

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

# **ВЫЖИВАЕМОСТЬ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* В КЛЕТКАХ РЕСНИЧНОЙ ИНFUZОРИИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*: ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМА НА ИНЦИСТИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ТЕТРАХИМЕН**

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

**Цель** исследования заключалась в моделировании взаимодействия *Burkholderia pseudomallei* с *Tetrahymena pyriformis* *in vitro* и изучении изменений в популяционном составе простейших при совместном культивировании с микроорганизмом. **Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *B. pseudomallei* 110, C141, 57576, 107, отличающиеся по вирулентности для мышей линии BALB/c. Аксеническую культуру *T. pyriformis* выращивали в LB-бульоне при температуре 28 °С. Буркгольдерии соединяли с тетрахименами в соотношении 100:1. Сокультуры инкубировали при температуре 28 °С в LB на протяжении срока наблюдения. Образцы сокультур просматривали при световой микроскопии, оценивая изменения в популяционном составе тетрахимен по количественному соотношению трофозоитов и цист. Для определения динамики размножения культур *B. pseudomallei*, ассоциированных с *T. pyriformis*, из сокультур ежедневно производили высев на плотную питательную среду для подсчета выросших колоний. **Результаты и выводы.** В ассоциации с тетрахименами *B. pseudomallei* поглощаются клетками простейших, размножаются в них и индуцирует инцистирующую активность тетрахимен. При этом вирулентный штамм *B. pseudomallei* 110 осуществляет переход клеток *T. pyriformis* в состояние цист на 2–4-е сутки и их полное разрушение на 7–8-е сутки. Авирулентный штамм *B. pseudomallei* 107 вызывает полное инцистирование простейших не ранее 7 суток, и значительная часть цист остается неразрушенной на 10-е сутки. Динамика роста *B. pseudomallei* в сокультуре с *T. pyriformis* характеризуется в первые сутки отчетливым снижением количества жизнеспособных клеток, которое через 24 ч возрастает и постепенно достигает показателей, близких к исходным. Кривые подъема концентрации микроорганизмов зависят от вирулентности штамма: максимальное размножение культуры *B. pseudomallei* 110 наблюдается спустя 48 ч, тогда как для штамма *B. pseudomallei* 107 это время составляет не менее 7–8 сут.

**Ключевые слова:** *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, мелиоидоз, вирулентность, внутриклеточное выживание, инцистирование.

Корреспондирующий автор: Король Екатерина Васильевна, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

E.V.Korol', L.K.Merina, E.V.Shubnikova, O.A.Merina, T.V.Senina, N.G.Plekhanova

## **Survival of *Burkholderia pseudomallei* in cells of *Tetrahymena pyriformis* Ciliate Infuzorian: Effect on *Tetrahymena* Encystment Activity**

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

**Objective** of the study was to model the interaction of *Burkholderia pseudomallei* with *Tetrahymena pyriformis* *in vitro* and investigate the changes in the population composition of the protozoa when co-cultured with a microorganism. **Materials and methods.** *B. pseudomallei* 110, C141, 57576, 107 strains differing in virulence for BALB/c mice were used. The axenic culture of *T. pyriformis* was incubated with microorganisms in 100 to 1 ratio, at 28 °C, in LB. Samples of co-cultures were examined using light microscopy, by counting the number of trophozoites and cysts in the population. Dynamics of multiplication of *B. pseudomallei* cultures associated with *T. pyriformis* was determined through seeding bacteria on a dense nutrient medium to count the grown colonies. **Results and conclusions.** *B. pseudomallei* in association with *T. pyriformis* is ingested by protozoan cells; it multiplies in them and stimulates protozoa encystment. Hereby virulent strain *B. pseudomallei* 110 induces encystment of *T. pyriformis* on days 2–4 and complete cell destruction within 7–8 days. Avirulent strain, *B. pseudomallei* 107, induces full encystment on day 7; significant part of the cysts remains intact on day 10. Dynamics of *B. pseudomallei* growth, co-cultured with *T. pyriformis* is characterized on day 1 by distinct decrease in the number of viable bacterial cells and increase in it within following 24 hours. Bacteria concentration curves depend on the virulence of the strain: maximum level of *B. pseudomallei* 110 replication is observed after 48 hours, while that of *B. pseudomallei* 107 – not less than after 7–8 days.

