

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К СТРЕПТОМИЦИНУ

А.Б. Пшеничникова, доцент, Е.С. Гаврилова, студент,
В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова
e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

Изучены электрокинетические и кислотно-основные свойства поверхности интактных клеток грамотрицательных бактерий – природного чувствительного и мутантного устойчивого к стрептомицину штаммов облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* (*M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+) и гетеротрофной бактерии *Stenotrophomonas maltophilia* – в стандартных условиях и в присутствии олеиновой кислоты. Обнаружена способность олеиновой кислоты ускорять рост и адаптацию к антибиотическому стрессу метилотрофных бактерий. Обсуждается механизм резистентности к стрептомицину.

The surface electrokinetic and potentiometric acid-base properties of whole cells of the gram-negative bacteria – natural sensitive strain and mutant streptomycin-resistant strain of the obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus quaylei* (*M. quaylei* MT and *M. quaylei* SM+) and of heterotrophic bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* – in standard growth conditions and in the presence of oleic acid were studied. An ability of oleic acid to accelerate bacterial growth and adaptation of methylotrophic bacteria to the antibiotic stress was discovered. A mechanism of resistance to streptomycin is discussed.

Ключевые слова: метилотрофные бактерии, *Stenotrophomonas maltophilia*, дзета-потенциал бактерий, потенциометрическое титрование бактерий, резистентность к стрептомицину.

Key words: methylotrophic bacteria, *Stenotrophomonas maltophilia*, zeta-potential bacteria, potentiometric acid-base titration of bacteria, streptomycin resistance.

Формирование лекарственной устойчивости у патогенных микроорганизмов является основной причиной распространения инфекционных заболеваний и необходимости разработки все новых и новых поколений антибиотиков, один из первых представителей которых – стрептомицин – использовали как противотуберкулезный препарат, а аминогликозиды II и III поколений и сегодня применяют для лечения нозокомиальных инфекций. Резистентность бактерий к аминогликозидным антибиотикам имеет сложный механизм. В зависимости от вида бактерии возможно ингибирование транспорта антибиотика, изменение его взаимодействия с мишенью – рибосомами, ферментативная модификация молекулы антибиотика [1, 2].

Устойчивость бактерий к антибиотикам повышается в ассоциатах бактерий, например, в биопленках. Такая стратегия выживания предполагает взаимодействие клеточной поверхности бактерий с поверхностью материалов или бактерий между собой. Успешная колонизация большинства тканей невозможна без адгезии патогенных бактерий [3, 4]. На адгезию бактерий к субстратам, в свою очередь, влияют физико-химические свойства поверхности бактерий, к которым относятся, прежде всего, заряд и природа функциональных групп [5, 6].

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование резистентности к стрептомицину и физико-химических свойств клеточной поверхности грамотрицательных аэробных бактерий: природного чувствительного и мутантного устойчивого к стрептомицину

штаммов облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* (*M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+) и гетеротрофной бактерии *Stenotrophomonas maltophilia*. Электрокинетические свойства поверхности бактериальных клеток характеризовали величиной дзета-потенциала, определяющей заряд и способность частиц к агрегации. Определение природы заряженных групп на поверхности клеток проводили методом быстрого потенциометрического титрования суспензии клеток. Выбор бактерий обусловлен, прежде всего, их различной устойчивостью к стрептомицину. Кроме этого, облигатная метилотрофная бактерия *M. quaylei* является удобной моделью для изучения влияния экзогенных добавок, модифицирующих клеточную поверхность, так как не способна утилизировать в качестве источника углерода органические соединения за исключением метанола. Бактерия *S. maltophilia* является распространенным возбудителем нозокомиальных инфекций [7], что обусловлено, возможно, необычным положительным зарядом поверхности этих бактерий, способствующим адгезии [8].

Результаты и их обсуждение

Бактерии культивировали в присутствии стрептомицина. За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности культуральной жидкости D при длине волны 600 нм от времени («D₆₀₀ – время»). Удельную скорость роста рассчитывали, как тангенс угла наклона прямой в полулогарифмических координатах «ln D₆₀₀ – время». Резистентность бактерий к

стрептомицину определяли по величине полумлетальной концентрации стрептомицина, соответствующей удельной скорости роста, равной половине максимальной (рис. 1). Полумлетальная концентрация стрептомицина для *M. quaylei* SM+ оказалась самой высокой (4.40 мг/мл), для *M. quaylei* MT – самой низкой ($5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). *S. maltophilia* занимает промежуточное положение по устойчивости к антибиотику между чувствительным и устойчивым штаммами (1.30 мг/мл).

Достаточно высокая устойчивость к аминокликозидам у *S. maltophilia* может быть обусловлена несколькими механизмами. Некоторые штаммы *S. maltophilia*, по данным [9], обладают дегуанидазой – ферментом, который способен отщеплять гуанидиновые группы в молекуле стрептомицина с образованием метил-амина, и могут использовать стрептомицин в качестве субстрата. Большое значение в формировании устойчивости к аминокликозидам у *S. maltophilia* имеет ограничение транспорта антибиотиков этого класса в клетку [7] и система активного эффлюкса [10, 11].

