

# Особенности формирования активных сред бактериями *Listeria monocytogenes* в зависимости от температуры культивирования и вязкости раствора

Е. В. Сысолятина<sup>1,2</sup>, М. М. Абдулкадиева<sup>3,4</sup>, А. Е. Мишина<sup>1</sup>,  
М. В. Тимакова<sup>1</sup>, Д. А. Слонова<sup>5,6</sup>, Я. М. Станишевский<sup>4</sup>, С. А. Ермолаева<sup>1,2</sup>,  
М. М. Васильев<sup>1,3</sup> и О. Ф. Петров<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет),  
Институтский пер., 9, Долгопрудный 141701, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. Н.Ф. Гамалеи», ул. Гамалеи 18, Москва 123098, Россия

<sup>3</sup> Объединенный институт высоких температур РАН, Ижорская ул., 13, стр.2, Москва  
125412, Россия

<sup>4</sup> Российский Университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва 117198,  
Россия

<sup>5</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева», ул. Саморы Машела 1, Москва  
117197, Россия

<sup>6</sup> Сколковский институт науки и технологий, ул. Нобеля 3, Сколково, Московская  
область 143026, Россия

E-mail: demiurg\_84@mail.ru

Статья поступила в редакцию 10 июля 2019 г.

**Аннотация.** Под активными средами понимают объекты, состоящие из частиц, способных к перемещению за счет потребляемой ими извне энергии. К ним относят суспензии движущихся бактерий. Установление закономерностей, описывающих поведение активных сред, является необходимым условием создания новых «умных» приборов и материалов, том числе нанодвигателей на основе микроорганизмов. В работе были изучены особенности формирования активной среды бактериями вида *Listeria monocytogenes*, особенностью которых является наличие двух способов передвижения в зависимости от окружающей температуры. Для этого была определена скорость и траектория движения микроорганизмов, выращенных при 25 °С (имеющих жгутики) и 37 °С (не имеющих жгутиков), а также при увеличении вязкости жидкости. Было показано, что имеющие жгутики листерии осуществляли активное Броуновское движение и формировали типичную активную среду. В отсутствии жгутиков (при культивировании при 37 °С) они утрачивали способность к активному передвижению, и их перемещение в физиологическом растворе соответствовало пассивному Броуновскому движению. Повышение вязкости раствора всего на 5% приводило к снижению скорости перемещения листерий с жгутиками в несколько раз, до скоростей, характерных для неподвижных листерий. Это говорит о возможном адаптационном значении данного феномена в жизненном цикле этого микроорганизма. Полученные данные могут быть использованы для регуляции скорости перемещения микроорганизмов и, значит, для воздействия на параметры активной среды. <https://doi.org/10.33849/2019115>

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Активные среды состоят из частиц, способных к самостоятельному передвижению за счет энергии, получаемой извне. Такие среды не являются равновесными и имеют ряд особенностей [1], в частности, для них характерно роение и коллективное поведение [2]. Примером естественной активной среды на макроуровне является стая птиц, стадо антилоп, толпа людей, а в микромире — движение сперматозоидов, водорослей, бактерий. В качестве искусственных активных сред выступают так называемые «микропловцы» (microswimmers): сферы и палочки-янусы, погруженные в диссипативную среду. Это частицы с выраженным пространственным градиентом физико-химических свойств в пределах одной частицы вследствие различного химического строения поверхности [3]. Примером активной системы является пылевая плазма [4], коллоидные системы [5].

Бактериальные клетки, способные к самостоятельному перемещению, также относят к микропловцам. Они могут быть использованы в качестве биороботов,

например, для целевой доставки веществ [6], для вращения микромоторов и перемещения микрообъектов [7].

В типичном случае активное движение микроорганизма (например, кишечной палочки) обусловлено наличием у него жгутиков, вращение которых за счет протонного градиента приводит к перемещению бактериальной клетки. В отсутствие аттрактантов или репеллентов перемещение носит хаотический характер по типу «прямолинейное движение – кувырок» [8].

