

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.2

EDN QMKUAW

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-401-411



**Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel<sub>Msm</sub> на характер скольжения *Mycobacterium smegmatis***

**Иван Вадимович Цыганов**<sup>1✉, 4</sup>, **Лариса Юрьевна Нестерова**<sup>2, 5</sup>,  
**Александр Георгиевич Ткаченко**<sup>3, 6</sup>

<sup>1-3</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>4-6</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

✉ zamegagurrendan@gmail.com

<sup>2</sup> larisa.nesterova@bk.ru

<sup>3</sup> agtkachenko@iegm.ru

**Аннотация.** Разработан метод сравнительного анализа скользящих колоний бактерий, включающий оценку плотности расположения бактериальных клеток в монослое. С использованием данного метода исследовано влияние биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel<sub>Msm</sub> на скольжение *Mycobacterium smegmatis*. Показан разнонаправленный эффект спермидина и спермина на скольжение, усиление скольжения у штамма с делецией *rel<sub>Msm</sub>*, а также отсутствие прямой связи между скольжением микобактерий и их гидрофобностью.

**Ключевые слова:** микобактерии, скольжение, полиамины, алармоны, адаптация бактерий

**Для цитирования:** Цыганов И. В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel<sub>Msm</sub> на характер скольжения бактериальных клеток *Mycobacterium smegmatis* // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 401–411. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-401-411>.

**Благодарности:** работа выполнена при поддержке министерства науки и высшего образования РФ (№ 124020500028-4).

MICROBIOLOGY

Original article

**Differentiated impact assessment of the biogenic polyamines and alarmone synthetase Rel<sub>Msm</sub> on the sliding motility of *Mycobacterium smegmatis***

**Ivan V. Tsyganov**<sup>1✉, 4</sup>, **Larisa Yu. Nesterova**<sup>2, 5</sup>, **Alexander G. Tkachenko**<sup>3, 6</sup>

<sup>1-3</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Perm Federal Research Center of Ural Branch RAS

<sup>4-6</sup> Perm State University, Perm, Russia

✉ zamegagurrendan@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5030-7997>

<sup>2</sup> larisa.nesterova@bk.ru

<sup>3</sup> agtkachenko@iegm.ru

**Abstract.** The present article is devoted to the method for comparative analysis of sliding colonies. This new method includes measuring the density of bacterial cells in a monolayer. Using this method, we studied the effect of biogenic polyamines and alarmone synthetase Rel<sub>Msm</sub> on *Mycobacterium smegmatis* sliding motility and showed a multidirectional effect of spermidine and spermine on sliding, as well as an increase in sliding motility by a strain with a *rel<sub>Msm</sub>* deletion. It is also shown that there is no dependence between the sliding of mycobacteria and their hydrophobicity.

**Keywords:** mycobacteria, sliding motility, polyamines, alarmones, bacterial adaptation

**For citation:** Tsyganov I. V., Nesterova L. Yu. Tkachenko A. G. [Differentiated impact assessment of the biogenic polyamines and alarmone synthetase Rel<sub>Msm</sub> on the sliding motility of *Mycobacterium smegmatis*]. *Bul-*

**Acknowledgments:** the work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (№ 124020500028-4).

## Введение

Способность к пространственному перемещению дает бактериям множество преимуществ. Оно облегчает колонизацию среды, позволяет избегать влияния неблагоприятных факторов или перемещаться в область оптимального микроокружения, в том числе в условиях макроорганизма (фактор вирулентности). Это способствовало приобретению бактериями в ходе эволюции разнообразных способов транслокации, как с помощью специализированных органелл, так и в их отсутствии [Henrichsen, 1972]. Скольжение – это вид пассивного перемещения по поверхности сред, который возможен за счет действия экспансивной силы, возникающей при делении клеток [Daffé, Draper, 1997; Martínez, Torello, Kolter, 1999]. Скольжение микобактерий не требует специализированных органелл, но становится возможным благодаря наличию в их клеточной оболочке гликопептидолипидов (ГПЛ) [Gupta et al., 2016; Hölscher, Kovács, 2017], образующих липидный слой, окружающий клеточную стенку подобно наружной мембране грамотрицательных микроорганизмов [Brennan, Nikaido, 1995; Ghosh, Indi, Nagaraja, 2013]. Согласно актуальной модели скольжения, ГПЛ придают гидрофобность поверхности бактериальной клетки, что снижает ее трение о гидрофильные поверхности сред, благодаря чему микобактерии формируют широкий монослой, а не группируются в трехмерные структуры [Recht et al., 2000]. Патогенные виды микобактерий также способны к скольжению [Schorey, Sweet, 2008]. Более того, способность к скольжению, как и биопленкообразование, прямо коррелирует с вирулентностью бактерий [Lai et al., 2018]. Скольжение по достаточно увлажненным поверхностям внутренних тканей макроорганизма ускоряет распространение патогена и усложняет борьбу с ним [Zegadło et al., 2023]. Таким образом, исследование механизмов скольжения и факторов, модулирующих этот процесс, является актуальной задачей современной микробиологии, которая на сегодняшний день остается одной из наименее изученных проблем в области физиологии микроорганизмов.

