УДК 579.253.4

ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ АДАПТИВНЫХ МУТАНТОВ И ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК ШТАММОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853 И С ФЕНОТИПОМ МЕЛКИХ КОЛОНИЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА

Цветкова Н.А., Гузачева И.М., Голясная Н.В., Беляева Л.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, e-mail: tsvetkovanatalya@mail. ru

В работе представлен сравнительный анализ частот адаптивных мутантов к ципрофлоксацину в культурах планктонных клеток и биопленки эталонного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и штамма с фенотипом мелких колоний. В результате экспериментов обнаружена прямая зависимость частоты адаптивных мутантов от фазы роста культуры штамма с фенотипом мелких колоний, а в культуре биопленки – от времени инкубирования с антибиотиком. Выживаемость клеток биопленок при действии ципрофлоксацина была выше по сравнению с выживаемостью клеток планктонных культур обоих штаммов. Была показана высокая гетерогенность колоний штамма с мелкими колониями после инкубации с антибиотиком, несмотря на высокую чувствительность к ципрофлоксацину. При возрастании времени инкубации с ципрофлоксацином для клеток штамма с фенотипом мелких колоний прогнозируется возможное возникновение высокоустойчивых к антибиотику клонов.

Ключевые слова: мутагенез, гетерогенность, биопленка, SCV, Pseudomonas aeruginosa

STUDY OF FREQUENCY ADAPTIVE MUTANTS AND POPULATION HETEROGENEITY OF CELLS STRAINS PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853 AND WITH A PHENOTYPE OF SMALL COLONIES AS A RESULT OF CIPROFLOXACIN

Tsvetkova N.A., Guzacheva I.M., Golyasnaya N.V., Belyaeva L.A.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, e-mail: tsvetkovanatalya@mail. ru.

This paper presents a comparative analysis of the frequency of adaptive mutants to ciprofloxacin in the cultures of planktonic and biofilm cells of the reference strain of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and strain with a phenotype of small colonies. The experiments detected direct dependence on the frequency of adaptive mutants growth phase culture of a strain with a phenotype small colony varyants in culture and the biofilm – from the time of incubation with the antibiotic. Cell survival biofilms under the action of ciprofloxacin was higher compared to cell survival planktonic cultures of both strains. It was demonstrated the high heterogeneity of strain having small colony variant after incubation with the antibiotic, despite its high sensitivity to ciprofloxacin. With increasing time of incubation with ciprofloxacin for the cells with the phenotype of a strain of small colonies predicted the possible emergence of more resistant to the antibiotic clones.

Keywords: mutagenesis, heterogeneity, biofilm, SCV, Pseudomonas aeruginosa

Одним из самых распространенных возбудителей внутрибольничных инфекций была и остается *Pseudomonas aeruginosa*. Инфекции, вызванные *Pseudomonas*, плохо поддаются терапии из-за множественной резистентности к антибиотикам. Изучение у *P. aeruginosa* механизмов адаптации к антибиотикам, образования биопленки и ее строения является одной из актуальных задач современной биомедицинской науки. На сегодняшний момент известны три основные стратегии, которые позволяют *P. aeruginosa* адаптироваться к давлению различных антибиотиков и иммунной системы пациентов. Это появление мутаторного фенотипа, развитие биопленки и высокая фенотипическая гетерогенность популяции [9]. Особенное внимание в литературе уделяется изучению в биопленке *P. aeruginosa* субпопуляций с мелкими колониями (small colony variant, SCV). По сравнению с колониями штамма дикого типа штаммы с мелкими колониями обладают высокой антибиотикорезистентностью, усиленным биопленкообразованием, могут образовывать морфотипы, подобные колониям дикого типа [4]. При таком фенотипе колоний исследователи отмечают задержку роста культуры, дефект движения и сильно сниженный уровень чувства кворума [10].

