



УДК 577.112.856.013:579.842.23.014

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ФАЗЫ РОСТА НА ЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ *Yersinia pseudotuberculosis*

© 2001 г. С. И. Бахолдина[#], И. Н. Красикова, Т. Ф. СоловьеваТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 31.08.2000 г. Принята к печати 03.11.2000 г.

Изучено влияние способа культивирования (суспензионная культура в жидкой питательной среде и колонии на поверхности плотной агаризованной среды) и фазы роста на липополисахаридный состав бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* (O : I_b-серovar, штамм KS 3058), выращенных на холоду (5°C). На обеих средах количество синтезируемого клетками липополисахарида (ЛПС) зависело от фазы роста бактерий. Степень ацилирования ЛПС была величиной постоянной, в то время как длина цепи O-специфического полисахарида варьировала с изменением возраста культуры и на обеих средах достигала максимального значения в стационарной фазе роста. Рост бактерий на питательном агаре стимулировал более интенсивный синтез ЛПС, которые экстрагировались с большей легкостью, имели более длинные O-цепи и более высокую токсичность, в сравнении с ЛПС бактерий, культивируемых на жидкой среде. Высказано предположение, что выращивание *Y. pseudotuberculosis* на холоду в виде колоний на поверхности агара приводит к повышению вирулентности бактерий.

Ключевые слова: бактерии, способ культивирования, фазы роста; липополисахариды бактерий; токсичность; *Yersinia pseudotuberculosis*.

ВВЕДЕНИЕ

Yersinia pseudotuberculosis, возбудитель псевдотуберкулеза, способна обитать как в теплокровном организме, так и в объектах окружающей среды, сочетая паразитический и сапрофитный образ жизни. Наиболее важными в эпидемиологическом отношении свойствами псевдотуберкулезного микроба, обеспечивающими ему широкое распространение, являются его устойчивость к условиям внешней среды и способность расти при низких температурах. Бактерии псевдотуберкулеза адаптированы к колонизации твердых субстратов, в том числе пищевых продуктов, хранящихся в бытовых холодильниках. Основной резервуар *Y. pseudotuberculosis* – почва [1].

В природе бактерии часто растут на твердых поверхностях в виде агрегатов, колоний и пленок [2]. Такой рост несравненно многообразнее и сложнее роста суспензионных культур [3]. Особенностью роста в виде колоний на твердых средах является создание физиологической “тесноты” для микроорганизмов, так что каждый из них должен конкурировать с другими за имеющиеся в

наличии ограниченные количества питательных веществ и кислорода [4]. Прикрепление бактерий к поверхности дает им некоторые преимущества для выживания, связанные прежде всего с увеличением их устойчивости по отношению к антимикробным веществам и защитным системам макроорганизма, по сравнению с планктонно-растущими клетками [5].

В способности грамотрицательных бактерий к адаптации важную роль играют липополисахариды [6, 7], которые являются основными компонентами внешнего слоя наружной мембраны [8]. Имеются данные, что способ культивирования оказывает существенное влияние на молекулярно-массовое распределение ЛПС [9, 10]. Так, было показано, что *Helicobacter pylori*, культивируемые на жидкой питательной среде, продуцировали высокомолекулярные ЛПС, в то время как рост клеток на плотной среде приводил к синтезу низкомолекулярных ЛПС [9]. Напротив, ЛПС профили у *Pseudomonas aeruginosa*, растущих на агаре или в виде суспензии клеток, были идентичными по молекулярной массе, в то время как клетки, растущие в виде биопленок, содержали повышенное количество низкомолекулярных ЛПС в сравнении с бульонными культурами [10].

ЛПС бактерий псевдотуберкулеза достаточно хорошо изучены [11–14]. Однако имеющиеся в литературе данные получены в основном для периодических жидких культур одной фазы роста.

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ДПС – деградированный липополисахарид; СА – степень ацилирования; СП – степень полимеризации; ПБ – питательный бульон; ПА – питательный агар; НТДА – 3-гидрокситетрадекановая кислота; Нер – гептоза.

