

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

МОРФОТИПЫ КУЛЬТУР *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*, ФОРМИРУЮЩИЕСЯ *IN VITRO* В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

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

Цель заключалась в определении разнообразия морфотипов, образующихся *in vitro* из исходного морфологического варианта *Burkholderia pseudomallei* 110 в условиях стрессового воздействия, и исследовании у них некоторых фенотипических свойств. **Материалы и методы.** В работе использован вирулентный штамм *B. pseudomallei* 110 австралийского серотипа. Культуры буркгольдерий соединяли с аксенической культурой *Tetrahymena pyriformis* в соотношении 100:1 в LB бульоне и стерильной речной воде и инкубировали при 28 °С; пассаж монокультур и культур в клетках тетрахимен повторяли с периодичностью 3–4 сут. Морфотипы идентифицировали на среде Эшдауна после культивирования 3–4 сут при 32 °С и классифицировали фотографии колоний, основываясь на схеме N.Chantratita *et al.* У всех морфотипов определяли активность внеклеточных ферментов и вирулентность на золотистых хомячках. **Результаты и выводы.** Идентифицировано семь морфотипов колоний *B. pseudomallei* 110. Четыре из них, обладавшие признаками морфотипов I, III, IV и VII, описанных N.Chantratita *et al.*, обозначены как Chl (Chantratita like variant). Исследование морфотипов в различных образцах монокультур и ассоциированных с *T. pyriformis* обнаружило их варьирование в зависимости от среды культивирования (LB бульон или вода), а также различное соотношение в отдельных пробах. Наибольшее количество морфологических вариантов (4 из 7) образовывалось при пассаже монокультур *B. pseudomallei* 110 в LB бульоне; в воде исходная культура почти целиком (95 %) трансформировалась в морфотип I Chl. В других условиях культивирования формировался доминирующий V морфотип, который при пассаже в клетках тетрахимен сочетался преимущественно с I Chl. Морфотипы отличались продукцией внеклеточных ферментов, подвижностью и снижением вирулентности.

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

Корреспондирующий автор: Мерина Людмила Константиновна, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

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

***Burkholderia pseudomallei* Morphotypes that Form *in vitro* under Stress Conditions**

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Objective of the study was to determine diversity of the morphotypes formed *in vitro* from the initial morphological variant of *B. pseudomallei* 110 under stressful conditions and to study some phenotypic characteristics of them. **Materials and methods.** Virulent strain *Burkholderia pseudomallei* 110 of Australian serotype was used. *Burkholderia* cultures were added to the axenic culture of *Tetrahymena pyriformis* in LB broth and sterile river water in the ratio of 100: 1 and incubated at 28 °C; the passage of monocultures and cultures in protozoa cells was repeated at intervals of 3–4 days. Morphotypes were identified on Ashdown's medium after cultivation for 3–4 days at 32 °C, photographs were analyzed based on classification of Chantratita *et al.* In all morphotypes the activity of extracellular enzymes and virulence were determined on the model of golden hamsters. **Results and conclusions.** Seven *B. pseudomallei* 110 colony morphotypes were identified. Four of them with characteristics of I, III, IV and VII morphotypes, described by Chantratita *et al.*, were named Chl (Chantratita like variant). The study of morphotypes in different samples revealed a variation in them, depending on the culture medium (LB broth or water), and their different ratios in individual samples. The greatest number of morphological variants (4 out of 7) was formed during the passage of the monocultures of *B. pseudomallei* 110 in LB broth; in water the initial culture was almost entirely (95 %) transformed into morphotype I Chl. Under other conditions of cultivation the dominant V morphotype was formed, and in the presence of protozoa it was combined predominantly with I Chl. Morphotypes differed in the production of extracellular enzymes, motility and reduced virulence.

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

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

Corresponding author: Ludmila K. Merina, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Merina L.K., Korol' E.V., Senina T.V., Merina O.A., Teteryatnikova N.N., Plekhanova N.G. *Burkholderia pseudomallei* Morphotypes that Form *in vitro* under Stress Conditions. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; 1:85–89. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-85-89

Способность культур возбудителя мелиоидоза образовывать на плотных питательных средах морфологические R-, S-, M-варианты колоний является известным свойством микроорганизма [7, 8].

В недавней работе N.Chantratita *et al.* [4] при исследовании клинических изолятов *Burkholderia pseudomallei* дифференцировали на среде Эшдауна семь отдельных морфотипов колоний. Образование

таких же морфотипов они наблюдали *in vitro* при воздействии на культуры некоторых стрессовых факторов (голодания, неоптимальной температуры выращивания, антибиотиков). По мнению авторов, идентифицированные ими морфотипы сформировались в процессе переключения доминирующего в клинических изолятах варианта, обозначенного как морфотип I [4].