Многочисленные исследования, проводимые в мире, направлены также на изучение появления мутаторного фенотипа штаммов *P. aeruginosa*, отличающихся высокой приспособляемостью к действию антибиотиков. Так, в результате анализа 70 изолятов *P. aeruginosa* от 10 пациентов с хронической легочной инфекцией показано, что параллельная микроэволюция бактерий одного вида, длительное время находившихся под селективным давлением

антибиотиков и иммунной системы пациентов, приводит к одновременному совместному сосуществованию субпопуляций с гипермутабильным, средним и слабым мутаторным фенотипом. Гипермутабильность связана с мутациями в генах системы репарации неправильно спаренных оснований (ММР) *mutS* и *mutL* [2]. Быстрая адаптация *P. aeruginosa* к ципрофлоксацину в большинстве случаев обусловлена мутациями в таких генах, как *gyrA*, *gyrB*, *nfxB* и *orfN*. Кроме того, возникающие в других местах генома вторичные мутации, как оказалось, также важны для появления антибиотикорезистентности [11].

Цель исследования – провести сравнительный анализ частот адаптивных мутантов и гетерогенности популяции клеток при инкубации с ципрофлоксацином в штаммах *P. aeruginosa* эталонного и с фенотипом мелких колоний (SCV).

Материалы и методы исследования

В работе были использованы штаммы *Pseudomonas aeruginosa*: музейный эталонный штамм ATCC 27853 и штамм с фенотипом мелких колоний SCV, выделенный нами из биопленки плавательного бассейна, ранее определенный как *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Для получения планктонных культур клетки обоих штаммов выращивали при 37^{0}C до достижения ОП 0.2 при 600 нм в объеме 50 мл в жидкой среде LB (Luria Bertani) следующего состава, в г/л: 10 – триптон, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl в 1 л дистиллированной воды. В дальнейшем добавляли в среду антибиотик ципрофлоксацин (ЦПРФ) в конечной концентрации 0,05 мкг/мл (*P. aeruginosa* SCV) и 0,2 мкг/мл (для *P. aeruginosa* ATCC 27853). Оптимальные концентрации антибиотика для каждого штамма были определены опытным путем. В большинстве литературных источников штаммы с мелкими колониями, выделенные, как правило, у больных с хроническими инфекциями дыхательных путей, описываются как высокоустойчивые к действию антибиотиков. Выделенный нами штамм с мелкими колониями из биопленки плавательного бассейна, напротив, оказался высокочувствительным к действию ЦПРФ, поэтому концентрация антибиотика в среде для подсчета адаптивных мутантов для него была ниже, чем для эталонного штамма. В течение 1,5 часов инкубации с антибиотиком через каждые 15 мин аликвоты культур клеток объемом 400 мкл 3 раза отмывали от антибиотика центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин, и осадок ресуспендировали в эквивалентном объеме физиологического раствора – 0,9 % NaCl (ФР, pH 7,4). Количество клеток в 1 миллилитре культуры определяли методом подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ) на LB-агаре (1,5 %). Для этого высевали по 5 мкл культуры с подобранным для подсчета разведением. Одновременно, с целью определения частоты стресс-индуцированных мутантов, высевали по 100 мкл шпателем на LB-агар с ЦПРФ (в той же концентрации). Эксперименты проведены в 3-х повторностях. Чашки инкубировали в термостате при 37°C в течение 7 дней. Частоту мутантов вычисляли как отношение среднего количества выросших на LB-агаре с ЦПРФ колоний к КОЕ.

Аналогичные эксперименты проводили для определения частоты адаптивных мутантов в биопленке. Для получения биопленки 50 миллилитров культуры инкубировали 96 часов при температуре 37°C. Затем биопленку оставляли в необходимом для эксперимента количестве культуры (3 мл), а оставшуюся среду культивирования сливали. Биопленку разбивали ресуспендированием. Потом добавляли ЦПРФ в указанных концентрациях и проводили эксперимент по указанной схеме. Достоверность отличий определялась с помощью t-критерия Стьюдента, при минимальной величине уровня значимости $p < 0,05$.