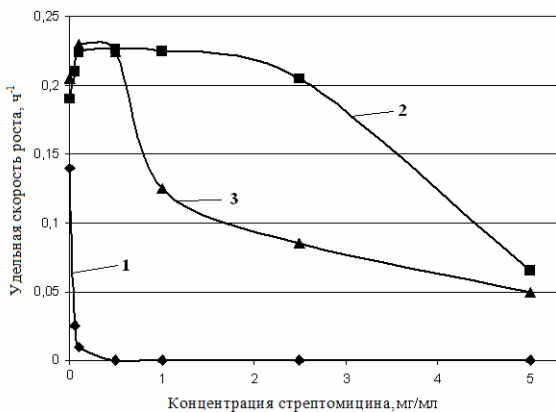


Рис. 1. Влияние стрептомицина на рост бактерий: 1 – *M. quaylei* MT; 2 – *M. quaylei* SM+; 3 – *S. maltophilia*.

Ранее нами было обнаружено, что экзогенные жирные кислоты и их метиловые эфиры являются ростовыми факторами и адаптогенами метилотрофной бактерии *M. quaylei* MT, т.е. ускоряют рост и повышают ее выживаемость в условиях осмотического стресса [12]. Наибольший эффект проявила олеиновая кислота (ОК). Добавление в питательную среду олеиновой кислоты в концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М существенно увеличивало выход биомассы и удельную скорость роста метилотрофных бактерий. Влияние олеиновой кислоты на ростовые характеристики *S. maltophilia* и *M. quaylei* SM+ изучено не было, поэтому мы исследовали сравнительную кинетику роста *M. quaylei*, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* в присутствии ОК (рис. 2). Интервал концентраций ОК выбирали, исходя из значений критической концентрации мицеллообразования (ККМ) для жирных кислот,

составляющую величину порядка $5 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ М [13]. Кроме этого, учитывали известный факт, что в культуральной жидкости бактерий присутствуют свободные жирные кислоты в концентрациях не более $2 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-4}$ М [12, 14], то есть в виде отдельных молекул.

В результате было установлено, что экзогенная олеиновая кислота ускоряет рост *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+, что согласуется с данными [12], и практически не влияет на рост *S. maltophilia* (см. рис. 2).

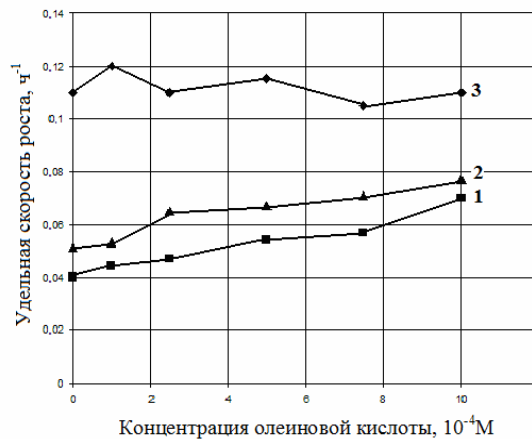


Рис. 2. Влияние экзогенной олеиновой кислоты на рост бактерий: 1 – *M. quaylei* MT; 2 – *M. quaylei* SM+; 3 – *S. maltophilia*.

Для изучения влияния олеиновой кислоты на адаптацию бактериальных клеток к антибиотическому (стрептомициновому) стрессу была определена выживаемость *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ на метанолсодержащих твердых питательных средах, содержащих стрептомицин (табл. 1). Рост *S. maltophilia* практически не зависел от концентрации стрептомицина в питательной среде, поэтому этот штамм в эксперимент включен не был. На твердые среды высевали клетки, выращенные на жидкой питательной среде либо в стандартных условиях, либо в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М олеиновой кислоты. Определение выживаемости *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ осуществляли методом подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), как описано в [12]. Концентрации стрептомицина выбирали близкие к полумлетальным: для *M. quaylei* MT – 0.01 мг/мл; для *M. quaylei* SM+ – 2 и 4 мг/мл. Результаты эксперимента представлены в табл. 1. Бактерии, выращенные в присутствии ОК, обладали повышенной выживаемостью на твердой питательной среде, содержащей стрептомицин, что свидетельствует об ускоряющем и адаптогенном действии ОК на *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+.

Метод подсчета КОЕ на метанолсодержащей среде исключает возможный вклад гетеротрофных контаминантов, содержание которых могло увеличиваться в присутствии гидро-

фобных добавок, поэтому полученные результаты являются достоверными. Результаты, полученные по данным определения оптической плотности на жидких питательных средах (рис. 2), таким образом, получают дополнительное подтверждение.