Бактерии постоянно находятся под воздействием множества факторов внешней среды, которые индуцируют адаптационные процессы в клетках. При этом изменяется синтез различных соединений, которые могут оказать влияние на свойства внешней оболочки и, следовательно, на скольжение бактерий. У патогенных штаммов микобактерий это отражается на их способности к колонизации. Поэтому исследование влияния адаптационных процессов на скольжение бактерий и различных факторов их модуляции может способствовать совершенствованию современных средств противомикобактериальной терапии. Одним из ключевых элементов адаптации микобактерий к стрессам является алармонсинтегаза Rel<sub>Msm</sub> [Prossliner et al., 2018]. Данный фермент контролирует уровень алармона – гуанозинтетрафосфата (ppGpp) – благодаря способности как синтезировать, так и гидролизовать это соединение. Кроме того, известно, что ppGpp может модулировать свойства клеточной поверхности микобактерий, оказывая влияние на способность к скольжению [Gupta et al., 2016]. Другим известным фактором, который влияет на адаптацию бактерий к стрессу, являются биогенные полиамины. Данные соединения синтезируются в клетках различных организмов, включая эукариоты, чем объясняется их широкая распространенность в окружающей среде [Igarashi, Kashiwagi, 2010]. Микобактерии в ходе эволюции утратили способность к синтезу полиаминов [Zamakhaev et al., 2020], однако экзогенные молекулы способны модулировать процессы биопленкообразования [Nesterova, Tsyganov, Tkachenko, 2020]. Таким образом, полиамины предположительно могли бы опосредованно участвовать в модуляции скольжения.

Видимое уменьшение площади растущей колонии бактерий может быть вызвано как бактерицидным эффектом изучаемого фактора, так и подавлением скольжения клеток. Поэтому исследование влияния различных факторов на скольжение требует разработки специфических методов, позволяющих дифференцированно оценить скольжение бактериальных клеток в условиях одновременно происходящих процессов их пролиферации или гибели. Подобная дифференцированная оценка затруднена ввиду особенностей, присущих данному объекту исследования. Микобактерии обладают гидрофобной оболочкой, способствующей агрегации клеток, что затрудняет перенос бактерий в жидкую среду и подсчет их количества как при высевах на плотную среду, так и в камере Горяева. В свою очередь, наблюдение за «живым» монослоем и подсчет бактерий в стандартном поле зрения также затруднительны из-за большого количества бактерий и значительной скорости их перемещения.

Вышесказанное требует разработки нового подхода к изучению скользящих колоний, который позволил бы дифференцировать факторы, влияющие непосредственно на подвижность, и исключить при этом изменение ростовых характеристик и выживаемость бактерий.

## Материал и методика

**Объекты исследования.** Объектом исследования служили штаммы *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (таблица). Штамм без делеций генов использовали в качестве контроля, с которым сравнивали результаты скольжения штамма с делецией гена *relMsm*.

### Штаммы

#### [Strains]

Штамм	Источник
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Штамм дикого типа [Mohan et al., 2015] (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ATCC #700084)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 $\Delta rel_{Msm}$	Штамм с одиночной делецией <i>relMsm</i> . Коллекция Лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (сконструирован сотрудниками лаборатории)

**Условия культивирования.** Бактериальную культуру выращивали на среде Middlebrook 7H9 («Himedia», Индия), в которую предварительно добавляли ампициллин (5 мкг/мл) и твин-80 (0.05%), в термостатируемом шейкере (37°C, 200 об/мин) до оптической плотности 1.0 (600 нм). Затем бактериальные клетки отмывали от питательной среды центрифугированием (5 мин., 13 000 об/мин) в физиологическом растворе до оптической плотности 0.2 (600 нм). Полученную культуру использовали в экспериментах по изучению скользких колоний *M. smegmatis*.

