

Н.А.Видяева, Г.А.Ерошенко, Н.Ю.Шавина, О.С.Кузнецов, В.В.Кутырев

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ ШТАММАМИ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ И *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* НА МОДЕЛИ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Изучено формирование биопленки штаммами *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* на модели нематоды *Caenorhabditis elegans*. Показано, что штаммы возбудителя чумы, не формирующие пигментированные колонии на среде с Конго красным (Pgm⁻), не образуют биопленку на головной и шейной поверхностях нематоды. Pgm⁺ штаммы основного и неосновных подвидов способны образовывать биопленку на кутикуле нематод *C. elegans*, хотя выраженность этого признака у разных штаммов была неодинаковой.

Ключевые слова: Возбудитель чумы, возбудитель псевдотуберкулеза, нематода, биопленка, пигментация.

Возбудитель псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis* является кишечным паразитом и передается фекально-оральным способом. Для выживания во внешней среде клетки псевдотуберкулезного микроба формируют так называемую биопленку – агрегаты бактерий, заключенные в полимерный матрикс, который представляет собой экзополисахарид, синтезируемый бактериями [8]. Чумной микроб произошел от псевдотуберкулезного несколько тысяч лет назад [6] и является внутриклеточным паразитом. Он передается через укус заблокированной блохи. «Чумной блок», который формируется в преджелудке блохи во время кормления на инфицированном млекопитающем, также представляет собой биопленку [10]. Таким образом, роль биопленки у чумного микроба в процессе эволюции существенно изменилась. Она используется этим возбудителем для трансмиссии от зараженного животного к здоровому через укус заблокированной блохи. В последнее время для изучения формирования биопленки у чумного и псевдотуберкулезного микробов предложена модель нематоды *Caenorhabditis elegans* как менее трудоемкая и более доступная, чем модель блохи [9]. Ранее показано, что штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, продуцирующие экзополисахарид, формируют биопленку на ротовой и боковой поверхностях нематоды, блокируя ее кормление [9, 11]. Исследования формирования биопленки на модели чумного микроба проводились на зарубежном лабораторном штамме основного подвида *Y. pestis* КИМ. Однако на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья расположены 42 природных очага чумы [5], на которых циркулируют не только штаммы высоковирулентного основного подвида, но и штаммы четырех неосновных подвидов – кавказского, алтайского, гиссарского и улэгейского. Они обладают рядом свойств, общих с близкородственным микробом – возбудителем псевдотуберкулеза, паразитируют на различных видах грызунов, передаются

разными видами блох и, по-видимому, являются более древними формами *Y. pestis* [3]. Изучение блокообразующей способности штаммов неосновных подвидов на модели блохи показало, что горно-алтайские, гиссарские [4] и кавказские [2] штаммы с меньшей эффективностью образуют блок преджелудка блохи, чем штаммы основного подвида. Однако причины меньшей способности неосновных подвидов к блокообразованию остаются до сих пор не установленными. Возможно, это связано с меньшей эффективностью образования биопленки на биотических поверхностях у неосновных подвидов чумного микроба.

В связи с малой изученностью продукции биопленки штаммами неосновных подвидов целью настоящей работы явилось сравнительное исследование способности образовывать биопленку штаммами возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза на биотической поверхности, а именно на модели нематоды *C. elegans*.

Материалы и методы

В работе были использованы 19 штаммов *Y. pestis* разных подвидов и 4 штамма *Y. pseudotuberculosis*. Изучение образования биопленки на биотической поверхности у штаммов основного и неосновных подвидов возбудителя чумы и штаммов возбудителя псевдотуберкулеза проводили на штамме нематоды *C. elegans* дикого типа N2 Bristol. Штамм нематоды был получен из *Caenorhabditis Genetics Center* (Университет Миннесоты, США) и поддерживался на *E. coli* OP50 – стандартном источнике питания *C. elegans*. Для продукции биопленки бактерии выращивали в течение ночи при 28 °С на агаре LB, готовили взвесь бактерий 10¹⁰ кл/мл в буфере M9 [7]. Аликвоты по 50 мкл раскапывали на среду для выращивания нематоды (NGM) на чашки Петри диаметром 9 см [7]. Бактериальный газон распределяли по