В настоящее время высказывается предположение, что морфологическая вариабельность колоний является частью комплексного изменения фенотипов микроорганизма, связанного с приспособлением к окружающей среде, включая адаптацию в макрофагах и персистенцию в макроорганизме [4, 5, 9, 10]. Однако целостного представления о природе морфотипов, факторах их нестабильности, механизме переключения как способе образования наиболее адаптированных к тем или иным условиям форм, нет.

В данной работе мы исследовали морфологическую вариабельность культур штамма *B. pseudomallei* 110 после многократного пассажа в клетках *Tetrahymena pyriformis*, как биотическом объекте внешней среды, в LB бульоне и стерильной речной воде одновременно с инкубированием в этих же средах монокультур микроорганизма. Пассаж в клетках *T. pyriformis* в данном случае мы рассматривали как дополнительный фактор, способный оказать влияние на фенотипические свойства *B. pseudomallei* 110 в стрессовых условиях культивирования.

Цель работы заключалась в определении разнообразия морфотипов, образующихся *in vitro* из исходного морфологического варианта *B. pseudomallei* 110 в условиях выбранного нами стрессового воздействия и исследовании у них некоторых фенотипических свойств.

Материалы и методы

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

Культуры буркхольдерий выращивали на агаре 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 и воде. Сокультуры инкубировали в климатической камере («Sanyo», Япония) при температуре 28 °C.

Пассаж в клетках тетрахимен повторяли с периодичностью 3–4 сут: 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. Одновременно проводили пассаж в этих же средах планктонных монокультур микроорганизма.

Для идентификации морфотипов после 15 пассажей культуры из всех образцов высевали на среде Эшдауна [3], инкубировали их 3–4 сут при 32 °C; колонии фотографировали и анализировали полученные изображения. Морфотипы классифицировали, основываясь на схеме N.Chantratita *et al.* [4]. Видовую принадлежность культур определяли методом ПЦР [2].

У отдельных морфотипов исследовали активность внеклеточных ферментов на плотных питательных средах, содержащих необходимые субстраты: 1 % раствор «Skim milk» («HiMedia»), лецитин (100 мг на 100 мл среды), гемолизированную кровь (5 %) при определении протеазной, лецитиназной, гемолитической активности соответственно. Подвижность тестировали на среде Motility («HiMedia») с добавлением 1 % трифенилтетразолия хлорида (TTX).

Вирулентность определяли на золотистых хомячках при внутрибрюшинном заражении 24 ч культурами *B. pseudomallei* 110 в дозе $1 \cdot 10^2$ м.к. по динамике гибели животных в группах.

Результаты и обсуждение

Визуальный анализ фотографий колоний из различных образцов культур *B. pseudomallei* 110 позволил идентифицировать семь отдельных морфотипов. При этом четыре из них обладали идентификационными признаками морфотипов I, III, IV и VII, описанных N.Chantratita *et al.* [4], тогда как три других не имели сходства с ними. Учитывая это, мы сочли возможным в отношении сходных морфотипов сохранить классификационные номера, данные этими авторами, но ввести для них дополнительное обозначение Chl (Chantratita like variant). Морфотипам, имеющим отличительные особенности, даны цифровые обозначения в произвольном порядке.

Исследование культуры исходного штамма *B. pseudomallei* 110 показало, что она разделяется на два морфотипа – VI (более 90 %) и VII Chl. Выделенные морфотипы и схема классификации представлены на рис. 1.

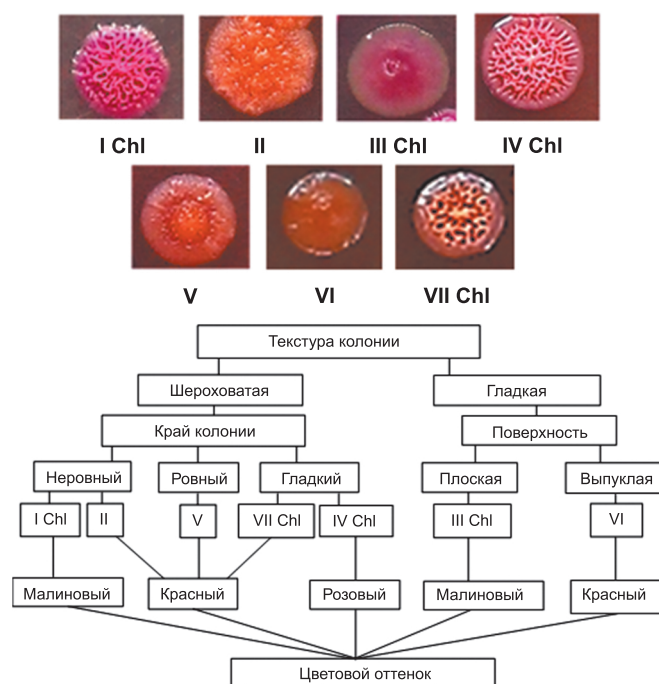


Рис. 1. Морфотипы *B. pseudomallei* 110, классифицированные по отличительным признакам структуры колоний