Листерии — во многом уникальный объект для изучения параметров активной среды, ими формируемой. Листерии — грамположительные микроорганизмы палочковидной формы, имеющие средний размер порядка 1 мкм. Они могут обитать как во внешней среде (в воде, почве), так и быть внутриклеточными паразитами ряда хозяев (человека, крупного рогатого скота, овец) [9]. Для перемещения листерии реализуют 2 программы: вне организма хозяина движутся при помощи жгутиков (флагелл), а при попадании внутрь организма жертвы избавляются от жгутиков и полимеризуют белок актин цитоплазмы клетки [10]. Триггером для переключения

одного типа движения на другой является повышение температуры среды обитания листерий до 37 °С. Это приводит к нарушению формирования новых флагелл [11]. Кроме листерий подобные способы внеклеточного и внутриклеточного перемещения используют шигеллы [12] и риккетсии [13]. При этом молекулярные механизмы, обеспечивающие способность полимеризовать актин и переключать способы передвижения, не являются родственными у этих родов и появились независимо друг от друга [14]. Это может быть следствием того, что цитоплазма клетки имеет большую вязкость, чем вода во внеклеточной среде, и более эффективным способом передвижения во внутриклеточных условиях является полимеризация актина, а не использование жгутиков.

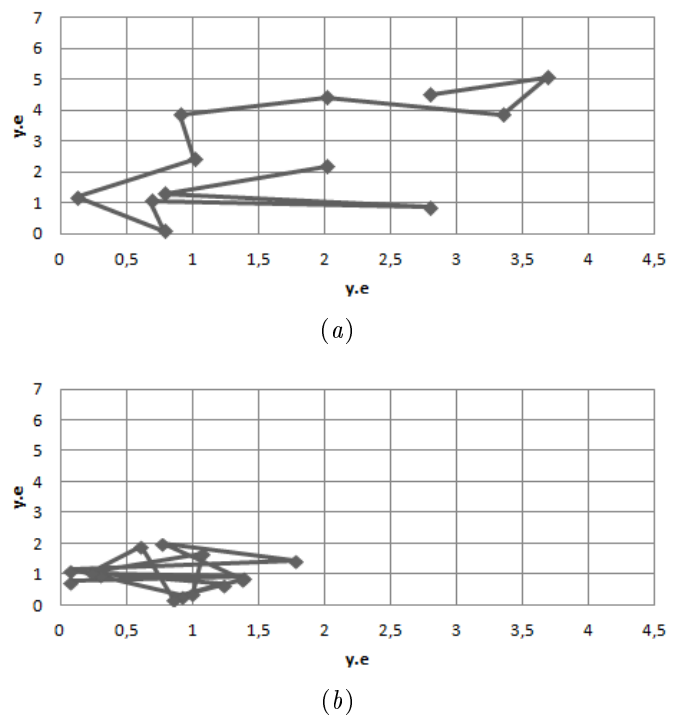
В связи с этим целью работы было определить характер и скорость движения *L.monocytogenes* в активных средах в зависимости от температуры инкубации и вязкости среды.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали лабораторный штамм *L.monocytogenes* EGDe. Бактерии рутинно культивировали на твердой питательной среде ВНИ (Brain Heart Infusion, Difco). Для ночной культуры единичную колонию вносили в 3 мл жидкой среды ВНИ, инкубировали 18 ч при 37 °С и шутелировании. Далее 1 мл ночной культуры вносили в 100 мл стерильной жидкой среды ВНИ и проводили инкубацию либо при температуре 25 °С, либо при 37 °С в течение 18 ч. Бактериальную массу полученной суспензии осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин, после чего разводили до концентрации  $1,5 \times 10^{11}$  клеток/мл. В качестве среды для разведения использовали фосфатно-солевой буфер (PBS) и растворы сахарозы концентрацией 0.5М и 2М.