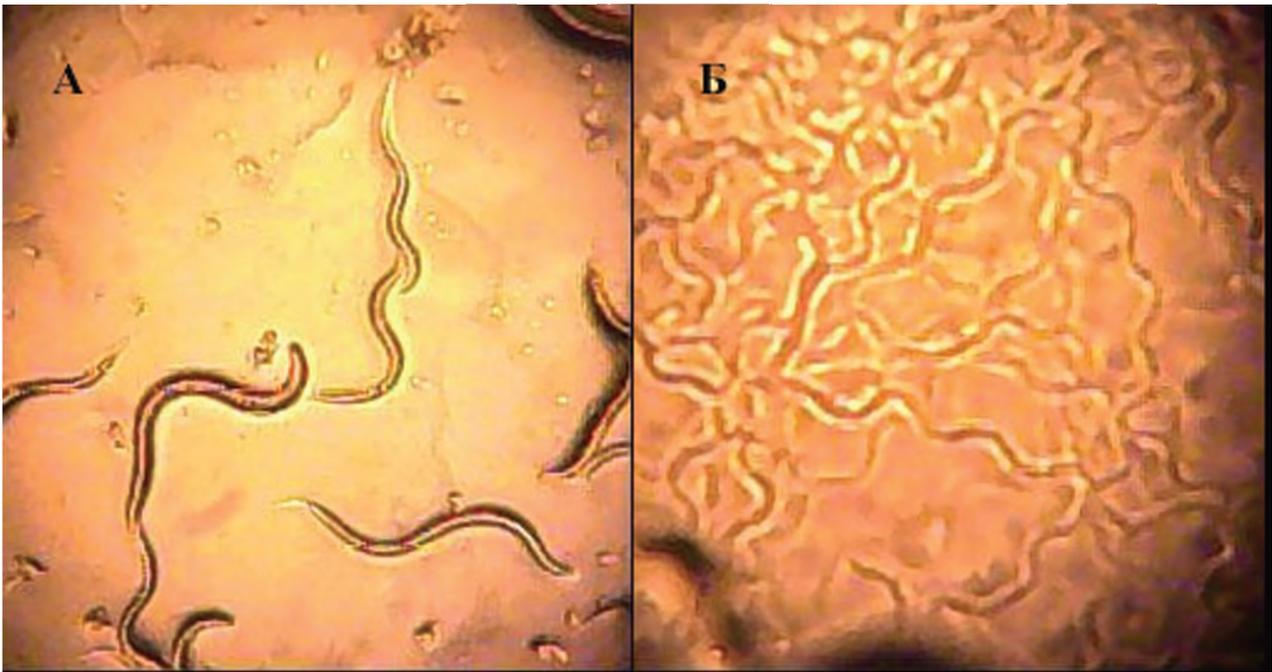


Рис. 1. Рост нематоды на штамме *Y. pestis* EV (Pgm⁻) – А, синусоидальные следы, оставленные *C. elegans* на газоне с *Y. pestis* EV – Б. ×80

агару шпателем, не доходя до края чашки 1–1,5 см. Перед нанесением нематод газоны выращивали в течение 16–24 ч при комнатной температуре. Затем на бактериальные газоны переносили беременных взрослых гермафродитов *C. elegans*, оставляли их для отложения яиц, и затем взрослых особей удаляли. Чашки культивировали при 17–20 °С в течение 3 дней. Формирование биопленки определяли на личиночных стадиях. Фотографирование объектов проводили с помощью WEB-камеры с разрешением 1,3 мегапикселя.