**Key words:** *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, melioidosis, virulence, intracellular survival, encystment.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Ekaterina V. Korol', e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

**Citation:** Korol' E.V., Merina L.K., Shubnikova E.V., Merina O.A., Senina T.V., Plekhanova N.G. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in cells of *Tetrahymena pyriformis* Ciliate Infuzorian: Effect on *Tetrahymena* Encystment Activity. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 3:49–52. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-49-52

*Burkholderia pseudomallei* – возбудитель мелиоидоза – факультативный внутриклеточный патоген человека и многочисленных видов животных [3, 8]. Он может выживать и размножаться в фагоцитарных и нефагоцитарных клетках человека *in vitro*, что рассматривается в качестве главного фактора длитель-

ного персистирования возбудителя в макроорганизме, приводящего к формированию латентных и хронических форм инфекции [7].

В эндемичных регионах естественной средой обитания *B. pseudomallei* являются почвенные, водные экосистемы и ризосфера растений [2, 6].

В настоящее время сохранение *B. pseudomallei* во внешней среде связывают со способностью образовывать биопленки, а также инвазировать свободноживущие в почве и воде амёбы (*Acanthamoeba spp.*) и персистировать в них [5, 6]. В сокультуре с *Acanthamoeba spp.* буркхольдерии, интернированные простейшими, остаются жизнеспособными в амёбных вакуолях, размножаются в них, а после разрушения трофozoитов элиминируются в окружающее пространство [5].

Помимо амёб в процессах внутриклеточного выживания и распространения различных патогенных микроорганизмов принимают участие цилиарные инфузории вида *Tetrahymena pyriformis*. Отмечено, что бактерии разных видов (*Legionella pneumophila*, *Mycobacteria spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*) обладают способностью избегать переваривания фагоцитарными вакуолями тетрахимен, сохраняться и распространяться во внешней среде в экскретируемом остатке вакуолей или в цистах [1, 9, 10].

Особенности взаимодействия *B. pseudomallei* с *T. pyriformis* не описаны. *T. pyriformis* является убиквитарным видом, обычным для среды обитания возбудителя мелиоидоза и может представлять интерес для изучения процессов его внутриклеточного выживания как в объектах внешней среды, так и в макроорганизме.

Цель данной работы заключалась в моделировании взаимодействия *B. pseudomallei* с *T. pyriformis* *in vitro* и изучении изменений в популяционном составе простейших при совместном культивировании с микроорганизмом.

### Материалы и методы

Аксеническая культура *T. pyriformis* получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Тетрахимены выращивали в LB-бульоне (HiMedia) при температуре 28 °C.

В работе использовали дикие штаммы *B. pseudomallei* 110, C141, 57576, 107, отличающиеся по вирулентности для мышей линии BALB/c ( $LD_{50} - 1 \cdot 10^3$ ,  $2,5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^8$  м.к. соответственно), а также штамм *B. pseudomallei* 110 PAS, вирулентность которого была повышена путем пассирования на золотистых хомячках ( $LD_{50}$  для хомячков 5 м.к.).

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

Сокультуры микроорганизма и тетрахимен инкубировали в климатической камере (Сапуо, Япония) при температуре 28 °C на протяжении срока наблюдения (от 24 ч до 10–15 сут). Образцы сокультур после предварительного обеззараживания в течение 1 ч 10 % формалином просматривали в камере Горяева при световой микроскопии (микроскоп Lomo Micmed 6, увеличение  $\times 400$ ), оценивая

изменения в популяционном составе тетрахимен по количественному соотношению трофozoитов и цист. Морфологические изменения клеток *T. pyriformis* визуализировали на экране компьютера с использованием программы Scope Photo.

Для определения динамики размножения культур *B. pseudomallei*, ассоциированных с *T. pyriformis*, из сокультур ежедневно производили высев на плотную питательную среду LB-агар для подсчета выросших колоний. Параллельно определяли динамику размножения культур *B. pseudomallei* в LB-бульоне.

Для статистической обработки полученных данных использовали методы определения средних величин и доверительных границ к ним ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Для первоначальной характеристики морфологических изменений клеток тетрахимен в сокультуре с буркхольдериями использовали штамм *B. pseudomallei* 110. Как показано на рис. 1, при совместном инкубировании микроорганизма с тетрахименами в течение 24 ч в трофozoитах наблюдалось появление фагоцитарных вакуолей (рис. 1, Б). Через 48–72 ч выявлялись существенно увеличенные в размере клетки тетрахимен, содержащие множество вакуолей и расположенные в них, а также вне клеток трофozoитов, микроорганизмы (рис. 1, В). На 2–е–3–и сутки в сокультуре с буркхольдериями тетрахимены начинали образовывать цисты (рис. 1, Г), которые в течение последующих дней подвергались разрушению.