С целью определения гетерогенности популяции после культивирования на LB-агаре с ЦПРФ в течение 7 суток колонии обоих штаммов, высеянные из биопленки, перекалывали стерильным наконечником на LB-агар без антибиотика по 59 колоний на чашку. Подсчет выросших колоний проводили через 24 часа и через 7 суток.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате серии экспериментов по подсчету частоты адаптивных мутантов в растущих планктонных культурах и в биопленке было найдено, что добавление ЦПРФ в среду и 15-минутное инкубирование с ним достоверно снижает количество живых клеток в культурах обоих штаммов приблизительно в 10 раз (рис. 1). Количество выживших клеток достигает своих минимальных значений у *P. aeruginosa* SCV уже к 30 минуте, а у эталонного штамма к 90 минуте культивирования с антибиотиком. Что касается биопленки, то у эталонного штамма добавление в среду культивирования ЦПРФ не оказывает влияния на количество клеток в культуре, а у штамма SCV наблюдается незначительное, но достоверное снижение числа выживших клеток к 60 минуте инкубирования, при $p < 0,05$.

Сравнительный анализ частот адаптивных мутантов показал, что в планктонных культурах обоих штаммов частота адаптивных мутантов зависит от количества выживших клеток, но у штамма с фенотипом мелких колоний она увеличивается в 100 раз к 60 минуте инкубирования с ЦПРФ (рис. 2), а число выживших клеток снижается лишь в 10 раз (рис. 1). По литературным данным, после внесения в среду ЦПРФ снижается уровень метаболизма, способность к движению, проницаемость клетки, авторы считают, что это нужно для селекции необходимых для выживания в новых условиях мутаций, при значительно редуцированном SOS-ответе у *P. aeruginosa* по сравнению с *E. coli* [3]. Кроме того, гипермутабельность *P. aeruginosa,* по мнению большинства исследователей, связана с мутациями в белках системы ММР, необходимых

для исправления ошибок репликации. Доказано, что при хронической инфекции в легких в течение терапии антибиотиками наблюдается гипермутабильность в генах *mexZ*, *mucA* и *lasR*, но для появления антибиотикорезистентности необходимы еще и мутации в генах ММР системы [6]. Однако другие исследователи показали, что мутаторный фенотип, связанный с дефектом белков ММР, увеличивает частоту адаптивных мутаций по сравнению с этим показателем в клетках эталонного штамма именно в культуре биопленки, а не у планктонных клеток [9]. В результате наших экспериментов выявлено, что, напротив, частота адаптивных мутантов штамма *P. aeruginosa* SCV достоверно выше у планктонных клеток по сравнению со штаммом *P. aeruginosa* ATCC 27853, чем в клетках культуры биопленки. Поэтому клетки штамма *P. aeruginosa* SCV, скорее всего, не несут мутацию в генах репарации неправильно спаренных оснований. Кроме того, штаммы, использованные в работе, скорее имеют средний мутаторный фенотип. В то же время наши результаты свидетельствуют о большей выживаемости клеток биопленок при действии ЦПРФ по сравнению с планктонными культурами обоих штаммов (рис. 1).

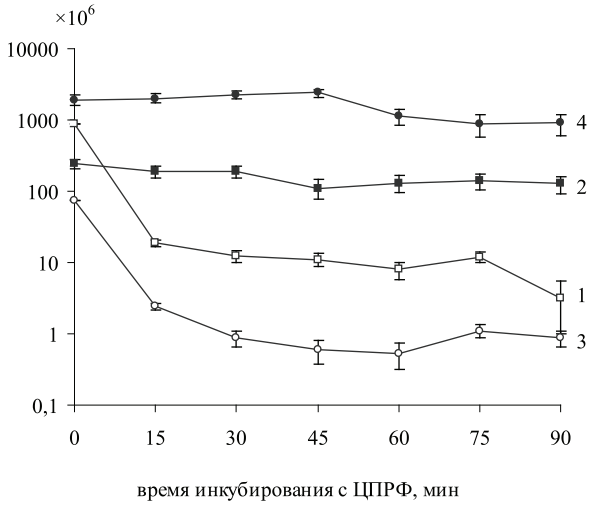

Рис. 1. Количество живых клеток в растущих культурах штаммов P. aeruginosa ATCC 27853 (1), SCV (3) и в биопленке (2, 4 соответственно), при инкубировании с ЦПРФ