Для выявления признака пигментации клетки возбудителей чумы и псевдотуберкулеза высевали на цветную дифференциальную среду, содержащую Конго красный (производства института «Микроб», Саратов).

Результаты и обсуждение

По литературным данным, формирование биопленки у штамма основного подвида *Y. pestis* KIM, который относится к биовару *Mediaevalis*, коррелирует в основном с фенотипом пигментации (Pgm⁺). Было показано, что пигмент-негативный мутант этого штамма, у которого отсутствует *hms* локус, ответственный за фенотип пигментации, не способен вызывать формирование биопленки на *C. elegans* [12].

В наших экспериментах с использованием штаммов основного и неосновных подвигов, циркулирующих на территории РФ, стран СНГ и Монголии, также показано, что формирование биопленки на кутикуле нематод коррелирует с фенотипом пигментации. Pgm⁻ штаммы возбудителя чумы как основного (EV, А-161), так и неосновных (И-3069 – улэгейский,

И-2998 – алтайский) подвигов не продуцировали биопленку (рис. 1, А). Черви были способны свободно передвигаться по газону свойственным им синусоидальным образом, оставляя на газоне характерный след (рис. 1, Б). Штаммы *Y. pestis*, которые образовывали 30 % (И-2359 – алтайский) и 50 % пигментированных колоний (И-3131, А-1249, А-1725, А-1723 – гиссарские и А-1802 – таласский), блокировали незначительную часть нематод. На газонах, засеянных этими штаммами, встречались особи, у которых биопленка образовывалась на передней трети тела (рис. 2, Б). Она не препятствовала кормлению нематод, но ограничивала передвижение по газону, которое приобретало аберрантный характер и заключалось в том, что черви совершали резкие движения с большим изгибом тела. Нематоды, у которых биопленка формировалась на головной части, теряли способность передвигаться по газону, их тело продолжало изгибаться, как бы «пробуксовывая» на месте (рис. 2, А). Но большую часть нематод составляли свободно передвигающиеся особи, подобно тому, как это происходило у Pgm⁻ штаммов возбудителя чумы.

Практически такая же картина наблюдалась на газонах, засеянных культурами кавказских штаммов (818, 1146, 3544Арм.), которые на цветной дифференциальной среде растут в виде розовых колоний, в отличие от Pgm⁺ штаммов, которые формируют ярко красные колонии.

На газонах, засеянных штаммами, формирующими красные пигментированные колонии на цветной среде с Конго красным (И-1996 – основной подвид, И-2422, И-3130 – улэгейский, 2183 – алтайский, А-1728 – гиссарский и А-1815 – таласская группа),