Дальнейшее наблюдение за изменениями в популяционном составе тетрахимен в сокультуре с *B. pseudomallei* показало, что присутствие микроорганизма ограничивает размножение трофozoитов и оказывает влияние на их инцистирующую активность. Динамика отмеченных изменений имеет различия, зависящие от штамма.

Так, в сокультуре с *B. pseudomallei* 110 в течение

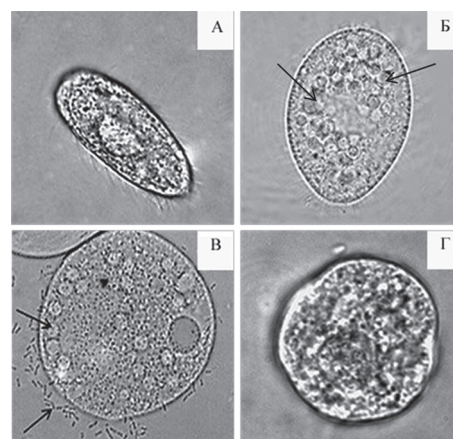


Рис. 1. Морфология клеток *T. pyriformis*, ассоциированных с *B. pseudomallei* 110:

А – интактный трофozoит *T. pyriformis*; Б – трофozoит в сокультуре с *B. pseudomallei* 110 через 24 ч совместного культивирования в LB-бульоне при 28 °C; В – трофozoит в сокультуре с *B. pseudomallei* 110 через 48–72 ч, стрелками показаны вакуоли, а также внутри и внеклеточно расположенные бактерии; Г – циста *T. pyriformis*. Световая микроскопия, увеличение  $\times 400$

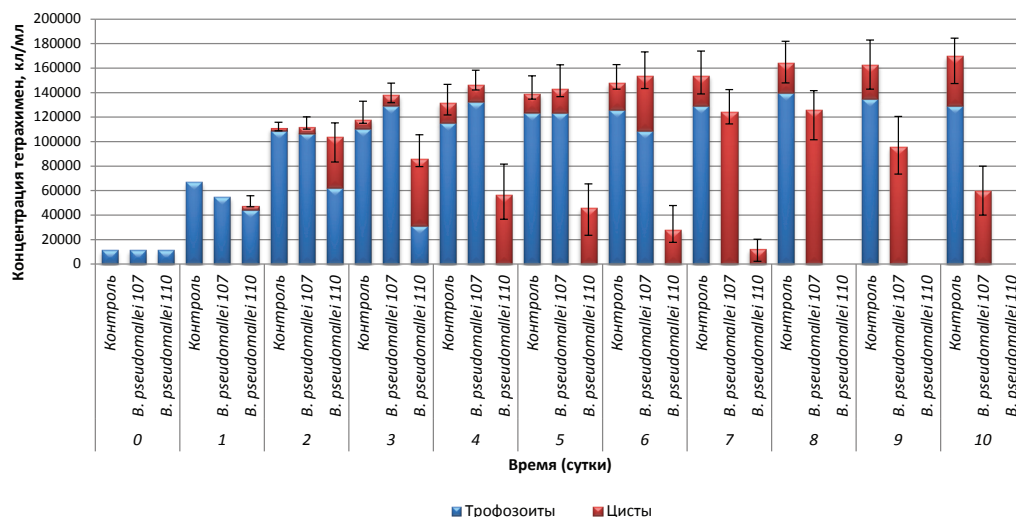


Рис. 2. Динамика образования цист клетками тетрахи-мен в сокультуре со штамма-ми *B. pseudomallei*

ние 24–48 ч наблюдается размножение трофозоитов, менее интенсивное, чем в контроле, но уже на вторые сутки часть из них (40 %) подвергается инцистированию, на третьи – количество образовавшихся цист при взаимодействии с этим штаммом достигает максимума (рис. 2). Далее происходит постепенное исчезновение трофозоитов из сокультуры и снижение количества выявляемых цист, вызванное их разрушением. На 7–8-е сутки в образцах тетрахи-мен с *B. pseudomallei* 110 определяются только разрушающиеся цисты и их фрагменты.

Пассированный в организме золотистых хомячков штамм *B. pseudomallei* 110 PAS проявлял более выраженное действие на жизнедеятельность тетрахи-мен, индуцируя инцистирование основной массы клеток (более 70 %) уже на вторые сутки.