[#] Автор для переписки (тел.: (4232) 31-07-19; факс: (4232) 314050; e-mail: piboc.@stl.ru).

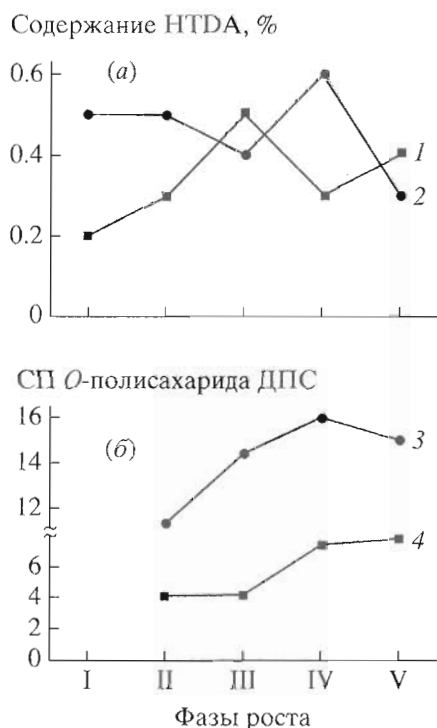


Рис. 1. Содержание 3-гидрокситетрадекановой кислоты в клетках (на сухой вес бактерий) (а) и степень полимеризации деградированных полисахаридов (б) *Y. pseudotuberculosis*, выращенных на питательном бульоне (1, 4) и на питательном агаре (2, 3), в разных фазах роста: I – логарифмическая, II – фаза инейного роста, III – ранняя стационарная, IV – стационарная, V – поздняя стационарная фазы.

В настоящем исследовании мы приводим данные, свидетельствующие о том, что способ культивирования *Y. pseudotuberculosis* (О : 1b-серovar, штамм KS 3058) и возраст клеток влияют на синтез ЛПС и его биологические характеристики. Эксперимент проводили на «холодовых» вариантах бактерий, поскольку низкая температура стимулирует более интенсивный рост и размножение клеток этого микроорганизма [15], что дает возможность работать с большим количеством биомассы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа посвящена сравнительному изучению ЛПС иерсиний псевдотуберкулеза, культивируемых в виде суспензии клеток (питательный бульон, ПБ) и в виде колоний на поверхности агара (агаризованный питательный бульон, ПА), на разных стадиях развития клеток в соответствии с кривыми роста, полученными нами ранее [16]. Для этого были определены содержание ЛПС и его выход, степень полимеризации (СП) *O*-специфического полисахарида и степень ацилирования (СА) остатков 3-гидрокситетрадекановой кисло-

ты (HTDA), входящей в состав липидного фрагмента ЛПС.

Содержание ЛПС оценивали по количеству HTDA в щелочных гидролизатах сухих бактерий. Эта кислота – обязательный структурный элемент ЛПС [17], который отсутствует в других липидных компонентах *Y. pseudotuberculosis* [18]. Ее количество в клеточных гидролизатах соответствует количеству ЛПС, присутствующего в клетках, что часто используется для определения содержания ЛПС [14].

Как следует из данных, приведенных на рис. 1, содержание HTDA в гидролизатах зависело от фазы роста бактерий, при этом динамика изменений в колониальных и суспензионных культурах была различной. В бактериях, растущих на ПБ, наблюдалось постепенное увеличение количества этой кислоты, достигающее максимального значения в ранней стационарной фазе. Напротив, в колониальных культурах ее содержание, с незначительными колебаниями, оставалось постоянным и на всех стадиях роста было выше, чем у суспензионных культур. Таким образом, в клетках *Y. pseudotuberculosis*, растущих в виде колоний на поверхности агара, ЛПС синтезируется с большей интенсивностью и в большем количестве, чем в клетках, растущих на жидкой питательной среде. Это, по-видимому, объясняется более низкой удельной скоростью роста колоний бактерий по сравнению с суспензионными культурами [16], поскольку, как было показано ранее на примере *P. aeruginosa*, медленно растущие клетки характеризуются более высоким содержанием ЛПС [19].