Для исследования скольжения готовили специальную среду Middlebrook 7H9 без глицерина с добавлением агарозы до концентрации 0.3% (полужидкий агар). После автоклавирования среду разливали в пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм. При необходимости к среде добавляли полиамины до конечной концентрации 2 мМ. После этого чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Инокулят в виде микрокапли (0.5 мкл) наносили на поверхность среды в центре чашки Петри. После полного впитывания капли чашки помещали в герметичный контейнер, где поддерживали постоянную относительную влажность на уровне 50%. Контейнер выдерживали в термостате (37°C) в течение 16 часов.

**Определение гидрофобности бактерий.** Культуру в экспоненциальной фазе, выросшую до оптической плотности 1.4 (590 нм), отмывали от питательной среды РUM-буфером [McNeil, Dennison, Parish, 2017] и доводили до плотности 0.8 (590 нм). Подготовленную бактериальную культуру вносили по 5 мл в стеклянные пробирки и добавляли гексадекан до концентрации 0.5% от общего объема, после чего интенсивно встряхивали в течение 15 секунд. После встряхивания пробы оставляли на 30 мин., а затем измеряли оптическую плотность водной фазы. Степень гидрофобности считали процентное отношение оптической плотности водной фазы после взаимодействия с гексадеканом к изначальной оптической плотности подготовленных проб (0.8, 590 нм).

**Определение параметров скользких колоний.** Выросшие скользкие колонии фотографировали при помощи фотоаппарата («Olympus», Япония) для последующего определения их площади, а затем исследовали монослой без применения красителей непосредственно в чашках Петри при 400-кратном увеличении с помощью микроскопа МИКМЕД-6 («ЛОМО», Россия), оборудованного цифровой камерой МС 6.3 («ЛОМО», Россия) и фазово-контрастным устройством. Метод фазового контраста, как известно, основан на принципе интерференции. Световая волна, попавшая на объект исследования (бактериальные клетки), после прохождения через кольцевую диафрагму изменяет фазу колебаний по сравнению с другими волнами. Из-за разности фаз световых волн бактерии выглядят темными образованиями на светлом фоне свободного пространства. Этот результат можно зафиксировать на камеру. Бактериальный монослой фотографировали с помощью цифровой камеры МС 6.3.

Для анализа микрофотографий с целью получения цифровых данных о локальном межклеточном пространстве и площади колоний использовали программу Adobe Photoshop CC 2015.5 («Adobe», США). Площадь колоний определяли путем подсчета количества пикселей, которые занимает колония на фотографии. Зная диаметр чашки, определяли количество пикселей, приходящихся на всю площадь поверхности чашки и подсчитывали площадь (мм<sup>2</sup>), приходящуюся на 1 пиксель (формула 1):

$$S_{\pi} = \left( \frac{L_d}{N_{\pi}} \right)^2, \quad (1)$$

где  $S_{\pi}$  – реальная площадь, соответствующая одному пикселю на фотографии,  $L_d$  – фиксированный стандартный диаметр чашки Петри,  $N_{\pi}$  – количество пикселей, приходящихся на отрезок  $L_d$  на фотографии.

Для определения количества межклеточного пространства на цифровых фотографиях с помощью программы Adobe Photoshop с использованием инструмента «зернистость фотопленки», а также изменения контрастности и яркости изображение переводили в альтернативное черно-белое состояние, в котором вся поверхность чашки была представлена только двумя видами пикселей: черными, приходящимися на бактериальные клетки, и белыми, занимающими поверхность, свободную от бактериальных клеток, включая межклеточное пространство. Межклеточное пространство определяли как выраженную в процентах часть белых пикселей от общего их количества на фотографии (формула 2):

$$D_{\text{мкп}} = \frac{\sum_{\text{бп}}}{\sum_{\text{п}}} \times 100\% , \quad (2)$$

где  $D_{\text{мкп}}$  – доля межклеточного пространства,  $\sum_{\text{бп}}$  – сумма пикселей, которую занимает межклеточное пространство на микрофотографиях,  $\sum_{\text{п}}$  – сумма всех пикселей на микрофотографии.

Важным условием подобного анализа является максимально точное разграничение областей с разными значениями, особенно в случаях, когда бактерии плотно прилегают друг к другу. Этот фактор зависит как от разрешения камеры, так и от программных возможностей анализа. Благодаря описанному ранее методу обработки изображений нам удалось максимально точно сохранить реальное соотношение между межклеточным пространством и областями, занятыми бактериальными клетками.