В полученные образцы объемом 1 мл вносили 50 мкл витального красителя метиленового синего (ООО «Реахим», Россия). Через 10 мин, после окрашивания бактерий в синий цвет, отбирали 30 мкл суспензии из каждого образца и вносили в ячейки камеры для счета форменных элементов крови (камера Горяева). Она позволяет создать равномерный слой жидкости высотой 100 мкм и уменьшить ламинарный поток. Тем не менее, в физиологическом растворе удалось исключить ламинарные потоки, а в растворах сахарозы скорость течения составляла 0.4–0.5 у.е./с. Визуализацию движения бактерий производили с использованием светового микроскопа Scope A1 (Zeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз. В режиме реального времени были сняты видеоролики продолжительностью 30 с.

Для вычисления траектории и скорости движения бактерий был использован графический реактор Adobe Photoshop, позволяющий определять координаты объекта. Перемещение бактериальной клетки вычислялось по формуле  $s = \sqrt{x^2 + y^2}$ , где  $x$  и  $y$  — изменения координаты за 1 с вдоль оси  $x$  и  $y$ , соответственно. Точное время перемещения также фиксировалось. Скорость бактерии вычислялась по формуле для средней скорости  $v = \sum s_i/t$ , где  $s_i$  — длина  $i$ -го отрезка траектории,  $t$  — время наблюдения. Полученное значение скорости выражали в единицах размера бактерий (условные единицы) в секунду времени.



**Рисунок 1.** Траектории движения листерий (а) имеющих жгутики (25 °С) и (б) без жгутиков (37 °С).

Для каждой точки был проведен подсчет для 5 бактериальных клеток с одного видеоролика. Все эксперименты проводились в трипликате, всего их было проведено 5.

Статистическая обработка результатов проводилась пакетом Microsoft Excel.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Температура инкубирования определяет подвижность листерий и формирование ими активной среды

Для листерий, выращенных при температуре 25 °С и 37 °С, то есть имеющих жгутики (флагеллы) и не имеющих их, были определены скорости передвижения и траектории. Было установлено, что средняя скорость для имеющих жгутики листерий составила  $2.05 \pm 0.15$  у.е./с (1 у.е. — это длина бактериальной клетки, приблизительно 1 мкм) (таблица 1). Листерии без жгутиков перемещались со скоростью  $1.41 \pm 0.21$  у.е./с, что на 31% медленнее ( $p < 0.05$ ).

Траектории движения микроорганизмов показывают, что листерии, имеющие жгутики, перемещаются в пространстве (рисунок 1(а)), и их траектории подходят под описание активного Броуновского движения, характерного для частицы, имеющей начальную скорость в определенном направлении [15]. Для не имеющих флагеллы листерий (при 37 °С) характерно так называемое пассивное Броуновское движение, так как они колеблются вокруг своей оси (рисунок 1(б)).

Полученные данные полностью согласуются с представлением, что повышение температуры инкубации листерий до 37 °С приводит к нарушению формирования ими флагелл. Такие микроорганизмы не являются подвижными. Листерии, выращенные

Таблица 1. Скорости движения листерий в зависимости от температуры и растворителя

Средняя скорость	Листерии, имеющие жгутики (25 °С)			Листерии без жгутиков (37 °С)		
	PBS	0.5М сахараза	2.5М сахараза	PBS	0.5М сахараза	2.5М сахараза
у.е./с	2.05±0.15	0.84±0.05	0.84±0.10	1.41±0.21	1.03±0.25	1.18±0.29

при 25 °С, имеют жгутики и ведут себя как типичные «микропловцы» (например *Escherichia coli*), формируя активные среды [16].

### Повышение вязкости среды приводит к прекращению активного движения листерий

Следующей задачей, поставленной нами, была оценка влияния вязкости среды на двигательную активность листерий. Листерии, попадая в организм человека, вначале теряют флагеллы вследствие повышения температуры окружающей среды, а затем, проникая в эукариотические клетки, используют альтернативный путь перемещения в цитоплазме, используя для этого полимеризацию актина. Возможно, переход к такому способу передвижения связан с тем, что цитоплазма имеет вязкость примерно в 10–18 раз выше, чем вязкость воды [17], и при таких показателях активное перемещение при помощи жгутиков становится невозможным.