Электрофорез лизатов клеток в полиакриламидном геле в присутствии детергента показал, что ЛПС суспензионных и колониальных культур *Y. pseudotuberculosis* представляют собой смесь молекул S-формы, различающихся по длине *O*-полисахаридной цепи (рис. 2). На обеих средах относительное содержание ЛПС разных молекулярных типов регулировалось фазой роста: по мере старения клеток происходило увеличение количества высокомолекулярной популяции ЛПС, о чем свидетельствует увеличение интенсивности окрашивания ЛПС полос в верхней части геля [10]. Бактерии, растущие в виде колоний на поверхности агара, на всех стадиях роста имели более интенсивно окрашенную зону, соответствующую ЛПС с длинными *O*-цепями, в сравнении с бактериями, растущими на ПБ (рис. 2).

Действительно, изучение деградированных полисахаридов (ДПС), полученных при обработке бактериальных клеток 10% уксусной кислотой [20] и в структурном отношении идентичных *O*-специфическому полисахариду *Y. pseudotuberculosis* О1 : b-серовара [11], показало, что степень полимеризации их *O*-полисахаридов зависела от способа культивирования. ДПС бактерий, выращенных

Выход, некоторые химические характеристики и токсические свойства ЛПС из *Y. pseudotuberculosis*, выращенной на питательном бульоне и питательном агаре (ранняя стационарная фаза роста)

ЛПС	Выход, %		СП		СА, %		LD ₅₀ , нг/мышь	
	ПБ	ПА	ПБ	ПА	ПБ	ПА	ПБ	ПА
ЛПС-G	0.5	0.5	4.5	10.8	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
ЛПС-W	1.5	2.6	5.4	13.0	41.6	46.5	112	35
ΣЛПС	2.0	3.1	5.2	12.6	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.

ЛПС-G, ЛПС-W – липополисахаридные фракции, выделенные последовательной экстракцией по методу Галаноса и по методу Вестфалля; ΣЛПС – суммарная ЛПС-фракция; н.о. – не определяли.

на плотной среде, на всех стадиях роста имели более высокие значения СП *O*-полисахарида (в среднем в 2 раза), чем ДПС суспензионных культур (рис. 1). Независимо от способа культивирования максимальное значение степени полимеризации *O*-полисахаридов отмечалось в клетках, находящихся в стационарной фазе.

Изучение влияния способа культивирования на состав ЛПС в целом проводилось на препаратах, выделенных из бактерий, находящихся в ранней стационарной фазе. Поскольку, как было показано ранее [14], ЛПС *Y. pseudotuberculosis* представляют собой гетерогенную по степени гидрофобности популяцию молекул, для их выделения использовали последовательную экстракцию бактерий по методу Галаноса (для получения более гидрофобных ЛПС (ЛПС-G) [21]) и по методу Вестфалля (для извлечения ЛПС с длинными *O*-полисахаридными цепями (ЛПС-W) [22]) (таблица). Выход ЛПС-G был низким для обеих сред. Обработка бактерий горячим водным фенолом [22] была более эффективным методом экстракции, увеличивающим выход ЛПС из суспензионных культур в 3 раза, а из бактерий, растущих на агаре – в 5 раз. В результате, хотя содержание ЛПС в обеих культурах в ранней стационарной фазе было приблизительно одинаково (рис. 1а), ЛПС-W и ЛПС в целом (ΣЛПС) выделены с большим выходом из колониальных культур.