**Статистическую обработку** результатов проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2006). На рисунках 3, 5 отражены средние значения, а вертикальными отрезками – ошибка среднего. Оценка статистической значимости различий произведена с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ . На рисунке 4 отражены медианные значения, вертикальными отрезками обозначены первые и третьи квартили. Оценка статистической значимости различий произведена с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при  $p \leq 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

Известно, что процесс скольжения осуществляется за счет формирования момента силы, возникающего в точке соприкосновения клеток в процессе их роста и деления. Вектор момента силы ориентирован в направлении наименьшего сопротивления. Это определяется множеством факторов, включая свойства поверхности скольжения, физиологические и метаболические параметры клеток, определяющие строение клеточной поверхности, скорость роста и деления, а также многие другие, природа которых до настоящего времени остается неизвестной. Горизонтальное скольжение клеток вдоль поверхности традиционных плотных питательных сред или в отсутствие факторов скольжения затруднено. Это приводит к тому, что в процессе деления все больше начинает преобладать вектор момента силы, направленный вертикально по отношению к поверхности среды, что сопровождается «наслоением» вновь образованных клеток на своих предшественников и формированием «традиционных» многослойных колоний сравнительно небольшого диаметра.

В отличие от этого, при благоприятных условиях (увлажненная поверхность, продукция факторов скольжения или специфические особенности бактериальной поверхности) перемещение клеточного монослоя в скользящей колонии происходит преимущественно горизонтально, в направлении наименьшей скученности клеток и преобладания свободного межклеточного пространства. Исходя из этого, следует, что воздействие какого-либо фактора, повышающего способность клеток к скольжению, можно оценить по возрастанию свободного пространства между бактериями (межклеточного пространства) и, соответственно, возрастания диаметра скользящей колонии. Наоборот, условия, замедляющие скольжение, вызывают снижение величины межклеточного пространства и диаметра скользящей колонии.

Для определения параметров, характеризующих скольжение клеток *M. smegmatis*, нами разработан метод, основанный на компьютерном анализе цифровых микрофотографий скользящих колоний, полученных с использованием фазово-контрастной микроскопии (см. раздел «Материалы и методы»). Суть метода заключается в том, чтобы с помощью программной обработки изображений преобразовать данные так, чтобы все области пикселей на фото принимали только одно из этих двух значений, а именно: равное нулю – для области, занимаемой бактериями («черные пиксели»), и значение, равное 255 («белые пиксели») – для области межклеточного пространства (рис. 1).

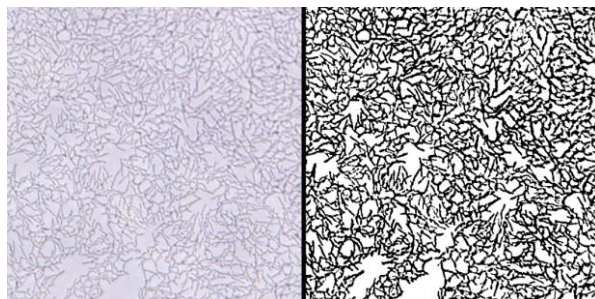


Рис. 1. Результат изменения фотографии монослоя *M. smegmatis*. Слева – изображение до обработки, справа – изображение после обработки

[Result of modifying *M. smegmatis* monolayer photo:  
Left – before modifying, right – after modifying]

Использование данного метода дало возможность оценивать плотность расположения бактерий (формула 2, «Материалы и методы исследований»). Кроме того, при необходимости и при соблюдении определенных условий (небольшие различия в размерах бактерий и отсутствие наслоений бактерий друг на друга), метод может использоваться для вычисления количества бактерий в поле зрения микроскопа посредством деления значения суммы черных пикселей на их число, приходящееся на 1 бактериальную клетку.

С помощью данного метода нами изучено дифференцированное влияние на скольжение микобактерий внутренних и внешних факторов адаптации – гена алармонсинтетазы  $Rel_{Msm}$  и экзогенных полиаминов – спермидина и спермина – в концентрации 2 мМ.