Далее мы исследовали заряд клеточной поверхности штаммов *M. quaylei* МТ, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia*. Его определяли по электрокинетическому потенциалу ζ – дзета-потенциалу, который, в свою очередь, может быть рассчитан по подвижности бактерий в

электрическом поле [3, 5]. При значениях pH ниже изоэлектрической точки (ИЭТ) целых клеток заряд бактериальной поверхности положителен. ИЭТ большинства бактерий находится в интервале 1.5–4.5 [15], поэтому при физиологических значениях pH поверхность большинства бактерий заряжена отрицательно. Интересно, что ИЭТ бактерии *S. maltophilia*, по данным [8], составляет величину 11 единиц, поэтому поверхность клеток *S. maltophilia* при pH < 11, т.е. в физиологических условиях, заряжена положительно.

Таблица 1. Влияние экзогенной олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М) в составе жидкой среды культивирования на выживаемость *M. quaylei* и *M. quaylei* SM+ на твердых средах в присутствии стрептомицина.

Штамм	Выживаемость, %					
	Концентрация стрептомицина, мг/мл					
	0.01		2.0		4.0	
	без ОК	в прис. ОК	без ОК	в прис. ОК	без ОК	в прис. ОК
<i>M. quaylei</i> МТ	46.9±2.28	66.5±1.15	0	0	0	0
<i>M. quaylei</i> SM+	82.6±1.66	100.2±1.81	61.4±1.86	105.6±2.02	39.1±0.78	52.3±2.63

Величину ζ -потенциала бактерий, выращенных в стандартных условиях и в присутствии экзогенной олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М), определяли в 0.1 М растворе KCl при различных значениях pH (табл. 2). В отсутствие ОК значения ИЭТ для *S. maltophilia* – 9.5, а для метилотрофов – около 2, поэтому поверхность клеток *S. maltophilia* заряжена положительно при pH < 9.5, а у метилотрофных бактерий – отрицательно при pH > 2.0. Эти результаты согласуются с данными [8, 15]. Наличие положительного заряда на поверхности *S. maltophilia* электростатически затрудняет адсорбцию стрептомицина, представленного при pH 7.0 в основном протонированными молекулярными формами (pK_a стрептомицина 8.7 [16]). Это, очевидно, является дополнительной причиной высокой резистентности данных бактерий к стрептомицину.

Величина ζ -потенциала клеток *M. quaylei* SM+ во всем диапазоне pH несколько выше, чем у *M. quaylei* МТ (табл.2), т.е. отрицательный заряд меньше. Добавление ОК в среду культивирования приводит к увеличению отрицательного заряда клеток, наиболее существенно – для *M. quaylei* SM+, для *S. maltophilia* – менее чем на 1 мВ. Поскольку последняя бактерия является гетеротрофной, ОК может ею утилизироваться. Тогда как метилотрофные бактерии, возможно, включают ОК в наружную мембрану, как это наблюдается при взаимодействии ОК с липосомами [17].

Для проверки этого предположения нами были определены значения ζ -потенциала клеток исследуемых штаммов, обработанных буферным раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Таблица 2. Значения ζ -потенциала бактерий *M. quaylei* МТ, *M. quaylei* SM+*S. maltophilia* при различных pH в 0.1 М KCl.

Штамм	Содержание ОК в среде культивирования, М	ζ -потенциал, мВ				
		Значение pH				
		1.9	3.4	7.0	9.6	11.0
<i>M. quaylei</i> МТ	-	7.25	-33.80	-40.97	-49.38	-52.16
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	-*	-37.40	-44.48	-54.31	-
<i>M. quaylei</i> SM+	-	15.85	-32.17	-39.03	-40.81	-42.18
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	-	-45.39	-54.56	-56.62	-
<i>S. maltophilia</i>	-	6.09	0.14	0.71	-0.85	-26.58
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	-	-1.82	-0.42	-1.19	-

* При pH 1.9 и 11.0 измерения для клеток, выращенных в присутствии ОК, не проводили.

Как известно, БСА связывает жирные кислоты [18], однако ζ -потенциал клеток, обработанных БСА и выращенных в стандартных условиях и в присутствии ОК, увеличивался незначительно (менее чем на 2%). Это свидетельствует о более прочном, по сравнению с электростатическим, связывании ОК с поверхностью и подтверждает предположение о включении ОК в наружную мембрану, которая приобретает дополнительные СОО-группы на своей поверхности. Более положительные значения ζ -потенциала бактерий *M. quaylei* SM+, чем у *M. quaylei* MT, могут отражать изменившееся в сторону увеличения соотношение N/P

(белок/липополисахарид) у мутантного штамма [19].

Включение олеиновой кислоты в мембрану может оказывать влияние на размер частиц. Мы определили размеры бактериальных агрегатов методом динамического рассеяния света с использованием фотон-корреляционной спектроскопии (табл. 3). Для *M. quaylei* обнаружено образование многоклеточных кластеров, которые формируются, возможно, за счет взаимной адгезии. Экзогенная ОК уменьшает размер бактериальных конгломератов, т.е. является антиадгезином. Этот эффект может быть основной причиной ускорения роста бактерий в присутствии ОК.