По литературным данным транскриптомного анализа, существуют различия в экспрессии генов при стресс-ответе в биопленке и в планктонных культурах *P. aeruginosa* [5]. В то же время для бактерий рода *Pseudomonas* были показаны отличия в распределении мутаций в разных участках генома. Доказано, что горячие точки мутирования в геномах клеток растущих культур и биопленки отличаются [7].

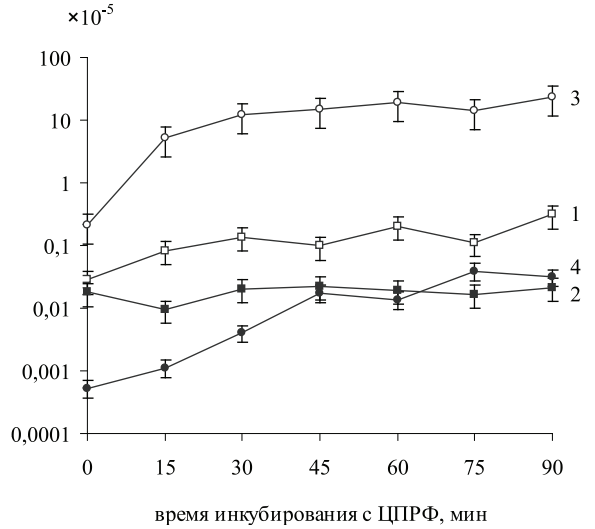

Рис. 2. Частота адаптивных мутантов в растущих культурах штаммов P. aeruginosa ATCC 27853 (1), SCV(3) и в биопленке (2,4 соответственно), при инкубировании с ЦПРФ

В результате экспериментов нами была замечена интересная закономерность. В отличие от эталонного штамма, у которого в культуре клеток биопленки частота адаптивных мутантов не зависит от времени инкубирования с антибиотиком, в культуре клеток биопленки штамма SCV наблюдается прямая зависимость этого показателя от времени инкубации с антибиотиком в жидкой среде, вне зависимости от числа живых клеток (рис. 2). Опираясь на эту закономерность и литературные данные, где с помощью генетического анализа доказана возможность попадания *P. aeruginosa* в организм человека не только от инфицированного человека, но и из окружающей среды [8], можно предположить, что изначально штаммы с мелкими колониями не обладают множественной антибиотикорезистентностью, она приобретается в результате лечения.

Luján A.M. с соавторами (2011) при изучении развития биопленки у *Pseudomonas aeruginos* доказали, что под давлением селективных факторов среды могут возникать мутации, приводящие к появлению разных фенотипов колоний, в том числе и к фенотипу маленьких колоний, что приводит к увеличению эффективности адаптивной эволюции к условиям среды. Авторы подчеркивают, что подобный процесс диверсификации наблюдается при хронических инфекциях дыхательных путей [9]. Мы решили также посмотреть, появятся ли фенотипические различия колоний после инкубирования клеток биопленки на ЦПРФ. Пересев после 10-дневного инкубирования с антибиотиками на агаризованной среде показал высокую гетерогенность популяции клеток штамма *P. aeruginosa* SCV в отличие от эталонного штамма. Пересеянные колонии штамма SCV разделились как по размерам, так и по скорости роста (рис. 3 и таблица).

Результаты подсчета разных по размерам и по скорости роста колоний штамма *P. aeruginosa* SCV

Количество мелких колоний (менее 4 мм), %	Количество средних колоний (4-5 мм), %	Количество крупных колоний (более 5 мм), %	Количество колоний, не выросших при пересеве, %	Количество колоний, выросших через 7 суток после посева	Количество колоний, выросших через сутки после посева
36.6 ± 2.6*	36.59 ± 2.1	23.83 ± 4.2	2.98 ± 0.7	10 ± 3.6	3 ± 1.3

Примечание. *Результаты представлены в виде средней ± ошибка средней (n = 4;X ± m).

