

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

Е. В. Сысолятина^{1,2}, М. М. Абдулкадиева^{3,4}, А. Е. Мишина¹,
М. В. Тимакова¹, Д. А. Слонова^{5,6}, Я. М. Станишевский⁴, С. А. Ермолаева^{1,2},
М. М. Васильев^{1,3} и О. Ф. Петров^{1,3}

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

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

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

⁴ Российский Университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва 117198,
Россия

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

⁶ 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 стада 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.

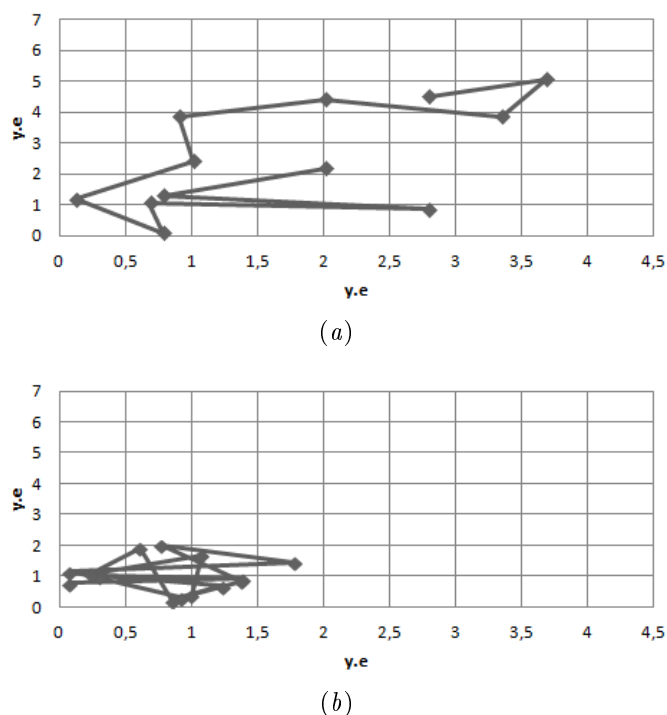


Рисунок 1. Траектории движения листерий (а) имеющих жгутики (25 °С) и (б) без жгутиков (37 °С).

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 ± 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 ± 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 °C)			Листерии без жгутиков (37 °C)		
	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 °C, 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 флагаеллы 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 сахарозы. При комнатной температуре (25 °C) 0.5М раствор сахарозы 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 флагаеллы, показал, что уже в 0.5М сахарозе наблюдалось резкое замедление перемещения бактерий с 2.05 ± 0.15 до 0.84 ± 0.05 у.е./с (без учета ламинарных течений) (таблица 1). В растворе сахарозы с концентрацией 2М показатель был аналогичным — 0.84 ± 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 сахарозы, делали серию десятикратных разведений и высевы из используемых в работе образцов. Антибактериальный эффект при инкубации микроорганизмов в 0.5М и 2М сахарозе обнаружен не был.

Для листерий, выращивавшихся при 37 °C 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 флагаеллами и без них в растворах сахарозы 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.

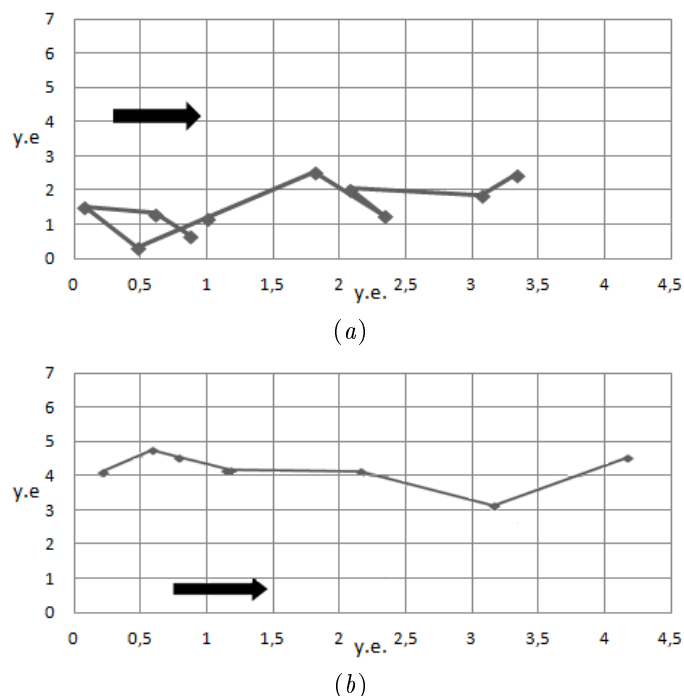


Рисунок 2. Траектории движения листерий в 0.5М сахарозе (a) имеющих жгутики (25 °C) и (b) без жгутиков (37 °C) без коррекции на направление течения ламинарного потока. Стрелкой указано движение жидкости.

Интересно, что в растворе сахарозы 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 сахарозы 2М наблюдалась та же картина.

Таким образом, листерии, выращенные при 25 °C 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 сахарозе аналогичны показателям, характерным для неподвижных форм, выращенных при 37 °C. 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