По данным ГЖХ-анализа, все полученные ЛПС имели идентичный набор моносахаридов, характерный для ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* O : 1b-серовара [11]. При обоих способах культивирования бактерий моносахариды, входящие в состав полисахаридного звена их ЛПС, присутствовали в эквимольных количествах. Степень ацилирования остатков НТДА, определенная как мольное отношение додекановой и НТДА [14], не зависела от способа культивирования бактерий (таблица). ЛПС-G имели более короткие углеводные цепи, чем ЛПС-W. Степени полимеризации *O*-полисахаридов ЛПС-G, ЛПС-W и ΣЛПС, выделенных из клеток, растущих в виде колоний на поверхности агара, в среднем более чем в два раза превышали СП соответствующих полимеров, полученных из

клеток, растущих на ПБ, что хорошо согласуется с данными гель-электрофореза клеточных лизатов (рис. 2) и длиной цепи *O*-полисахаридов ДПС (рис. 1). Возможно, более высокая СП *O*-специфической цепи ЛПС бактерий, растущих на плотной среде, способствует более полному их извлечению в сравнении с ЛПС суспензионных культур.

Полисахаридный фрагмент ЛПС граммотрицательных патогенов играет важную роль в их устойчивости к защитным факторам зараженного организма и в силу этого – в проявлении бактериями вирулентных свойств [23]. Так, 50%-я летальная доза для “тепловых” вариантов бактерий псевдотуберкулеза, имеющих ЛПС преимущественно R-формы, была значительно выше, чем у бактерий, выращенных на холоду и синтезирующих ЛПС с длинными *O*-цепями [24]. Мы исследовали токсические свойства ЛПС-W, выделенных из бактерий при разных способах культивирования и, как следствие, имеющих разную степень по-

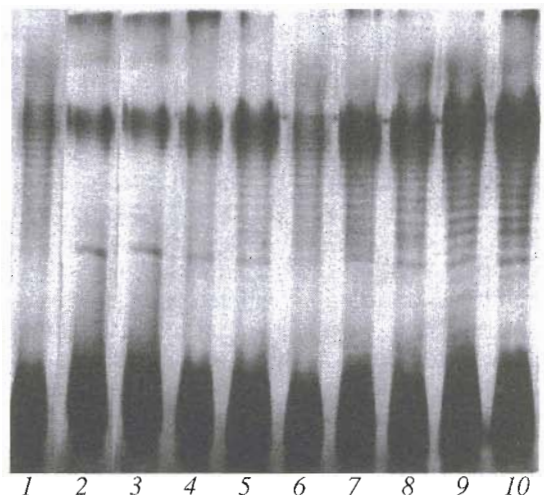


Рис. 2. Электрофоретический анализ (14% SDS-ПААГ) лизатов клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных на питательном бульоне (1–5) и питательном агаре (6–10), в разных фазах роста: логарифмической (1, 6), фазе линейного роста (2, 7), в ранней стационарной (3, 8), стационарной (4, 9) и поздней стационарной фазах (5, 10). Окрашивание ионами серебра.

лимеризации (таблица). Оказалось, что значение LD_{50} для ЛПС бактерий, выращенных на агаре, было в 3 раза меньше, чем LD_{50} для ЛПС суспензионных культур. Поскольку ЛПС имели практически одинаковые степени ацилирования (таблица), которые играют важную роль в проявлении ЛПС токсических свойств [25], можно сделать вывод, что увеличение длины цепи *O*-полисахарида способствует усилению токсичности ЛПС.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что рост *Y. pseudotuberculosis* на холоду в виде колоний, приводящий к модификации молекулы ЛПС в сторону увеличения длины *O*-полисахаридной цепи при сохранении высокой степени ацилирования липида А, делает ЛПС более токсичным, а клетку, вероятно, более устойчивой к действию защитных факторов макроорганизма и, следовательно, более вирулентной.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы определения общего содержания белка и нуклеиновых кислот были описаны ранее в работе [13].

Нейтральные сахара в виде соответствующих ацетатов полиолов и жирные кислоты в виде метиловых эфиров анализировали с помощью газожидкостной хроматографии, используя *D*-ксилозу и эйкозановую кислоту (20 : 0) в качестве внутренних стандартов. SDS-ПААГ-электрофорез был выполнен по методу [26] в 14% ПААГ, ЛПС окрашивали серебром согласно методике [27]. Клеточные лизаты приготовлены как описано в работе [28].