Для повышения вязкости среды мы использовали раствор сахаразы. При комнатной температуре (25 °С) 0.5М раствор сахаразы имеет вязкость  $1.0556 \cdot 10^{-3}$  Па·с, а 2М раствор —  $1.3445 \cdot 10^{-3}$  Па·с при показателе вязкости для воды  $1.004 \cdot 10^{-3}$  Па·с [18].

Расчет скорости движения листерий, имеющих флагеллы, показал, что уже в 0.5М сахаразе наблюдалось резкое замедление перемещения бактерий с  $2.05 \pm 0.15$  до  $0.84 \pm 0.05$  у.е./с (без учета ламинарных течений) (таблица 1). В растворе сахаразы с концентрацией 2М показатель был аналогичным —  $0.84 \pm 0.1$  у.е./с. В обоих случаях различия между группами являлись достоверными ( $p < 0.05$ ), следовательно, даже незначительное повышение вязкости раствора на  $0.0516$  (с  $1.004$  до  $1.0556$ )  $\cdot 10^{-3}$  Па·с приводило к снижению скорости передвижения листерий при помощи жгутиков на 59%, а с учетом ламинарного течения — в несколько раз.

Для проверки гипотезы, что замедление движения может быть связано с токсическим гиперосмотическим эффектом раствора сахаразы, делали серию десятикратных разведений и высевы из используемых в работе образцов. Антибактериальный эффект при инкубации микроорганизмов в 0.5М и 2М сахаразе обнаружен не был.

Для листерий, выращивавшихся при 37 °С и не имеющих жгутиков, различия в средней скорости перемещения в зависимости от вязкости не являлись достоверными (таблица 1). Однако при сравнении скорости передвижения листерий с флагеллами и без них в растворах сахаразы было установлено, что кажущиеся различия в средних значениях для этих групп также недостоверны ( $p > 0.05$ ). Таким образом, при повышении вязкости раствора листерии, способные к передвижению при помощи жгутиков, вели себя как пассивные броуновские частицы.

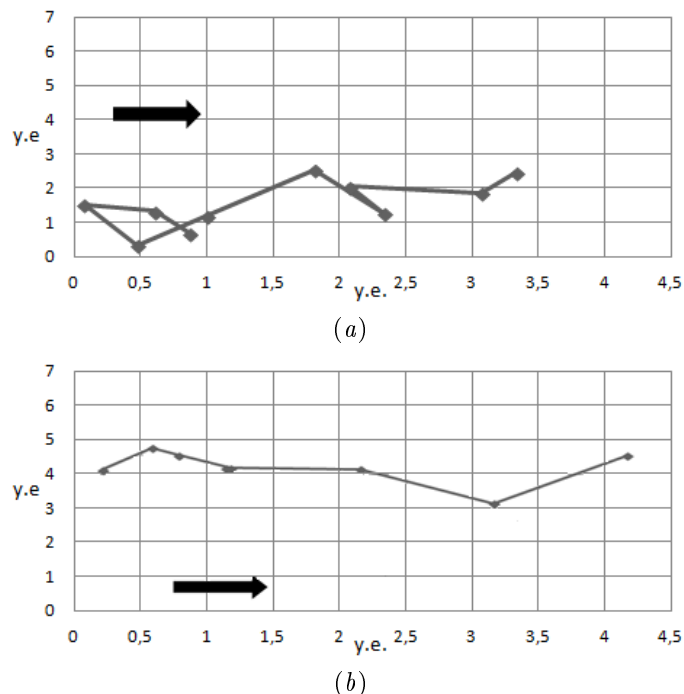


Рисунок 2. Траектории движения листерий в 0.5М сахаразе (а) имеющих жгутики (25 °С) и (б) без жгутиков (37 °С) без коррекции на направление течения ламинарного потока. Стрелкой указано движение жидкости.

Интересно, что в растворе сахаразы уже при ее концентрации 0.5М траектории движения подвижных и неподвижных листерий в целом совпали (рисунок 2). При этом для листерий без жгутиков наблюдался переход от колебательных движений к более направленным, что, по-видимому, связано с наличием ламинарных течений вязкой среды, минимизировать которые не удалось. В растворе сахаразы 2М наблюдалась та же картина.