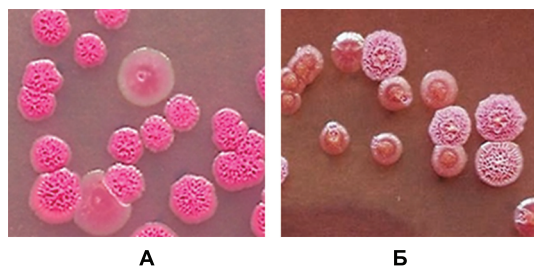


Рис. 2. Морфотипы колоний *B. pseudomallei* 110:
А – при пассаже в воде, Б – в клетках тетрахимен в воде

Для подтверждения видовой принадлежности изолированных морфотипов к *B. pseudomallei* использовали мультилокусную ПЦР с праймерами на последовательности генов β -лактамаз, показавшую наличие трех амплифицированных фрагментов, характерных для культур возбудителя мелиоидоза у всех морфологических вариантов.

Исследование колоний микроорганизма в различных образцах планктонных культур и ассоциированных с *T. pyriformis* обнаружило варьирование морфотипов, в зависимости от среды культивирования (LB бульон или вода), и их различное соотношение в отдельных пробах.

Так, в воде исходная культура утрачивала свой изначальный морфотип (VI и VII Chl) и на среде Эшдауна почти целиком была представлена морфотипом I Chl с незначительным количеством (3–5 %) колоний морфотипа III Chl (рис. 2А).

В сокультуре с тетрахименами в этой среде *B. pseudomallei* 110 формировал три морфологических типа колоний, среди которых преобладающим был V морфотип (около 70 %), одновременно около 27 % колоний принадлежало I Chl морфотипу и в незначительном количестве (около 3 %) присутствовал IV Chl (рис. 2Б). При пассаже *B. pseudomallei* 110 в клетках тетрахимен в LB наблюдалось образование двух морфотипов, также с превалированием V морфотипа (около 70 %), наряду с ним выявлялся морфотип I Chl.

Наибольшее количество морфологических вариантов обнаружено при пассаже планктонной культуры *B. pseudomallei* 110 в LB бульоне, где, наряду с V морфотипом, идентифицировали колонии I Chl, III Chl и II типов.

Особенности переключения исходного морфотипа *B. pseudomallei* 110 VI (VII Chl) в различных условиях культивирования представлены на рис. 3.

Как видно из представленной схемы, в стрессовых условиях культивирования изменение VI исходного морфотипа *B. pseudomallei* 110 привело к появлению ряда других морфологических вариантов, количество которых варьировало от 2 до 4 в различных образцах культур. При этом в воде доминирующим оказался морфотип I Chl, тогда как во всех остальных пробах преобладал морфотип V. В наибольшем количестве этот морфотип выделяли при пассаже в клетках тетрахимен в LB бульоне и воде. По-видимому, уникальным является морфотип

II, образование которого наблюдали только в LB бульоне, где он составлял около 30 %.

Мы исследовали некоторые фенотипические свойства морфотипов *B. pseudomallei* 110, которые обычно рассматривают в связи с адаптацией микроорганизма во внешней среде, и установили, что морфотипы I Chl и IV Chl отличаются от остальных морфологических вариантов наличием β -гемолитической активности. Необходимо отметить, что β -гемолитическая активность не тестировалась у исходного штамма *B. pseudomallei* 110. Эти морфотипы также характеризовались повышенной активностью протеаз, при этом I Chl тип демонстрировал максимально выраженную подвижность (зона 30 мм), тогда как IV Chl морфотип был наименее подвижным (зона 5 мм).