Бактериальные штаммы, культивирование бактерий, выделение деградированных полисахаридов и липополисахаридов. В работе использовали штамм KS 3058 *Y. pseudotuberculosis* O : Ib-серовара, полученный как описано в работе [29]. Штамм микроорганизма был типичен по своим морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным свойствам и не содержал плазмид. Бактерии псевдотуберкулеза выращивали на питательном бульоне (ПБ, Махачкала, Россия) в колбах (1 л) с интенсивной аэрацией и на питательном агаре (ПА, Махачкала, Россия) на микробиологических матрасах. Клетки бактерий собирали в разных фазах роста в соответствии с кривыми, построенными для обеих сред [16], убивали 1% раствором фенола в течение 20 мин, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 4000 об./мин в течение 20 мин и обрабатывали смесью хлороформ-метанол (2 : 1).

ЛПС выделяли последовательной экстракцией обезжиренных клеток, находящихся в ранней стационарной фазе роста, смесью фенол-хлороформ-петролейный эфир (5 : 5 : 8) по методу Галаноса [21] в модификации Квуреси [30] (G-эк-

тракция), а затем 45% горячим водным фенолом по методу Вестфала [22] (W-экстракция). Выход ЛПС-G, ЛПС-W и суммарный выход (ΣЛПС) определяли гравиметрически. ДПС получали обработкой целых бактериальных клеток 10% уксусной кислотой [20]. Препараты ЛПС и ДПС очищали от нуклеиновых кислот осаждением 50% трихлоруксусной кислотой. В очищенных образцах ЛПС и ДПС содержание НК не превышало 1–2%, белка – 3–5%.

Содержание ЛПС в клетках определяли по количеству НТДА в щелочных гидролизатах бактерий как описано в работе [14]. Степень полимеризации *O*-специфических полисахаридов ДПС и ЛПС определяли как число повторяющихся олигосахаридных звеньев и рассчитывали из отношения количества маннозы (моносахарида, входящего в состав *O*-полисахарида ЛПС *Y. pseudotuberculosis* O1 : b-серовара [11]) и суммы *L*-глицеро-*D*-манно- и *D*-глицеро-*L*-манно-гептоз (моносахаридов, входящих в состав олигосахарида кора ЛПС этого микроорганизма [12]) в кислотных гидролизатах ЛПС по формуле $СП = 2$ (число молей маннозы/моль Нер).

Степень ацилирования 3-гидрокситетрадекановой кислоты рассчитывали, определяя мольное отношение додекановой кислоты и НТДА в щелочных гидролизатах препаратов ЛПС [14]. Все данные, приведенные в работе, – результаты трех и более независимых экспериментов; диапазон экспериментальных ошибок не превышал 5%.

Определение острой токсичности осуществляли по методу Галаноса [31] при совместном внутрибрюшинном введении мышам солянокислого *D*-галактозамина (15 мг) и ЛПС (0.02–2 мкг). Учитывали число животных, умерших в течение 48 ч. LD_{50} рассчитывали по методу Новотны [32].

Работа выполнена при финансовой помощи фонда поддержки образования “Эль-Пао”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сомов Г.П. // Журн. микробиол. и иммунол. 1997. № 5. С. 7–11.
2. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scot H.M. // Annu. Rev. Microbiol. 1995. V. 49. P. 711–745.
3. Паников Н.С. Кинетика роста микроорганизмов. М.: Наука, 1991.
4. Роуз Э. Химическая микробиология: Пер. с англ. М.: Мир, 1971.
5. Shapiro J.A. // Annu. Rev. Microbiol. 1998. V. 52. P. 81–104.
6. Vuorio R., Vaara M. // Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy. 1992. V. 36. P. 826–829.
7. Nikaido H., Vaara T. // Microbiol. Rev. 1985. V. 49. P. 1–32.
8. Lugtenberg B., van Alpen L. // ВВА. 1983. V. 737. P. 51–115.