Таким образом, листерии, выращенные при 25 °С и имеющие жгутики, формируют в физиологических растворах типичные активные среды, в которых их движение характеризуется как активное Броуновское. Но даже незначительное увеличение вязкости среды приводит к потере способности листерий к активному самостоятельному передвижению при помощи имеющихся жгутиков. Скорость и траектории движения в 0.5М и 2М сахаразе аналогичны показателям, характерным для неподвижных форм, выращенных при 37 °С. Это отличает листерий от кишечной палочки и спирохет (например, лептоспир), которые, наоборот, способны двигаться быстрее, находясь в вязкой среде [19].

В настоящее время ведутся работы по подбору условий и созданию штаммов микроорганизмов, которые бы позволили тонко регулировать скорость и направление движения клеток в активных средах. На-

пример, используются генномодифицированные штаммы кишечной палочки, которые способны к более быстрому движению при облучении их светом [20], или клетки водорослей, обладающие фототаксисом [21]. Изменение вязкости раствора при формировании активных сред при использовании листерий может быть также использовано для регуляции скорости перемещения микроорганизмов и, значит, для воздействия на параметры системы.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*L.monocytogenes* является необычным объектом для формирования активных сред в силу того, что она может двигаться как при помощи жгутиков во внеклеточной среде, так и полимеризовать актин, находясь внутри клеток хозяев. «Переключение» способа перемещения с одного на другой регулируется изменением температуры. В работе впервые было показано, что важным механизмом, тормозящим активное движение листерий при помощи жгутиков, может быть изменение вязкости среды. Повышение вязкости жидкости, в которой находились листерии, приводило к снижению скорости их передвижения на 59% без учета ламинарного течения, что было сопоставимо с аналогичным показателем пассивного броуновского движения неподвижных листерий. Данный феномен может быть использован как простой способ регуляции параметров активных сред, образуемых листериями.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramaswamy S 2010 *Ann. Rev. Condens. Matt. Phys.* **1** 323–345
2. Schweitzer F 2007 *Brownian agents and active particles: Collective dynamics in the natural and social sciences* (Heidelberg, Germany: Springer Verlag)
3. De Gennes P G 1992 *Soft matter. Rev. Mod. Phys.* **64** 645–648
4. Koss X G, Petrov O F, Statsenko K B and Vasiliev M M 2018 *EPL* **124**(4) 45001
5. Арансон И С 2013 *УФН* **183** 87–102
6. Ravichandar J D, Bower A G, Julius A A and Collins C H 2017 *Sci Rep* **7**(1) 8959
7. Liu Z *et al* 2018 *Front Microbiol* **9** 2692
8. Sourjik V and Wingreen N S 2012 *Curr Opin Cell Biol* **24**(2) 262–268
9. Pizarro-Cerdá J and Cossart P 2018 *Microbiol Spectr* **6**(6) doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0013-2018
10. Tilney L G and Portnoy D A 1989 *J Cell Biol* **109** 1597–1608
11. Peel M, Donachie W and Shaw A 1988 *J Gen Microbiol* **134** 2171–2178
12. Ogawa H 1968 *J Med Sci Bid* **2** 259–273
13. Heinzen R A, Hayes S F, Peacock M G and Hackstadt T 1993 *Infect Immun* **61**(5) 1926–1935
14. Cossart P and Kocks C 1994 *Mol Microbiol* **13**(3) 395–402
15. Bechinger C *et al* 2016 *Rev. Mod. Phys.* **88**(4) 045006–1–045006–50
16. Berg H 2004 *E. coli in Motion* (Heidelberg, Germany: Springer Verlag)
17. Рубин Б 1971 *Курс физиологии растений* (Москва: Высшая школа)
18. Равдель А А и Пономарева А М 1983 *Краткий справочник физико-химических величин* (Ленинград: Химия)
19. Berg H C and Turner L 1979 *Nature* **278** 349–351
20. Vizsnyiczai G *et al* 2017 *Nat. Commun.* **8** 15974
21. Nagai M, Hirano T and Shibata T 2019 *Micromachines (Basel)* **10**(2) E130