В отличие от них, штамм *B. pseudomallei* 107, имевший существенно сниженную вирулентность для экспериментальных животных, в ассоциации с тетрахи-менами вызывал полное инцистирование простейших не ранее 7 суток, значительная часть образовавшихся цист оставалась неразрушенной на 9–10-е сутки и сохранялась в последующие 5 сут (рис. 2).

Что касается влияния двух других штаммов *B. pseudomallei* С 141 и 57576, то в сравнении с *B. pseudomallei* 110, оно проявлялось в более замедленной динамике инцистирования *T. pyriformis*. На 4–5-е сутки в сокультуре с ними можно было наблюдать присутствующие в различном количестве трофозоиты и цисты, интенсивное разрушение которых отмечалось не ранее, чем через 8–10 сут.

При этом, как показано на рис. 2, в контрольных образцах *T. pyriformis* в LB-бульоне при 28 °С в течение 10 сут происходило активное размножение трофозоитов (от 10000 до 140000 кл/мл), которые постепенно подвергались спонтанному инцистированию. Однако и после 30 сут (срок наблюдения) общее количество клеток в культуре *T. pyriformis* составляло более 150000 кл/мл, из них около 60 % приходилось на долю цист.

Определение динамики роста культур *B. pseudomallei* в LB-бульоне обнаружило, что кривые размножения микроорганизма в сокультуре с *T. pyriformis*

характеризуются у всех исследованных штаммов отчетливым снижением количества жизнеспособных клеток (на два порядка и более), наблюдающимся в первые сутки. Но уже спустя 24 ч концентрация бактерий начинает возрастать и постепенно достигает показателей, близких к исходным ( $\sim 10^6$  м.к./мл). Кривые подъема концентрации имеют штаммовые различия: размножение *B. pseudomallei* 110 достигает максимума через 48 ч, тогда как для штамма *B. pseudomallei* 107 это время составляет не менее 6–7 сут (рис. 3). Следует отметить, что проявление инцистирующей активности штамма в отношении тетрахи-мен находится в соответствии со временем его размножения в клетках простейших: штамм, который с наибольшей скоростью размножается внутри *T. pyriformis* (*B. pseudomallei* 110), вызывает их инцистирование в более короткий срок, чем штамм, характеризующийся меньшей скоростью размножения (*B. pseudomallei* 107).

Таким образом, как следует из приведенных данных, *B. pseudomallei* при взаимодействии с *T. pyriformis* проявляет резистентность к фагоцитарной активности их вакуолей. После поглощения клетками тетрахи-мен происходит гибель значительной части микроорганизма, но оставшиеся бактерии, устойчивые к фагоцитозу, восстанавливают свою численность в различные промежутки времени в зависимости от штамма. Первоначальное переваривание части бактерий позволяет размножиться трофозоитам, однако начавшееся внутриклеточное размножение микроорганизма подавляет жизнеспособность трофозоитов и ускоряет их инцистирование по сравнению со спонтанным цистообразованием. Очевидно, что избегание фагоцитарной активности тетрахи-мен и ускорение их инцистирования в гораздо большей степени выражено у вирулентного штамма *B. pseudomallei* 110 по сравнению с менее вирулентными культурами, особенно с *B. pseudomallei* 107.

Способность к выживанию возбудителя мелиоидоза в фагоцитарных вакуолях простейших, установленная нами в ассоциации с *T. pyriformis*, отмечена ранее в работе Inglis T.J. et al. при взаимодействии этого микроорганизма с *Acanthamoeba* spp. [5]. В отличие от



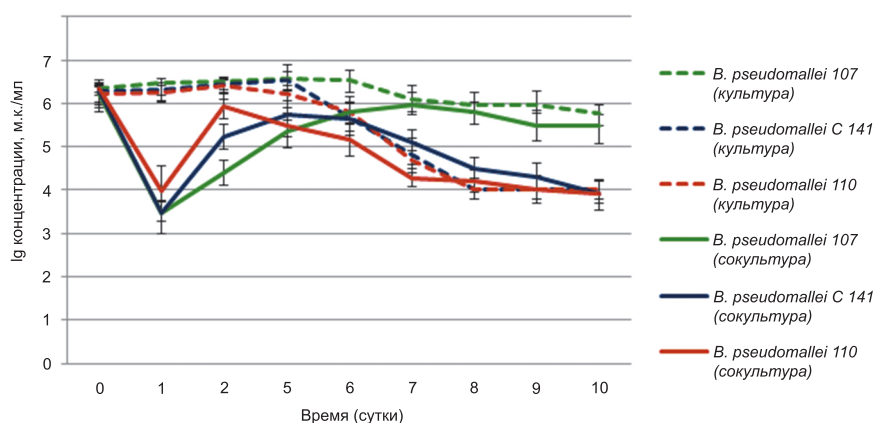


Рис. 3. Динамика размножения штаммов *B. pseudomallei* в контроле и в сокультуре с *T. pyriformis*

