

# КОНЬЮГАЦИОННАЯ ПЕРЕДАЧА ПЛАЗМИД Р1 ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ В *BURKHOLDERIA CEPACIA*

М.В. Морозова, Л.К. Меринова, И.К. Сеимова, Д.В. Викторов

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

*Burkholderia cepacia* – микроорганизм, широко распространенный во внешней среде и вызывающий различную патологию у высших растений [6, 7]. В последнее время этот бактериальный вид все чаще упоминается среди оппортунистических патогенов человека, вызывающих тяжелые инфекции у больных с различными иммунодефицитными состояниями [3, 4, 5, 7]. Способность этих высокорезистентных к антимикробным веществам бактерий размножаться в растворах антисептиков представляет серьезную опасность как фактор распространения внутрибольничных инфекций [7, 11, 14].

Являясь типовым видом нового рода *Burkholderia* [15], *B. cepacia* отличается существенной гетерогенностью изолятов, выделенных в различных экологических нишах [5, 14]. Ранее было продемонстрировано, что штаммы *B. cepacia* следует разделять как минимум на пять различных "геномных видов" или геномоваров, составляющих "комплекс *B. cepacia*" [7, 13]. Для микроорганизма характерна чрезвычайная пластичность адаптационных реакций, обусловленных специфической структурой генома – наличием нескольких хромосомных репликонов, а также собственных плазмид и фагов [3, 4, 10, 14].

Необходимым элементом исследования *B. cepacia* является разработка систем генетического анализа. Конъюгация может служить эффективным методом изучения генома этого микроорганизма. К перспективным факторам конъюгационного переноса необходимо отнести, прежде всего, плазмиды Р1 группы несовместимости, на основе которых осуществляется конъюгация у многих видов бактерий. В группу R-плазмид этого типа, помимо общеизвестной RP4, входят родственные ей плазмиды RP1, R68, RK2, R18. Данные плазмиды детерминируют резистентность к карбенициллину, канамицину, тетрациклину [12]. Важно, что в составе плазмид Р1 группы нередко находятся мобильные генетические элементы – транспозоны и IS-последовательности, способные к перемещению в пределах отдельных репликонов или между различными репликонами. Использование Tn-элементов для инсерционного мутагенеза создает возможности для изучения различных участков генома *B. cepacia*, идентификации отдельных генов и установления их функции. Актуальным также является исследование особенностей наследования и экспрессии у *B. cepacia* детерминант резистентности внешних плазмидных репликонов и их роли в развитии лекарственной устойчивости микроорганизма.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать эффективность конъюгационной передачи *B. cepacia* R-плазмид Р1 группы несовместимости, несущих Tn-элементы, и оценить возможность их использования для генетического анализа микроорганизма.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы и питательные среды.** В работе были использованы штаммы *B. cepacia* дикого типа 8235, 1934, 25416, 8236, 8237, 8238, 8240, 3181, 3189, Vang, а также штаммы *E. coli* KS17-1 (pSUP5011) и *E. coli* CH111 (RP1::Tn9 Rep ts). Для культивирования бактерий использовали L-агар и L-бульон ("Difco", США).

**Определение МПК антибиотиков.** Минимальные подавляющие концентрации (МПК) хлорамфеникола (Cml, Cm), тетрациклина (Tet, Tc), канамицина (Kan, Km), стрептомицина (Str), гентамицина (Gen), ампициллина (Amp), карбенициллина (Crb, Cb), полимиксина (Plm), пefлоксацина (Pfx) и цефтазидима (Caz) определяли методом разведений на плотных питательных средах.

**Химический мутагенез.** 24-часовую бульонную культуру *B. cepacia* 8235 подрощивали в свежей среде в течение 4 ч и обрабатывали 0,1%-м нитрозогуанидином (NG) в течение 60 мин. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, суспендировали в фосфатном солевом буфере pH 7,2 и высевали на пластины L-агара. Выросшие изолированные колонии переносили на L-агар с канамицином (80 мкг/мл).

**Конъюгация.** Скрещивания проводили на поверхности L-агара на мембранных фильтрах (диаметр пор 0,45 мкм) в соответствии с методом, разработанным для передачи R-плазмид Р1 группы несовместимости в *B. pseudomallei* и *B. mallei* [1]. Конъюгационные смеси инкубировали на фильтрах 18 ч при 32 °С, затем культуры суспендировали в 0,87%-м растворе NaCl и высевали на селективные среды. В случае передачи плазмиды RP1::Tn9 Rep ts в среду добавляли полимиксин (1000 мкг/мл) для подавления роста донора и хлорамфеникол (100–200 мкг/мл) для отбора Cm<sup>R</sup> трансконъюгантов. При конъюгационной передаче плазмиды pSUP5011 в селективную среду добавляли канамицин (70 мкг/мл) и полимиксин (1000 мкг/мл). За частоту конъюгационного переноса принимали отношение числа трансконъюгантов к количеству донорных клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Резистентность исходных штаммов *B. cepacia*.** Показатели устойчивости десяти штаммов *B. cepacia* к антибиотикам различных классов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Резистентность исходных штаммов *B. cepacia* к антибиотикам различных классов