Определение вирулентности морфотипов показало, что все они существенно снизили ее в сравнении с исходным штаммом, и вызывали гибель золотистых хомячков при заражении дозой $1 \cdot 10^2$ м.к. в срок от 26 до 34 сут без четкой дифференциации летальности в зависимости от морфотипа, тогда как при заражении исходным штаммом *B. pseudomallei* 110 гибель животных наступала в течение первых пяти суток. Исследование морфологии колоний культур, выделенных от павших животных, показало, что все они принадлежали к I Chl морфотипу. Кроме того, до начала гибели экспериментальных животных было проведено вскрытие внешне здоровых золотистых хомячков, зараженных морфотипами IV Chl и V. В обоих случаях на среде Эшдауна из селезенки и лимфатических узлов изолировали культуры, принадлежащие к I Chl.

Таким образом, используя стрессовые условия культивирования штамма *B. pseudomallei* 110 в виде монокультур и сокультур с *T. pyriformis* в LB бульоне и воде, мы выявили изменение его исходного морфологического варианта, обозначенного как морфотип VI, в ряд других отдельных морфотипов. Необходимо отметить, что принятой классификации морфотипов нет. Собственно морфотип можно определить как морфологический вариант колоний на среде Эшдауна, визуально отличающийся от других. Этот критерий внешнего отличия лежит в основе обозначения морфотипов различными авторами [4, 5, 6]. При этом некоторые исследователи выска-

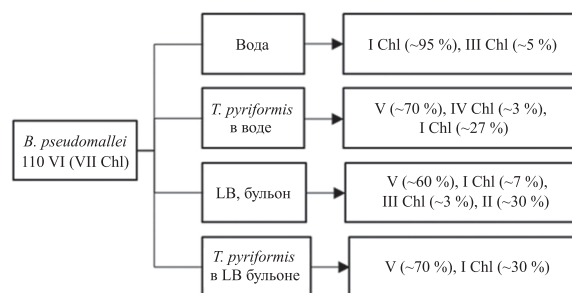


Рис. 3. Схема изменения исходного морфотипа *B. pseudomallei* 110 в различных условиях культивирования

зывают мнение, что вариабельность морфотипов, зависящая от географического происхождения и генетических особенностей штаммов, в принципе не позволяет следовать какой-либо одной схеме классификации [5].

В этой связи интересно, что среди идентифицированных в нашей работе морфотипов выявлены варианты, обладающие сходством с морфотипами N.Chantratita *et al.* [4], несмотря на принадлежность штамма *B. pseudomallei* 110 к другому географическому региону. Таким морфотипом, в частности, является доминирующий при пассаже монокультуры *B. pseudomallei* 110 в стерильной речной воде I Chl, который соответствовал морфотипу I, полученному N.Chantratita *et al.* из клинических мелиоидозных изолятов в Таиланде.

Оценить, насколько любые другие шероховатые варианты, описанные различными исследователями, можно считать сходными или отличными от морфотипа I, до конца не представляется возможным. По-видимому, более определенный ответ на этот вопрос может дать только изучение их метаболизма и структуры геномов. Однако показано, что подобные морфотипы могли быть выделены не только из клинических изолятов, в которых обнаружение колоний характерного шероховатого типа имеет диагностическое значение, но и получены в эксперименте в условиях ограничения питания микроорганизма (длительное культивирование в питательной среде) [5, 6]. В нашем исследовании I Chl, доминировавший в культурах после пассажа в воде, также выделен от золотистых хомячков при заражении любым из семи морфотипов, что служит подтверждением возможности его образования путем переключения морфотипов в организме животных.

Изучение фенотипических свойств I Chl, в сравнении с другими морфотипами, показало, что он проявляет β-гемолитическую активность, обладает выраженной экспрессией протеаз и наибольшей подвижностью. При оценке свойств морфотипа I некоторые исследователи определенное значение придают подвижности, рассматривая ее в числе факторов распространения возбудителя в макроорганизме [10].

Мы расцениваем фенотипические свойства, выявленные при изучении морфотипов, в целом, как относящиеся к адаптации в неблагоприятных условиях среды, не связывая их непосредственно с переключением и образованием того или иного морфотипа, на что указывает и сниженная у всех морфотипов вирулентность. Известно, что утрата вирулентности является закономерным изменением культур микроорганизмов, подвергающихся стрессовому воздействию вне организма хозяина [1].

Заслуживает внимания тот факт, что все другие, использованные в нашей работе условия культивирования *B. pseudomallei* 110, отличные от пассажа монокультур микроорганизма в воде, приводили к формированию как доминирующего V морфотипа. Однако в LB бульоне, где наблюдалось наибольшее

разнообразие морфотипов, вариант V сочетался преимущественно с вариантом II, обнаруженным только в этой среде, тогда как в клетках тетрахимен, независимо от среды культивирования, морфотип V присутствовал вместе с I Chl. Это позволяет предполагать, что размножение в клетках тетрахимен оказывает влияние на морфологическую вариабельность культуры и способствует ее трансформации в определенные морфологические типы.