Таблица 3. Размер агрегатов бактерий *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* при различных значениях pH и ионной силе 0.1 М.

Штамм	Содержание ОК в среде культивирования, М	Размер агрегатов, мкм		
		pH 3.4	pH 7	pH 9.6
<i>M. quaylei</i> MT	-	4.837	7.318	3.696
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	1.567	4.411	1.379
<i>S. maltophilia</i>	-	1.121	1.144	1.173
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	1.228	1.004	1.347
<i>M. quaylei</i> SM+	-	3.360	1.191	5.298
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	3.161	1.037	4.187

Изучение кислотно-основных свойств функциональных групп клеточной поверхности штаммов *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* осуществляли методом быстрого потенциометрического титрования суспензии клеток в среде 0.001 М KCl и 0.1 М HCl раствором 1 М КОН. Концентрация титранта была выбрана таким образом, чтобы конечное изменение объема титруемого раствора не превышало 10-11%. Быстрое титрование обеспечивало взаимодействие с титрантом только функциональных групп, находящихся на поверхности клеток [15]. В качестве контроля использовали титрование в отсутствие клеток.

Значения pKa заряженных групп на поверхности бактериальной клетки определяли по величинам pH, при которых титруются поверхностные функциональные группы [6, 20, 21]. Для этого проводили анализ кривых титрования бактериальных суспензий (рис. 3а). Точки эквивалентности на кривых титрования проявляются в виде скачков pH, однако корректно определить значения pH, соответствующих значениям pKa заряженных групп, по кривым титрования невозможно. Для этого обычно кривую титрования дифференцируют. Положение точек перегиба на кривой титрования соответствует максимумам на дифференциальных кривых титрования в координатах « $\delta\text{pH}/\delta\text{meqH}^+ - \text{pH}$ », где δpH – разница значений pH между исследуемым и

контрольным образцами при заданном объеме титранта; δmeqH^+ – разница объемов титранта, затраченного на титрование бактериальной суспензии и контрольного раствора при заданном значении pH. Дифференциальные кривые титрования дисперсий *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* представлены на рис. 3б.

Авторами работы [6] по данному потенциометрическому титрованию поверхности грамотрицательных бактерий были рассчитаны значения pKa, составившие 3.72 (карбоксил/фосфодиэфир), 4.85 (карбоксил), 6.56 (фосфорил), 8.79 (амин). На поверхности *S. maltophilia* были обнаружены группы с pKa 7.0 и 9.0, которые могут принадлежать белкам наружной мембраны (боковые аминокислоты лизина и аргинина и терминальные аминокислоты белка). По-видимому, именно белки ответственны за положительный заряд *S. maltophilia* [8].

У *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ обнаружены группы с pKa 3.5-4, что характерно для карбоксильных и фосфатных групп липополисахарида клеточной стенки грамотрицательных бактерий (рис. 3б) [6], и положительно заряженные при нейтральных значениях pH группы с pKa 8.0-9.0. Клетки устойчивого к стрептомицину штамма *M. quaylei* SM+ имеют на поверхности группы с pKa 9.0, возможно, принадлежащие мембранным белкам, участвующим в формировании резистентности к стрептомицину.

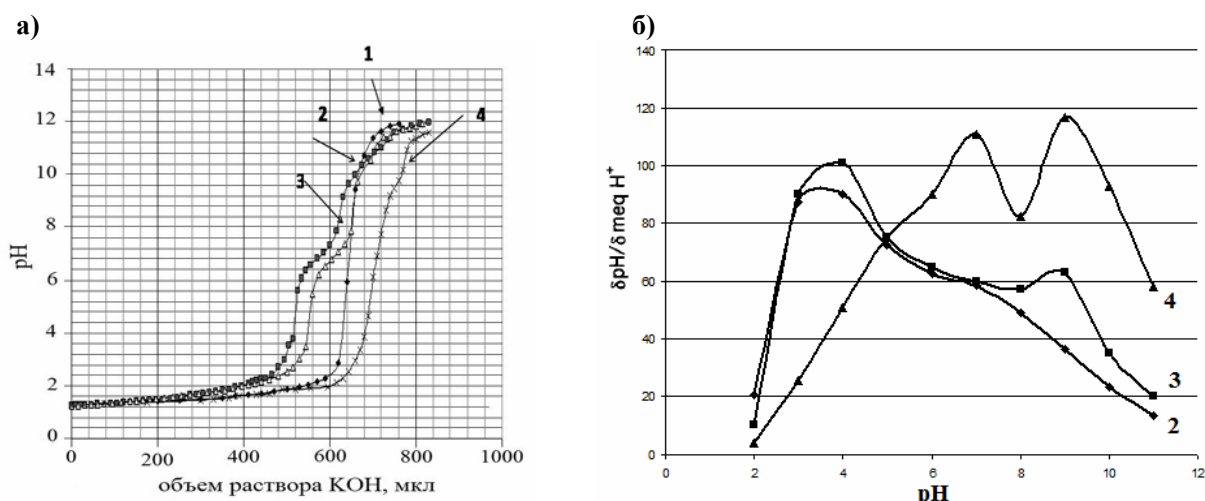


Рис. 3. Быстрое потенциметрическое титрование целых клеток в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 1 М КОН: 1 – без клеток (контроль); 2 – *M. quaylei* MT; 3 – *M. quaylei* SM+; 4 – *S. maltophilia*. а) Кривые титрования; б) дифференциальные кривые титрования.