9. Walsh E.J., Moran A.P. // J. Appl. Microbiol. 1997. V. 83. P. 67–75.
10. Giwerzman B., Fomsgaard A., Mansa B., Hoiby N. // FEMS Microbiol. Immunol. 1992. V. 89. P. 225–230.
11. Tomshich S.V., Gorshkova R.P., El'kin Yu.N., Ovodov Yu.S. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 65. P. 193–199.
12. Томишич С.В., Горшкова Р.П., Оводов Ю.С. // Химия природн. соед. 1985. Т. 6. С. 751–755.
13. Соловьева Т.Ф., Ермак И.М., Мороз С.И., Красикова И.Н., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Фролова Г.М., Иванова Е.П., Тимченко Н.Ф., Оводов Ю.С. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 492–500.
14. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 1519–1526.
15. Варвашевич Т.Н. Изучение изменчивости псевдотуберкулезного микроба. Дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: НИИ ЭМ СО РАН, 1978. С. 90.
16. Бахолдина С.И., Красикова И.Н., Шубин Ф.Н., Бузолева Л.С., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 2001. Т. 66 (в печати).
17. Rietschel E.Th., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahring U., Seidel U., di Padova F., Schreier M.D., Brade H. // FASEB J. 1994. V. 80. P. 217–224.
18. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Хотимченко С.В., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 338–334.
19. Gilbert P., Brown M.B.W. // J. Bacteriol. 1978. V. 133. P. 1066–1072.
20. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 549–553.
21. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. // J. Biochem. 1969. V. 9. P. 245–249.
22. Вестфаль О., Янн К. // Методы химии углеводов / Ред. Кочетков Н.К. М.: Мир, 1967. С. 325–332.
23. Valvano M.A. // Can. J. Microbiol. 1992. V. 38. P. 711–719.
24. Тимченко Н.Ф., Сомов Г.П. // Журн. микробиол. 1986. № 3. С. 34–38.
25. Moran A. // J. Toxicol.-Toxin Reviews. 1995. V. 14. P. 47–83.
26. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Tsai C.M., Frasch C.E. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115–119.
28. Hitchcock P.J., Brown T.M. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
29. Шовадаева Г.А., Шубин Ф.Н., Шагинян И.А., Марков А.П., Гинцбург А.Л., Смирнов Г.Б. // Молек. генетика, микробиол. и вирусол. 1991. Т. 11. С. 23–27.
30. Qureshi N., Takayama K. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 11808–11815.
31. Galanos C., Freudenberg M.A., Reuter W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5939–5943.
32. Nowotny A. Basic Exercises in Immunochemistry. A Laboratory Manual. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1979. P. 303–305.

The Effect of the Culturing Method and the Growth Phase on the Lipopolysaccharide Composition of *Yersinia pseudotuberculosis*

S. I. Bakholdina[#], I. N. Krasikova, and T. F. Solov'eva

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

The effects of the culturing method (suspension cultures in a liquid nutrient broth or colonies on a solid agarized medium) and the growth phase on the lipopolysaccharide (LPS) composition of *Yersinia pseudotuberculosis* (O : 1b serovar, strain KS 3058) grown in cold (5°C) were studied. The amount the LPS synthesized by cells depended on the bacteria growth phase for both media. The LPS acylation degree was constant, whereas the length of the O-specific polysaccharide chain varied with the culture age and achieved maximum in the stationary growth phase for both media. The bacteria culturing on the nutrient agar stimulated more intensive synthesis of LPS, which were extracted more easily, had longer polysaccharide O-chains, and were more toxic than LPS of the bacteria cultured in the liquid medium. It was proposed that the culturing of *Yersinia pseudotuberculosis* in cold as colonies on the agar surface causes an increase in the bacterial virulence.

Key words: bacteria, cultivation method, growth phases, lipopolysaccharides of bacteria, toxicity, Yersinia pseudotuberculosis

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (423) 231-4050; phone: +7 (423) 231-0719; e-mail: piboc@stl.ru.

The full English version of the paper is published in *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 2, and is also available (free) at <http://www.maik.ru/>.