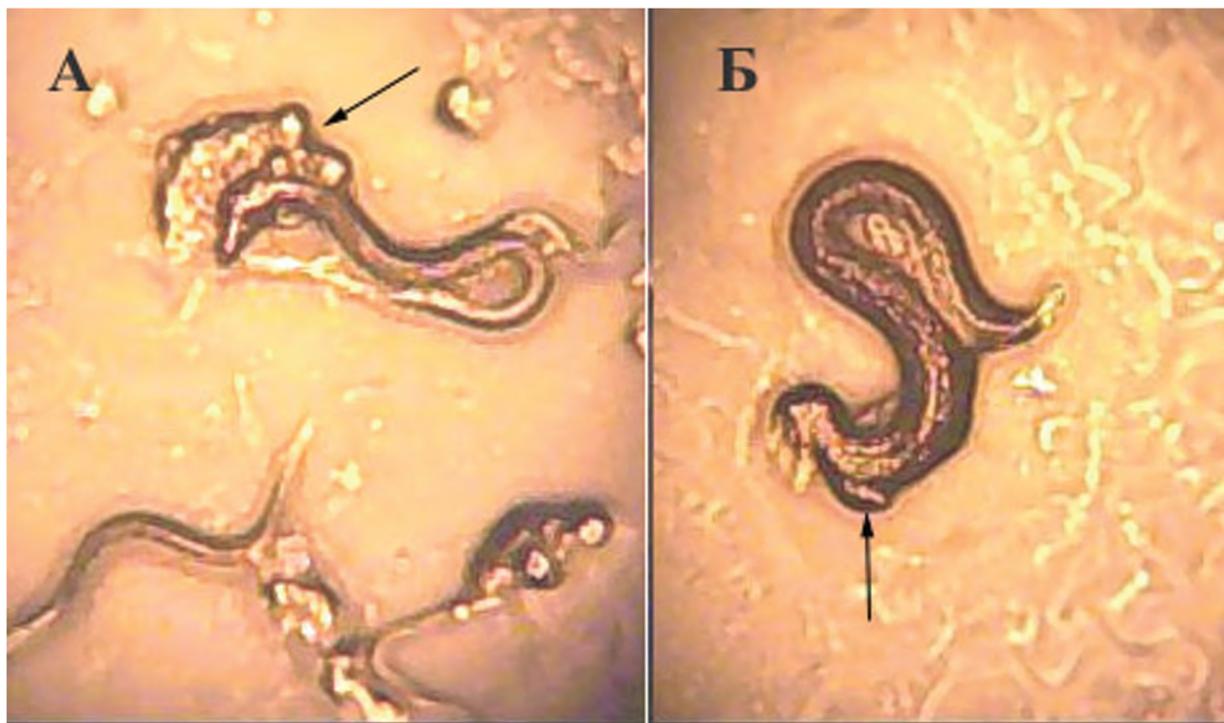


Рис. 2. Образование биопленки (показана стрелками) на головной (А) и шейной (Б) частях нематоды *C. elegans* штаммом *Y. pestis* А-1725 (Гиссарский). $\times 80$

также встречались и свободно живущие, и заблокированные особи *C. elegans* (рис. 2 А, Б), причем количество заблокированных и частично заблокированных нематод на этих штаммах было выше, чем на штаммах, которые формировали 30 и 50 % Pgm⁺ колоний на цветной среде с Конго красным и на кавказских штаммах. Помимо этого, на газонах с Pgm⁺ штаммами наблюдались формирования, состоящие из «клубков» личинок, окруженных матриксом (рис. 3), который, по-видимому, представляет собой биопленку. Подобные образования в литературе не описаны, поэтому говорить о природе внеклеточного матрикса, окружающего личинки, как о экзополисахариде можно будет только после проведения специальных исследований.

Изученные нами штаммы псевдотуберкулезного микроба (2600, 417 – Бадхызские и 50-73, 312 – дальневосточные) не формировали биопленку на головной поверхности нематод. Особи свободно передвигались по поверхности газона характерным синусоидальным способом. По данным литературы, большинство штаммов возбудителя псевдотуберкулеза не способны блокировать нематод. G.W.Joshua *et al.* [11] показали, что из исследованного ими 41 штамма *Y. pseudotuberculosis*, которые представляли 21 серовар, 76 % не образовывали биопленку на поверхности нематод. По-видимому, изученные нами культуры возбудителя псевдотуберкулеза относятся к штаммам, не способным продуцировать биопленку.

Ранее нами было показано, что штаммы возбудителя чумы, сорбирующие Конго красный на цветной дифференциальной среде, и штаммы возбудителя псевдотуберкулеза на абиотической поверхности

(полистироловые чашки Петри) формируют хорошо выраженную биопленку [1], что также согласуется с литературными данными [11]. Вероятно, у *Y. pseudotuberculosis* механизмы формирования биопленок на биотических и абиотических поверхностях различаются между собой.