данных, представленных этими авторами, мы наблюдали другой характер фагоцитоза, связанный с особенностями физиологии самой модели, которая спонтанно поглощает бактерии, а не захватывает их путем coiling-фагоцитоза. Кроме того, в цитируемой работе не установлено влияние *B. pseudomallei* на цистообразование амёб. Результатом их взаимодействия, как показано Inglis T.J. *et al.*, являлось наступающее после поглощения *B. pseudomallei* разрушение трофозоитов и выход бактерий во внешнюю среду.

Индуктирующее влияние на инцистирование тетрахимен описано Pushkareva V.I. *et al.* при взаимодействии с простейшими этого вида *Listeria monocytogenes*. Показано также, что устойчивые к фагоцитозу листерии оставались жизнеспособными в цистах на протяжении 14 сут, сохраняя в них основные биологические свойства [9]. Как следует из наших данных, продолжительность сохранения цист в сокультуре *B. pseudomallei* с тетрахименами зависела от вирулентности штамма, но, в конечном итоге, даже при взаимодействии со слабовирулентным штаммом, каким является *B. pseudomallei* 107, наступало их разрушение и выход микроорганизма во внешнюю среду.

В общем виде эффект влияния *B. pseudomallei* на инцистирование *T. pyriformis* может быть связан с цитотоксическим действием на клетки тетрахимен продуктов размножения бактерий. В работе Pushkareva V.I. *et al.* непосредственная роль в этом процессе отводится основному фактору вирулентности *L. monocytogenes* – листериолизину (LLO), обладающему гемолитической активностью [9]. Известно, что возбудитель мелиоидоза продуцирует различные токсические факторы (протеазы, гемолизины, фосфолипазы), значение которых в реализации патогенности до конца не изучено [4]. С этой точки зрения оценить их роль как факторов вирулентности и одновременно факторов, индуцирующих инцистирование тетрахимен, не представляется возможным. Тем не менее, вполне возможно, что быстро размножающиеся вирулентные штаммы *B. pseudomallei*, которые в короткий срок вызывали инцистирование тетрахимен, внутриклеточно продуцировали в большом количестве токсические вещества, способные оказывать подавляющее действие на жизнедеятельность простейших, тогда как эти же самые вещества

в макроорганизме других хозяев могли не иметь решающего значения для вирулентности.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### References / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berk S.G., Faulkner G., Garduno E., Joy M.C., Ortiz-Jimenez M.A., Garduno R.A. Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. does not require bacterial replication and depends on a dot/Icm-mediated survival mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74:2187–99. DOI: 10.1128/AEM.01214-07.
2. Chen Y.S., Lin H.H., Mu J.J., Chiang C.S., Chen C.H., Buu L.M., Lin Y.E., Chen Y.L. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1432–4. DOI: 10.1128/JCM.01720-09.
3. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
4. Galyshev E.E., Brett P.J., DeShazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64:495–517. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134030.
5. Inglis T.J., Rigby P., Robertson T.A., Dutton N.S., Henderson M., Chang B.J. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* spp. results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. *Infect. Immun.* 2000; 68(3):1681–6. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1681-1686.2000.
6. Inglis T.J., Sagripanti J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:6865–75. DOI: 10.1128/AEM.01036-06.
7. Jones A.L., Beveridge T.J., Woods D.E. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 1996; 64:782–90.
8. Limmathurotsakul D., Thammasart S., Warrasuth N., Thapanagulak P., Jatapai A., Pengreungrojanachai V., Anun S., Joraka W., Thongkamkoon P., Saiyen P., Wongratanchewin S., Day N.P., Peacock S.J. Melioidosis in animals, Thailand, 2006–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2):325–7. DOI: 10.3201/eid1802.111347.
9. 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; 10:26. DOI: 10.1186/1471-2180-10-26.
10. Strahl E.D., Gillaspie G.E., Falkinham J.O. Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:4432–9. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4432-4439.2001.

#### Authors:

Korol' E.V., Merinova L.K., Shubnikova E.V., Merinova O.A., Senina T.V., Plekhanova N.G. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

#### Об авторах:

Король Е.В., Меринова Л.К., Шубникова Е.В., Меринова О.А., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 16.06.17.