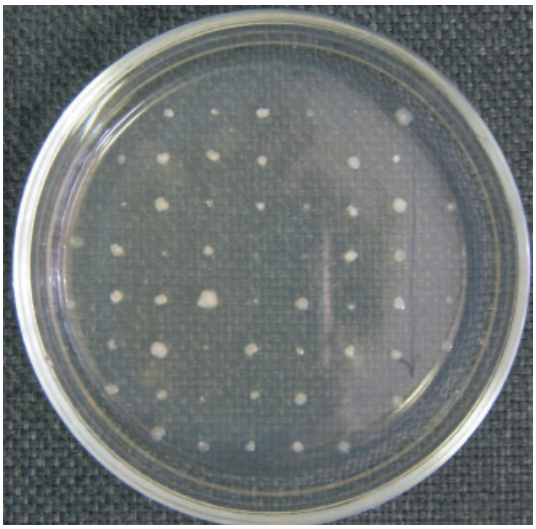

Рис. 3. Проявление гетерогенности популяции клеток штамма P. aeruginosa SCV через 7 суток после пересева с LB-агара с ЦПРФ на LB-агар без антибиотика

Следует отметить, что через сутки после пересева появились крупные и средние колонии, а через семь суток выросли мелкие колонии. В то же время все пересеянные колонии эталонного штамма появились через сутки и были приблизительно одного размера (4–5 миллиметров).

Заключение

Таким образом, в результате нашей работы получилось, что в клетках биопленки штамма *P. aeruginosa* SCV частота адаптивных мутантов напрямую зависит от времени инкубации с антибиотиком. Кроме того, после инкубации с ЦПРФ наблюдается высокая гетерогенность популяции клеток этого штамма в отличие от клеток эталонного штамма. На основании полученных результатов можно предположить, что, несмотря на изначально высокую чувствительность к ЦПРФ клеток штамма *P. aeruginosa* SCV, более длительная инкубация с антибиотиком вызывает появление клонов с высокой устойчивостью к действию антибиотика.

Список литературы

1. Магданова Л.А., Голясная Н.В. Генетическая и морфотипическая гетерогенность бактериальных популяций плавательных бассейнов // Экологическая генетика. – 2011. – Т. IX. – № 2. – С. 24–33.

2. Ciofu O. Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants / O. Ciofu,

L.F. Mandsberg, T. Bjarnsholt, T. Wassermann, N. Høiby // Microbiology – 2010. – Vol. 156. – № 4 – P. 1108–1119.

3. Cirz R.T. Defining the Pseudomonas aeruginosa SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin / R.T. Cirz, B.M. O'Neill, J.A. Hammond, S.R. Head, F.E. Romesberg // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, – № 20. – P. 7101–7110.

4. Déziel E., Comeau Y., Villemur R. Initiation of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. – № 4. – P. 1195–1204.

5. Dötsch A. The Pseudomonas aeruginosa transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing / A. Dötsch, D. Eckweiler, M. Schniederjans, A. Zimmermann, V. Jensen, M. Scharfe, R. Geffers, S. Häussler // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 – Iss. 2. – e31092.

6. Feliziani S. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis chronic airways infections / S. Feliziani, A.M. Luja´n, A.J. Moyano, C. Sola, J.L. Bocco, P. Montanaro, L.F. Canigia, C.E. Argaran˜ a1, A.M. Smania. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – Iss. 9. – e12669.

7. Juurik T. Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of Pseudomonas putida /T. Juurik, H. Ilves, R. Teras, T. Ilmja¨ rv, K. Tavita, K. Ukkivi, A. Teppo, K. Mikkel, M. Kivisaar // Plos One. – 2012. – Vol. 7 – Iss. 10. – e 48511.