Добавление к клеткам в процессе роста олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М) изменяет ход кривых титрования мезофильных бактерий (рис. 4), на которых обнаруживаются максимумы при pH 5 (*M. quaylei* SM+) и 6 (*M. quaylei* MT). Можно предположить, что они могут быть отнесены к карбоксильным группам включившейся в наружную мембрану олеиновой кислоты, pK_a которой в зависимости от окружения изменяется от 4 до 7 [23]. В комплексе ОК с БСА ее карбоксильная группа имеет pK_a

4.2, в фосфолипидном бислое – 7.5, в липидной микроэмульсии – 7.3 [22].

Для отнесения максимумов при pH 5 и pH 6 на дифференциальных кривых титрования (рис. 4б) нами было проведено титрование липосом из фосфатидилхолина (ФХ) и олеиновой кислоты в соотношении ФХ:ОК 1000:1 (рис. 5), результаты которого подтвердили предположение об их принадлежности к карбоксильным группам ОК в составе биологической мембраны.

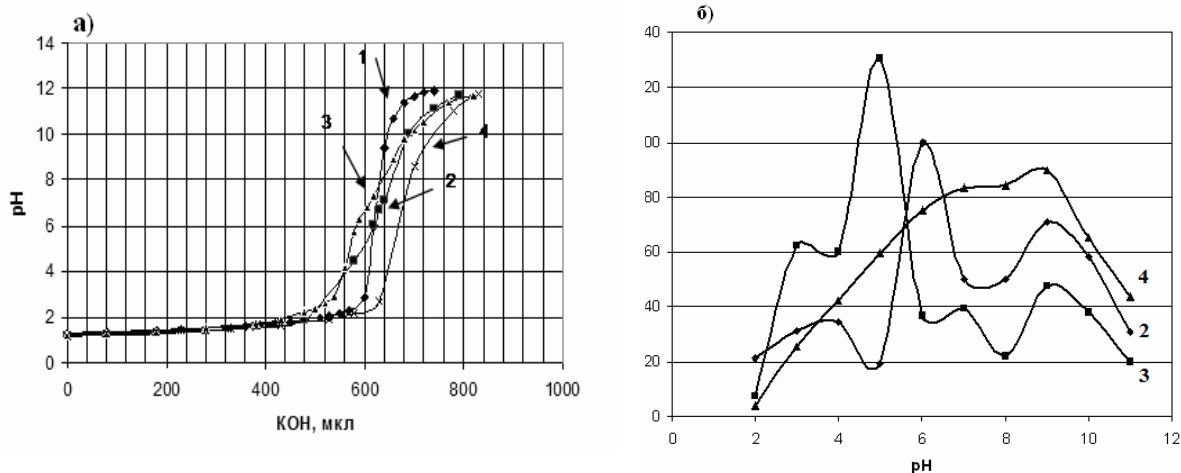


Рис. 4. Быстрое потенциметрическое титрование целых клеток, выращенных в присутствии ОК ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М), в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 1 М КОН: 1 – без клеток (контроль); 2 – *M. quaylei* MT; 3 – *M. quaylei* SM+; 4 – *S. maltophilia*. а) Кривые титрования; б) дифференциальные кривые титрования.

Значение pK_a олеиновой кислоты, локализованной в фосфолипидном бислое, зависит от функционального окружения карбоксильной группы, т.е. от состава фосфолипидов и присутствия белков. Например, значения pK_a карбоксильных групп трансмембранного белка *Lactococcus lactis* LmrP – антипортера широкого ряда антибиотиков – определяются присутствием фосфатидилэтаноламина (ФЭ), главного компонента мембраны этих бактерий [23]. Так, pK_a в

отсутствии ФЭ составляет величину 4.6, в присутствии ФЭ – 6.5. ФЭ способствует взаимодействию карбоксильных групп с мембраной и конформационным изменениям белка, определяющим его антипортерную функцию. Таким образом, полученное нами более низкое значение величины pK_a (5.0) для мутантного штамма, возможно, свидетельствует о более слабом взаимодействии ОК с мембраной, что подтверждается опытом с БСА.