Штаммы <i>B. ceracia</i>	МПК, мкг/мл								
	Kan	Tet	Cml	Plm	Amp	Str	Gen	Caz	Pfx
25416	100	50	25	10000	5000	2500	250	15	5
8235	250	50	25	10000	5000	1000	250	10	5
8236	>500	250	10	н	н	н	н	н	н
8237	500	>250	10	н	н	н	н	н	н
8238	>500	250	50	н	н	н	н	н	н
8240	>500	250	10	н	н	н	н	н	н
1934	100	250	50	н	н	н	н	н	н
3181	50	50	25	н	н	н	н	н	н
3189	250	25	5	н	н	н	н	н	н
Vang	>500	>250	50	н	н	н	н	н	н

Примечание. н – не определено.

Из полученных данных видно, что МПК Kan, Tet и Chl варьируют в зависимости от штамма. При этом наибольшую чувствительность все испытанные культуры *B. ceracia* проявляли к Cml, который подавлял рост инокулята  $5 \times 10^8$  м.к. в концентрации от 10 до 50 мкг/мл. Дополнительно для штаммов *B. ceracia* 8235 и 25416 были определены МПК некоторых антибиотиков аминогликозидного,  $\beta$ -лактамного, цефалоспоринового и фторхинолонового рядов. Установлено, что наибольшей способностью к подавлению роста инокулята  $5 \times 10^4$  м.к. обладали цефтазидим и пefлоксацин.

*Экспрессия маркеров плазмиды RP1::Tn9 Rep ts в штаммах B. ceracia.* Плазмида RP1::Tn9 Rep ts детерминирует устойчивость к Tc, Km, Cb и Cm (последний тип устойчивости опосредован находящимся в плазмидном репликоне транспозоном Tn9) и имеет температурочувствительный по репликации фенотип, позволяющий исключать ее из клеток при температуре 42 °C.

Результаты конъюгации показали, что три штамма *B. ceracia* (1932, 8235, 25416) воспринимают RP1::Tn9 Rep ts. При этом с наибольшей частотой  $n \times 10^{-2}$  происходила передача плазмиды в штамм *B. ceracia* 8235.

Передача RP1::Tn9 Rep ts существенно повысила резистентность штаммов *B. ceracia* ко всем детерминируемым плазмидой препаратам, включая резистентность к хлорамфениколу, МПК которого для культур дикого типа не превышала 25 мкг/мл (табл. 2).

Для определения выражения плазмидного признака температурочувствительности  $T^S$  в новом хозяине изолированные клоны трансконъюгантов штаммов 25416, 1934 и 8235 инкубировали на L-агаре с Cm (50 мкг/мл) при двух режимах температур (32 и 42 °C). В результате все исследованные трансконъюгантные клоны штаммов *B. ceracia* 8235 и 25416 проявляли  $T^S$ -фенотип переданной плазмиды. Штамм 1934, напротив, наследовал признак температурочувствительности в единичных случаях, однако  $T^S$  варианты этого штамма с высокой частотой ( $n \times 10^{-5}$ ) выщепляли температурорезистентные  $T^R$

клоны, что указывало на интеграцию репликона RP1::Tn9 Rep ts в хромосому *B. ceracia*.

*Инсерции Tn9 в хромосому B. ceracia.* Более 1500  $Cm^R$  трансконъюгантных температурочувствительных клонов *B. ceracia* 1934 (RP1::Tn9 Rep ts) после цикла культивирования при 42 и 32 °C по Nagayama [8] были протестированы на минимальной среде Gillardi для выявления ауксотрофов. В результате было обнаружено 9 клонов, не способных к росту на минимальной среде без специальных добавок (аминокислот или азотистых оснований). Определение их питательных потребностей по схеме Холлидея показало, что включение транспозона индуцировало ауксотрофные мутации зависимости от метионина (Met), изолейцина-валина (Ile-Val) и гистидина (His). Часть клонов характеризовалась сложными питательными потребностями, которые не были определены.

Таблица 2

**Устойчивость трансконъюгантов (RP1::Tn9Rep ts) и исходных штаммов *B. ceracia* к различным антибиотикам**

Штаммы <i>B. ceracia</i>	МПК, мкг/мл			
	Cm	Km	Tc	Cb
8235 (RP1::Tn9 Rep ts)	500	500	>500	>10 000
25416 (RP1::Tn9 Rep ts)	250	500	250	>10 000
1934 (RP1::Tn9 Rep ts)	500	500	>500	>10 000
	Chl	Kan	Tet	CrB
8235	25	100	50	5000
25416	25	100	50	5000
1934	25	100	50	2500

*Передача в B. ceracia pSUP5011.* Плазмида pSUP5011 несет два селективных признака, из которых  $Cm^R$  является собственным маркером репликона, а  $Km^R$  – маркером находящегося в ее составе транспозона Tn5. Учитывая "суицидный" характер плазмиды, отбор трансконъюгантов pSUP5011, как правило, проводят по маркеру транспозона. Обнаруже-

ние у  $Km^R$ -клонов сопутствующей устойчивости к хлорамфениколу рассматривают как свидетельство временного присутствия плазмиды в клетках в состоянии интеграции с хромосомой.

