирующей колонии.

Выводы

Клетки штамма *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* В-162 способны перемещаться, используя три основных типа движения: свимминг-миграцию в жидкой среде, сворминг- и твитчинг-миграцию на твердых средах. Данные бактерии синтезируют поверхностно-активные вещества – сурфактанты.

Список литературы

1. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca* – продуцентов антибиотиков феназинового ряда / Е.Г. Веремеенко, М.Н. Федорович, И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2. – 2009. – № 2. – С. 44-48.
2. Веремеенко, Е.Г., Лысак В.В, Максимова Н.П. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca*, способных к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков при культивировании в минимальной среде / Е.Г. Веремеенко, В.В. Лысак, Н.П. Максимова // Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2. – 2010. – № 2. – С. 47-53.
3. Quorum Sensing and Phenazines are Involved in Biofilm Formation by *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* Strain 30-84 / V.S.R.K. Maddula [et al.] // Microbial ecology. – 2006. – Vol.52. – P. 289–301
4. Induction by Cationic Antimicrobial Peptides and Involvement in Intrinsic Polymyxin and Antimicrobial Peptide Resistance, Biofilm Formation, and Swarming Motility of PsaA in *Pseudomonas aeruginosa* / J.W. Gooderham [et al.] // J. of Bacteriology. – 2008. – V. 190. – P. 5624–5634
5. Kearns, D. B. A field guide to bacterial swarming motility / D. B. Kearns // Nat Rev Microbiol. – 2010. – Vol. 8, №9. – P. 634–644

6. Maier, B., Wong G.C. How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces / B. Maier, G.C. Wong // Trends Microbiol. – 2015. – Vol. 23. – Issue 12 – P 775-788
7. Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113 / A. Navazo [et al] // Microbial Biotechnology. – 2009. – Vol.2, №4. – P.489–498
8. Kinscherf, T. G., Willis D. K. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a Requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but Not the Acyl-Homoserine Lactone Biosynthetic Gene *ahlI* / T.G. Kinscherf., D. K. Willis // J. of Bacteriology. – 1999. – V. 181, №13. – P. 4133–4136
9. Semmler, A. B. T., Whitchurch, C. B., Mattick, J. S. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* / A. B. T. Semmler, C. B. Whitchurch, J. S. Mattick // Microbiology. – 1999. – Vol. 145. – P.2863-2873
10. A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms / D.K. Jain [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 1991. – Vol. 13 – P.271-279
11. Berry, J. L., Pelicic, V. Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives / J. L. Berry V. Pelicic // FEMS Microbiology Reviews. – 2015. – Vol.39. – P.134–154
12. Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action / L.L. Burrows // Annu. Rev. Microbiol. – 2012. – Vol.66. – P.493-520
13. Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function / T.L. Leighton [et al.] // Environ Microbiol. – 2015. – Vol.17, №11. – P.4148-41634
14. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Complex Adaptation Leading to Increased Production of Virulence Factors and Antibiotic Resistance / J. Overhage [et al] // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190, №8. – P.2671–2679
15. Tremblay, J., Déziel, E. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility / J. Tremblay, E. Déziel // BMC Genomics. – 2010. – Vol.11, №:587. – P.1-15
16. Partridge, J. D., Harshey, R. M. Swarming: Flexible Roaming Plans / J. D. Partridge, R.M. Harshey // J. Bacteriol. – 2013. – Vol. 195, №5. – P.909-918
17. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Controlled by a Broad Spectrum of Transcriptional Regulators, Including MetR / A. T. Y. Yeung [et al] // J. Bacteriol. – 2009. – Vol. 191, №18. – P.5592–5602
18. RpoS-dependent sRNA RgsA regulates Fis and AcpP in *Pseudomonas aeruginosa* / P Lu [et al] // Mol Microbiol. - 2016. – Vol. 179. –P. 557–562
19. Веремеенко, Е.Г., Максимова, Н.П. Новые подходы создания биопестицидных препаратов на основе ризосферных бактерий *Pseudomonas*, перспективных для биотехнологического использования / Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова // Научный потенциал молодежи - будущему Беларуси: материалы III Междунар. молодежной науч.-практ. конф., Пинск, 27 марта 2009 г. / УО «Полесский государственный ун-т, Национальный банк Республики Беларусь; редкол.: К.К Шебеко [и др.]. – Пинск, 2009. – С. 184-185.
20. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili / T. Kohler [et al] // J. Bacteriol. – 2000. Vol. 182. №21. –P. 5990-5996

STUDY OF DIFFERENT TYPES OF MOTILITY OF BACTERIA

PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SSP. *AURANTIACA* B-162

Y.A. Shilova, E.G. Veremeenko, N.P. Maximova

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

e-mail: VeremeenkoKatya@yandex.ru

The ability to the motility of bacteria *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 has been researched. It is shown that the bacteria can motile by swimming, swarming and twitching. It was demonstrated that *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 were capable to produce surface active agents – surfactants.