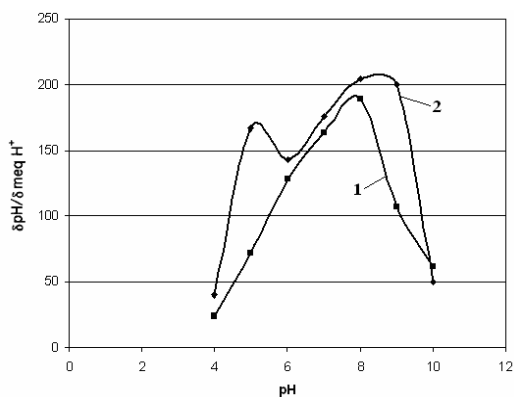


Рис. 5. Дифференциальные кривые титрования дисперсий липосом в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 1 М КОН. Состав липосом: 1 – ФХ; 2 – ФХ:ОК 1000:1 (г/г).

Степень влияния свойств клеточной поверхности на резистентность к стрептомицину необходимо оценивать в присутствии антибиотика, поскольку молекула стрептомицина содержит ионогенные группы и может взаимодействовать с заряженными группами на поверхности (рис. 6). Тем более, что клетки *M. quaylei* SM+, обладающие наибольшей резистентностью к стрептомицину, всегда выращивали в присутствии стрептомицина (обязательный компонент питательной среды).

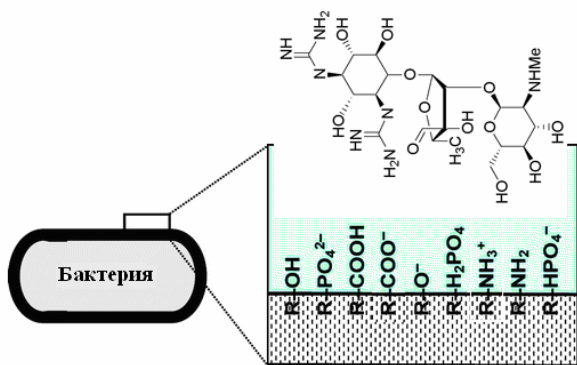


Рис. 6. Схема взаимодействия молекулы стрептомицина с функциональными группами на поверхности бактериальной клетки.

Для проведения сравнительного исследования *M. quaylei* МТ и *S. maltophilia* культивировали в присутствии стрептомицина в высоких концентрациях ($8.5 \cdot 10^{-5}$ М). Дифференциальные кривые титрования представлены на рис. 7. Дифференциальные кривые титрования *M. quaylei* МТ и *S. maltophilia*, выживших в присутствии стрептомицина, свидетельствуют об увеличении содержания функциональных групп с рКа 8.0 у *M. quaylei* МТ и снижении содержания групп с рКа 9.0 у *S. maltophilia* в процессе адаптации к стрептомицину. Возможно, в присутствии стрептомицина изменяется структура поринов – интегральных белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий, ответственных за

транспорт стрептомицина в клетку, и проницаемость для стрептомицина уменьшается. Интересно, что аналогичные процессы протекают в присутствии ОК (см. рис. 4б).

Таким образом, появление на клеточной поверхности всех исследованных штаммов грамотрицательных бактерий – и в присутствии стрептомицина, и в присутствии олеиновой кислоты – функциональных групп с рКа 8.0-9.0, характерными для аминокислотных групп белковых молекул, возможно, обуславливает повышение устойчивости этих бактерий к стрептомицину.

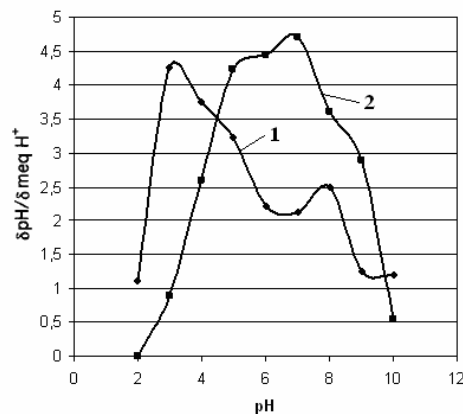


Рис. 7. Дифференциальные кривые титрования бактерий, выращенных в присутствии $8.5 \cdot 10^{-5}$ М стрептомицина, в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 0.1 М КОН: 1 – *M. quaylei* МТ; 2 – *S. maltophilia*.

Экспериментальная часть

В работе использовали облигатную метилотрофную бактерию *Methylophilus quaylei*, (штамм МТ В-2338¹ (ВКМ) и полученный ранее штамм SM+, устойчивый к стрептомицину) и бактерию *Stenotrophomonas maltophilia*, выделенные нами из утилизирующей метанол смешанной культуры [24]. Для культивирования метилотрофных бактерий использовали минеральную среду, содержащую 1 об.% метанола [12], для культивирования *S. maltophilia* метанол заменяли триптоном-бакто, 1 мас.% (Becton Dickinson, США). Для получения плотных питательных сред добавляли 1.5% агара (Becton Dickinson, США) Введение олеиновой кислоты в стерильную питательную среду осуществляли в виде метанольных растворов асептически после пропускания через мембранные фильтры 0.22 мкм Millex® GS, (Millipore, Ирландия).

Для приготовления питательных сред использовали реактивы отечественного производства («х. ч.»). Примеси насыщенных жирных кислот в коммерческой олеиновой кислоте («ч.», Химмед, Россия) удаляли при температуре -18°C осаждением из ацетона, олеиновую кислоту выделяли в виде комплекса с мочевиной как описано [25].