Таким образом, нами проведено исследование способности к образованию биопленки у штаммов основного и неосновных подвигов, выделенных на территории Российской Федерации и стран ближнего

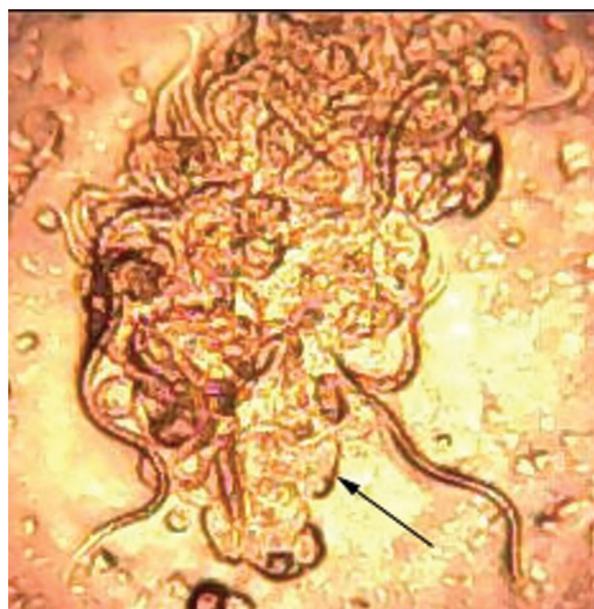


Рис. 3. Формирования, состоящие из «клубков» личинок, окруженных матриксом (показан стрелкой), на газоне *Y. pestis* И-1996. $\times 80$

зарубежья. Показано, что Pgm⁺ штаммы основного и неосновных подвидов, образующие пигментированные колонии на среде с красителем, способны образовывать биопленку на биотической поверхности – кутикуле нематод *C. elegans*, хотя выраженность этого признака у разных штаммов была неодинаковой.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-0100 и 08-04-00731.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю. и др. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Журн. эпидемиол. микробиол. и иммунобиол. Готовится к печати.
2. Елкин Ю.М., Осипова С.П., Юндин Е.В. К изучению эффективности блох обыкновенных полевых как переносчиков чумы. Особо опасные инфекции на Кавказе. Ставрополь; 1966. С. 78–80.
3. Куклева Л.М., Проценко О.А., Кутырев В.В. Современные представления о родстве возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. Мол. ген. микробиол. и вирусол. 2002; 1:3–7.
4. Малафеева Л.С., Самойлова Л.В., Иванов В.А. О блокообразующей способности штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов. Пробл. особо опасных инф. Саратов. 1979; 6:42–4.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: «Медицина»; 2004. С. 10.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96:14043–8.
7. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 1974; 77:71–94.
8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284:1318–22.
9. Darby C., Hsu J.W., Ghori N. et al. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. Nature. 2002; 417:243–4.
10. Jarrett C.O., Deak E., Isherwood K.E. et al. Transmission

of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. J. Infect. Dis. 2004; 190:783–92.

11. Joshua G.W.P., Karlyshev A.V., Smith M.P. et al. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. Microbiol. 2003; 149:3221–9.

12. Tan L., Darby C. A movable surface: formation of *Yersinia* sp. biofilms on motile *Caenorhabditis elegans*. J. Bacteriol. 2004; 186:5087–92.

Об авторах:

Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

N.A.Vidyaeva, G.A.Eroshenko, N.Yu.Shavina,
O.S.Kuznetsov, V.V.Kutyrev

Biofilm Formation in *Yersinia pestis* Strains of the Main and Non-Main Subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* on the Model of *Caenorhabditis elegans*

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Biofilm formation by *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* was studied on the model of *Caenorhabditis elegans*. It was shown that plague agent strains that did not form pigmented colonies on a medium with Congo red (Pgm⁻) did not produce biofilm at the head and neck surfaces of nematode. Pgm⁺ strains of the main and non-main subspecies of plague microbe are able to form biofilm at cuticle of nematode *C. elegans*, the expression of this feature being unequal in various strains.

Key words: plague agent, pseudotuberculosis agent, nematode, biofilm, pigmentation.

Authors:

Vidyaeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N.Yu., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.12.08.