Возможно, формирование доминирующего V морфотипа в большей степени связано с нарушением динамики роста культур (частые многократные пересевы) и адаптацией к изменяющимся условиям культивирования, тогда как для образования I Chl основное значение могло иметь ограничение источников питания. По этой причине именно при пассаже в воде, где источники питания практически отсутствовали, этот морфотип был представлен в наибольшем количестве.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов А.Б., Куликалова Е.С. Сапронозы: экология возбудителей, эпидемиология, терминология и систематика. *Эпидемиол. и вакцинопроф.* 2016; 1(86):5–16.
2. Захарова И.Б., Романова А.В., Тетерятникова Н.Н., Замараев В.С., Виктор Д.В. Молекулярное типирование и анализ полиморфизма генов β-лактамаз патогенных видов *Burkholderia*. *Вест. Волгоградского гос. мед. ун-та.* 2012; 2(42):98–101.
3. Ashdown L. R. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology.* 1979; 11(2):293–7.
4. Chantratita N., Wuthiekanun V., Boonbumrung K., Tiyawisuttri R., Vesaratchavest M., Limmathurotsakul D., Chierakul W., Wongratanaheewin S., Pukritiyakamee S., White N. J. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *J. Bacteriol.* 2007; 189:807–17. DOI: 10.1128/JB.01258-06.
5. Chen Yao-Shen, Lin Hsi-Hsun, Hung Chih-Chang, Mu Jung-Jung, Hsiao Yu-Shan and Chen Ya-Lei. Phenotypic characteristics and pathogenic ability across distinct morphotypes of *Burkholderia pseudomallei* DT. *Microbiol. Immunol.* 2009; 53:184–9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00105.x.
6. Gierok P., Kohler C., Steinmetz I., Lalk M. *Burkholderia pseudomallei* colony morphotypes show a synchronized metabolic pattern after acute infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(3):e0004483. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004483.
7. Howard K., Inglis T.J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:3312–16.
8. 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.
9. Lee S.H., Chong C.E., Lim B.S., Chai S.J., Sam K.K., Mohamed R. Nathan S. *Burkholderia pseudomallei* animal and human isolates from Malaysia exhibit different phenotypic characteristics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 58:263–70. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.002.
10. Tandhavanant S., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Korbsrisate S., Day N. P., Peacock S. J., Chantratita N. 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. DOI: 10.1186/1471-2180-10-303.

References

1. Belov A.B., Kulikalova E.S. [Sapronoses – ecology of the agents, epidemiology, terminology and taxonomy]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2016; 1(86):5–16.
2. Zakharova I.B., Romanova A.V., Teteryatnikova N.N., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. [Molecular typing and analysis of β-lactamase gene polymorphism of pathogenic *Burkholderia*]. *Volgograd State Medical University Bulletin.* 2012; 2(42):98–101.

3. Ashdown L. R. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology*. 1979; 11(2):293–7.
4. Chantratita N., Wuthiekanun V., Boonbumrung K., Tiya-wisutsri R., Vesaratchavest M., Limmathurotsakul D., Chierakul W., Wongratanacheewin S., Pukritiyakamee S., White N. J. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *J. Bacteriol.* 2007; 189:807–17. DOI: 10.1128/JB.01258-06.
5. Chen Yao-Shen, Lin Hsi-Hsun, Hung Chih-Chang, Mu Jung-Jung, Hsiao Yu-Shan and Chen Ya-Lei. Phenotypic characteristics and pathogenic ability across distinct morphotypes of *Burkholderia pseudomallei* DT. *Microbiol. Immunol.* 2009; 53:184–9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00105.x.
6. Gierok P., Kohler C., Steinmetz I., Lalk M. *Burkholderia pseudomallei* colony morphotypes show a synchronized metabolic pattern after acute infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(3):e0004483. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004483.
7. Howard K., Inglis T.J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:3312–16.
8. 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.
9. Lee S.H., Chong C.E., Lim B.S., Chai S.J., Sam K.K., Mohamed R., Nathan S. *Burkholderia pseudomallei* animal and human isolates from Malaysia exhibit different phenotypic characteristics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 58:263–70. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.002.
10. Tandhavanant S., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Korbsrisate S., Day N. P., Peacock S. J., Chantratita N. 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. DOI: 10.1186/1471-2180-10-303.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 01.12.17.

Принята к публ. 08.02.18.