Бактерии выращивали в колбах объемом 250 мл (100 мл среды) на шейкере (Labline, США) при 100 об/мин и 28°C. В качестве инокулята использовали 28-часовую культуру в экспоненциальной фазе роста в количестве 2.5 об.%. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (Beckman DU-7, США) при λ 600 нм в кювете ($l = 10$ мм). Для определения кинетических параметров анализировали кривые роста бактерий « $D_{600} - \tau$ », где D_{600} – оптическая плотность культуральной жидкости при 600 нм, τ – время культивирования. Удельную скорость роста находили как тангенс угла наклона прямой в координатах « $\ln D_{600} - \tau$ » в интервале времени от 3 до 9 ч. Достоверность полученных данных оценивали по t-критерию Стьюдента. Диапазон экспериментальных ошибок определения величины удельной скорости роста не превышал 2%.

Для культивирования штамма *M. quaylei* SM+ в стандартную среду до внесения инокулята добавляли также стерильный раствор сульфата стрептомицина (AppliChem, Германия), который растворяли в стерильной дистиллированной воде и добавляли в питательную среду через 2 ч после засева бактерий. Выделение биомассы из культуральной жидкости проводили центрифугированием (15 мин при 7000 об/мин).

Выживаемость *M. quaylei* определяли высевом клеточных суспензий в семикратном разведении на стандартную агаризованную среду в оптимальных для роста условиях, а также на агаризованную среду, содержащую стрептомицин в заданной концентрации. Оптимальные для роста условия: для штамма *M. quaylei* MT – стандартные, в отсутствие стрептомицина; для штамма *M. quaylei* SM+ – в присутствии стрептомицина (1 мг/мл). На агаризованные питательные среды (2 чашки Петри со стандартной средой и содержащей стрептомицин) высевали суточную культуру, выращенную в жидкой питательной среде в присутствии $5.0 \cdot 10^{-5}$ М олеиновой кислоты, а также без добавок (контроль). Выживаемость (В) *M. quaylei* рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{N_c}{N_o} \cdot 100\%,$$

где N_c – число колоний на агаризованной среде, содержащей стрептомицин; N_o – число колоний на агаризованной среде в оптимальных для роста условиях.

Все эксперименты повторяли не менее 5 раз, рассчитывая каждое экспериментальное значение из 2-3 одновременно поставленных повторностей. Достоверность полученных данных оценивали по t-критерию Стьюдента. Диапазон экспериментальных ошибок определения величины удельной скорости роста не превышал 5%.

Измерение ζ -потенциала, электрофоретической подвижности и размеров бактериальных агрегатов проводили на приборе Delsa™ Nano Series Zeta Potential and Submicron Particle Size Analyzers (Beckman Coulter Inc., США) методом электрофоретического рассеяния под углом 30° по изменению распределения частиц в электрическом поле. Бактерии культивировали 48 ч в стандартных условиях и в присутствии олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М), центрифугировали (10 мин, 7000 об/мин) (0.6-0.9 г сухой биомассы) и четыре раза промывали 0.1 М КСl с добавлением КОН или НСl в зависимости от заданного значения рН.

Для потенциометрического титрования проводили культивирование бактерий в течение 48 ч до достижения D_{600} 1.0-1.2 (0.6-0.9 г сухой биомассы). Биомассу отделяли центрифугированием и дважды промывали 0.001 М КСl, после чего отбирали 20 мл раствора и добавляли 152 мкл конц. НСl для получения 0.1 М НСl. Отбирали 6 мл раствора и проводили титрование 1 М раствором КОН в течение 10-15 мин (таким образом, чтобы суммарный объем добавляемого титранта был не более 10% от общего объема). Те же операции (кроме центрифугирования) проводили с 0.001 М КСl в качестве контроля. Строили кривые титрования в координатах «рН – $V_{\text{КОН}}$ ». Титрование липосом проводили, начиная с рН 3.5, т.к. в более кислой области липосомы не устойчивы. Для получения дифференциальных кривых титрования рассчитывали $\delta V_{\text{КОН}}$ (разницу объемов раствора КОН, затраченных на титрование исследуемого и контрольного образцов) при заданных значениях рН – молярный эквивалент концентрации H^+ , meqH^+ . Далее определяли δpH – разницу значений рН между исследуемым и контрольным образцами при заданном значении $V_{\text{КОН}}$. Для этого брали точку на контрольной кривой с заданным значением рН и находили разность значений рН между этой точкой и значением рН образца. Затем находили величину « $\delta \text{pH} / \delta \text{meqH}^+$ ».