Передачу плазмиды pSUP5011 осуществляли в  $Kan^S$ -мутанты *B. ceracia* 8235, индуцированные NG. В результате конъюгационных скрещиваний *E. coli* KS 17-1 (pSUP5011) с *B. ceracia* 8235  $Km^S$  удалось отобрать 10 клонов, устойчивых к канамицину. МПК препарата для данных клонов составляла 70 мкг/мл. Частота передачи плазмиды pSUP5011 в *B. ceracia* при этом не превышала  $2 \times 10^{-7}$ . У всех  $Km^R$ -клонов проверили наличие маркера плазмиды  $Sm^R$ . Оказалось, что резистентность к хлорамфениколу сохранили два клон, кроме того, был идентифицирован  $Sm^R$ -клон, резистентность которого к канамицину не отличалась от исходного штамма дикого типа.

Как отмечалось ранее, исходный высокий уровень устойчивости штаммов *B. ceracia* к антибиотикам различных классов является серьезной проблемой при разработке эффективных систем генетического анализа данного микроорганизма, основанных на технике транспозонного мутагенеза [2, 9]. Использование температурочувствительных векторов доставки Tn-элементов либо сконструированных реципиентных штаммов, чувствительных к тем или иным антимикробным соединениям, по нашему мнению, может быть альтернативой применения сложных производных транспозонов, несущих широкие наборы детерминант лекарственной резистентности.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения данной работы осуществлена конъюгационная передача в *B. ceracia* плазмиды P1 группы несовместимости RP1::Tn9 Rep ts и самоэлиминирующегося вектора pSUP5011, перспективных для проведения у этого микроорганизма транспозонного мутагенеза и получения генетически измененных штаммов с заданными свойствами. Детерминанты резистентности RP1::Tn9 Rep ts эффективно экспрессируются в новом хозяине, повышая устойчивость штаммов *B. ceracia* к хлорамфениколу, тетрациклину, карбени-

циллину в 5 и более раз. Температурочувствительный фенотип плазмиды также стабильно проявляется в трансконъюгантах *B. ceracia*. Включение в хромосому *B. ceracia* транспозона Tn9 индуцирует образование ауксотрофных мутаций с частотой  $8 \times 10^{-3}$ . Для конъюгативного переноса репликона pSUP5011, несущего *mob* ген плазмиды RP4 и последовательность Tn5, с помощью химического мутагенеза (обработка нитрозогуанидином) получены  $Km^S$  реципиентные штаммы *B. ceracia*. Показано, что *B. ceracia* воспринимает в конъюгации "суицидный" репликон pSUP5011, наследуя с частотой  $n \times 10^{-6}$  маркер  $Km^R$  транспозона Tn5.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Меринова Л. К., Тимофеева Е. В., Сеимова И. К. // Мол. ген. микробиол. вирусол. – 1997. – № 1. – С. 14–17.
2. Abe M., Tsuda M., Kimoto M., et al. // Gene. – 1996. – Vol. 174. – P. 191–194.
3. Bevivino A., Dalmastrì C., Tabacchioni S., et al. // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – P. 846–851.
4. Brisse S., Cordevant C., Vandamme P., et al. // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 4824–4827.
5. Coenye T., Vandamme P. // Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 5. – P. 719–729.
6. Coenye T., Vandamme P., Govan J.R., et al. // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 3427–3436.
7. Govan J.R., Hughes J.E., Vandamme P. // J. Med. Microbiol. – 1996. – Vol. 45. – P. 395–407.
8. Harayama S., Tsuda M., Iino T. // Mol. Gen. Genet. – 1981. – Vol. 184. – P. 52–55.
9. Kholi A., Plesa M., Cornelis P. // Res. Microbiol. – 2003. – Vol. 154. – P. 451–455.
10. Langley R., Kenna D. T., Vandamme P., et al. // J. Med. Microbiol. – 2003. – Vol. 52. – P. 483–490.
11. Pitt T.L., Kaufmann M.E., Patel P.S., et al. // J. Med. Microbiol. – 1996. – Vol. 44. – P. 203–210.
12. Porter R.D. / Modern microbial genetics. Ed. Streips U. N., Yasbin R. E. – Wiley-Liss. Inc. – New York, 2002. – P. 463–507.
13. Vandamme P., Holmes B., Vancanneyt M., et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – Vol. 47. – P. 1188–1200.
14. Wigley P., Burton N.F. // J. Applied Microbiol. – 1999. – Vol. 86. – P. 460–468.
15. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., et al. // Microbiol. Immunol. – 1992. – Vol. 36. – P. 1251–1275.

© Коллектив авторов, 2006