8. Kidd T.J. Pseudomonas aeruginosa exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting/ T.J. Kidd, S.R. Ritchie, K.A. Ramsay, K. Grimwood, S.C. Bell, P.B. Rainey // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – Iss. 9. – e44199.

9. Luján A.M. Evolution and adaptation in Pseudomonas aeruginosa biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators / A.M. Luján, M.D. Maciá, L.Yang, S. Molin, A. Oliver, A.M. Smania.// PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – Iss. 11. – e 27842.

10. Wei Q. Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant small colony variant (SCV) of Pseudomonas aeruginosa / Q. Wei, S. Tarighi, A. Dotsch, S. Häussler, M. Müsken, V.J. Wright, M. Cámara, P. Williams, S. Haenen, B. Boerjan, A. Bogaerts, E. Vierstraete, P. Verleyen, P. Cornelis et al //PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – Iss 12 – e29276.

11. Wong A., Rodrigue N., Kassen R. Genomics of adaptation during experimental evolution of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa // PLoS Genetics. – 2012. – Vol. 8. – Iss. 9. – e1002928.

References

1. Magdanova L.A., Golyasnaya N.V. Genetic and morphotypic heterogeneity of swimming pool bacterial populations / Ekologicheskaya Genetika 2011. T. IX., no. 2. pp. 24–33.

2. Ciofu O. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants / O.Ciofu, L.F. Mandsberg, T. Bjarnsholt, T. Wassermann, N. Høiby // Microbiology 2010. Vol. 156. no. 4 pp. 1108–1119.

3. Cirz R.T. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin/ R.T. Cirz, B.M. O'Neill, J.A. Hammond, S.R. Head , F.E. Romesberg // J. Bacteriol. 2006. Vol. 188, no. 20. pp. 7101–7110.

4. Déziel E., Comeau Y., Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183. no. 4. pp. 1195–1204.

5. Dötsch A. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing / A. Dötsch, D. Eckweiler, M. Schniederjans, A. Zimmermann, V. Jensen, M. Scharfe, R. Geffers, S. Häussler // PLoS One. 2012. Vol. 7 Iss. 2. e31092.

6. Feliziani S. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections./ S. Feliziani, A.M. Luja´n, A.J. Moyano1, C. Sola, J.L. Bocco, P. Montanaro, L.F. Canigia, C.E. Argaran˜ a1, A.M. Smania. // PLoS One. 2010. Vol. 5. Iss. 9. e12669.

7. Juurik T. Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of *Pseudomonas putida* / T. Juurik, H. Ilves, R. Teras, T. Ilmja¨ rv, K. Tavita, K. Ukkivi, A. Teppo, K. Mikkel, M. Kivisaar // Plos One. 2012. Vol. 7 Iss. 10. e 48511.

8. Kidd T.J. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting/ T.J. Kidd, S.R. Ritchie, K.A. Ramsay, K. Grimwood, S.C. Bell, P.B. Rainey // PLoS One. 2012. Vol. 7. Iss. 9. e44199.

9. Luján A.M. Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators / A.M. Luján, M.D. Maciá, L.Yang, S. Molin, A. Oliver, A.M. Smania // PLoS One. 2011. Vol. 6. Iss. 11. e 27842.

10. Wei Q. Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa* / Q. Wei, S. Tarighi, A. Dotsch, S. Häussler, M. Müsken, V.J. Wright, M. Cámara, P. Williams, S. Haenen, B. Boerjan, A. Bogaerts, E. Vierstraete, P. Verleyen, P. Cornelis *et al* // PLoS One. 2011. Vol. 6. Iss 12 e29276.

11. Wong A., Rodrigue N., Kassen R. Genomics of adaptation during experimental evolution of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* // PLoS Genetics. 2012. Vol. 8. Iss. 9. e1002928.

Рецензенты:

Виноградов А.Б., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологии, экологии и медицинской генетики, ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пермь;

Кузяев Р.З., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 19.12.2013.