Заключение

Поверхность клеток метилотрофных бактерий *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ в физиологических условиях заряжена отрицательно, тогда как клетки *S. maltophilia* имеют слабый положительный заряд, обусловленный, возможно, экспонированием аминокислотных мембранных белков. Адаптация к стрептомицину сопровождается уменьшением отрицательного заряда клеточной поверхности бактерий. Олеиновая кислота – ростовой фактор и адаптоген метилотрофной бактерии *M. quaylei* – связывается с поверхностью метилотрофных штаммов, экспонируя на нее карбоксильные группы, и не обнаруживается на поверхности гетеротрофной бактерии *S. maltophilia*. Экзогенная олеиновая кислота уменьшает размер

бактериальных конгломератов, что может быть основной причиной ускорения роста бактерий в ее присутствии.

Таким образом, настоящая работа открывает возможности поиска биологически активных нетоксичных соединений, способных влиять на

свойства поверхности, патогенность и резистентность бактерий к антибиотикам.

Работа выполнена в рамках АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (госконтракт № 3.1.1/9247).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kruger A. Biologisch-naturheilkundliche Behandlung von Infektionskrankheiten // Veröffentlicht in Heilpraktiker und Volksheilkunde. 2000. № 7-8. P. 1–13.
2. Martin R.G., Rosner J.L. Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2002. V. 44. P. 1611–1624.
3. Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A.J.B. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. P. 1898–1901.
4. de Kerchove A.J., Elimelech M. Relevance of electrokinetic theory for «soft» particles to bacterial cells: Implications for bacterial adhesion // Langmuir. 2005. V. 21. P. 6462–6472.
5. Hong Y., Brown D.G. Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface // Langmuir. 2008. V. 24. № 9. P. 5003–5009.
6. Leone L., Ferri D., Manfredi C., Persson P., Shchukarev A., Sjöberg S., Loring J. Modeling the acid-base properties of bacterial surfaces: A combined spectroscopic and potentiometric study of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* // Environ. Sci. Technol. 2007. V. 41. № 18. P. 6465–6471.
7. Denton M., Kerr K.G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia* // Clin. Microbiol. Rev. 1998. V. 11. P. 57–80.
8. Jucker B.A., Harms H., Zehnder A.J.B. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and teflon // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 18. P. 5472–5479.
9. Fenton J.J., Harosch H.H., Klein D. Production of volatile nitrogenous compound from the degradation of streptomycin by *Pseudomonas maltophilia* // J. Bacteriol. 1973. V. 116. P. 1267–1272.
10. Zhang L., Xian-Zhi L., Poole K. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Involvement of a multidrug efflux system // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 287–293.
11. Alonso A., Martinez J.L. Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. V. 45. P. 1879–1881.
12. Терехова Е.А., Степичева Н.А., Пшеничникова А.Б., Швецов В.И. Метилловый эфир стеариновой кислоты – новый внеклеточный метаболит облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* // Прикл. биохимия и микробиол. 2010. Т. 46. № 2. С. 180–186.
13. Mukerjee P., Mysels K.J. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems // Nat. Stand. Ref. Data Ser., Nat. Bur. Stand. (U.S.). – Washington, 1971. № 36. 227 p.
14. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживаемости бактерий. – М.: Медицина, 2005. С. 56–57.
15. Van der Wal A., Norde W., Zehnder A.J.B., Lyklema J. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria // Colloid & Surface B. 1997. V. 9. P. 81–100.
16. Talbot P.A. Potentiation of aminoglycoside-induced neuromuscular blockade by protons *in vitro* and *in vivo* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1987. V. 241. P. 686–694.
17. Yamaguchi T., Nishizaki K., Itai S., Hayashi H., Oshima H. Physicochemical characterization of parental lipid emulsion: Influence of cosurfactants on flocculation and coalescence // Pharm. Res. 1995. V. 12. P. 1273–1279.
18. Bojesen I.N., Bojesen E. Binding of arachidonate and oleate to bovine serum albumin // J. Lipid Res. 1994. V. 35. P. 770–778.
19. Boonaert C.J.P., Rouxhet P.G. Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2548–2554.
20. Martinez R.E., Smith D.S., Kulczycki E., Ferris F.G. Determination of intrinsic bacterial surface acidity constants using a donnan shell model and a continuous pKa distribution method // J. Colloid & Interface Sci. 2002. V. 253. P. 130–139.
21. Salton M.R.J. The Bacterial Cell Wall. – Amsterdam: Elsevier, 1964. 114 p.
22. Small D., Cabral D.J., Cistola D., Parks J., Hamilton J. The ionization behavior of fatty acids and bile acids in micelles and membranes // Hepatology. 1984. V. 4. № 5. P. 77S–79S.
23. Gbaguidi B., Hakizimana P., Vandenbussche G., Ruyschaert J.-M. Conformational changes in a bacterial multidrug transporter are phosphatidylethanolamine-dependent // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 1571–1582.
24. Doronina N., Ivanova E., Trotsenko Y., Pshenichnikova A., Kalinina E., Shvets V. *Methylophilus quaylei* sp. nov., a new aerobic obligatory methylophilic bacterium // System. Appl. Microbiol. 2005. V. 28. P. 303–309.
25. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. – М.: Мир, 1970. Т. 2. С. 320.