Проведенное нами ранее сравнительное исследование показало отсутствие значимых отличий ростовых параметров у родительского и делеционного штамма *M. smegmatis*, лишённого гена  $rel_{Msm}$ , [Tsyganov, Tkachenko, 2022]. В то же время делеция данного гена приводила к почти двукратному увеличению площади скользящей колонии (рис. 2 А, В). Алармонсинтетаза  $Rel_{Msm}$  регулирует уровни ppGpp, который, в свою очередь, способствует накоплению полифосфатов и, таким образом, влияет на биопленкообразование [Chakraborty, Kumar, 2019], скольжение [Gupta, Kasetty, Chatterji. 2015], вирулентность патогенных штаммов [Petchiappan, Naik, Chatterji. 2020] и процессы адаптации микобактерий к стрессу [Primm et al., 2000]. Следует отметить, что полученные нами данные не согласуются с более ранними исследованиями скольжения штамма с аналогичной делецией [Gupta, Kasetty, Chatterji. 2015]. Это, вероятно, связано с тем, что свойства среды, использованной для изучения скольжения, в нашем эксперименте отличались от таковых для среды, использованной упомянутыми авторами. Мы следовали рекомендациям, данным в описании метода, разработанного для выращивания скользящих колоний микобактерий, согласно которым среда не должна содержать источников углерода [Martinez, Torello, Kolter, 1999]. В отличие от этого, в исследовании, проведенном Gupta с соавторами, в среде присутствовала глюкоза, что могло оказать значительное воздействие на фенотип колонии. Из результатов этих авторов следует, что штамм без делеций обладает способностью к скольжению, но образованная при этом колония по виду не является монослоем и представляет собой трехмерную структуру. Выявленные особенности, с одной стороны, подтверждают важность исследования связи между скольжением и регуляторами бактериального стресса, но с другой – требуют более корректного подхода к его методической части, включая состав питательной среды, что учтено в нашей работе.

Полиамины спермидин и спермин статистически значимо влияли на скольжение микобактерий (рис. 2В). Несмотря на то, что оба из использованных нами полиаминов обладают положительным зарядом, их различия по молекулярной массе и величине заряда, по-видимому, являются причиной разнонаправленности их эффектов на скольжение. Спермидин увеличивал площадь скользящих колоний обоих штаммов, тогда как спермин – уменьшал.

В обоих случаях изменения монослоя колоний на микроуровне прямо коррелировали с изменениями их площадей. Если колония микобактерий в присутствии какого-либо фактора увеличивалась в размерах, это приводило к возрастанию доли межклеточного пространства, и наоборот. Бактерии в скользящей колонии штамма с делецией  $rel_{Msm}$  были расположены значительно дальше друг от друга, что прямо коррелировало с увеличением площади всей колонии. Присутствие в среде спермидина также способствовало росту площади и межклеточного пространства. В отличие от этого, внесение в среду спермина привело к обратному результату (рис. 2А).

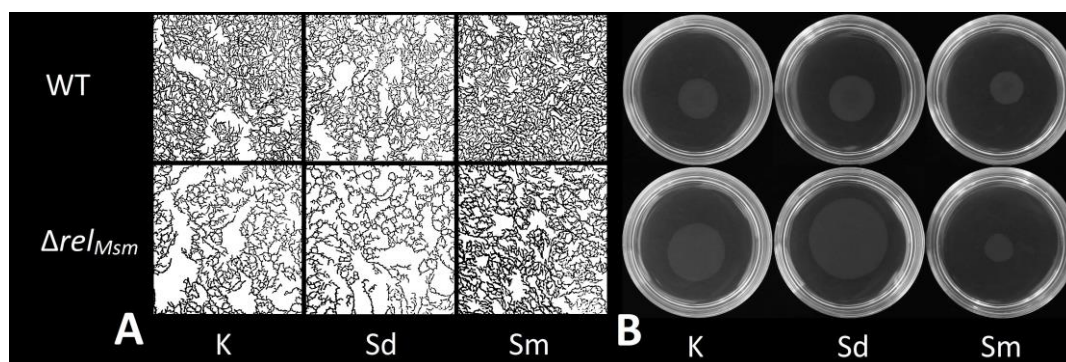


Рис. 2. Влияние полиаминов и алармонсинтетазы  $rel_{Msm}$  на скольжение *M. smegmatis*:

А – микрофотографии монослоя колоний, В – скользящие колонии *M. smegmatis*,  
 WT – штамм *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 без делеций генов,  $\Delta rel_{Msm}$  – штамм *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 с делецией гена  $rel_{Msm}$ , К – без добавок полиаминов, Sd – спермидин, Sm – спермин

[Effect of polyamines and alarmone synthetase  $rel_{Msm}$  on *M. smegmatis* sliding motility:

А – *M. smegmatis* sliding colony monolayer, В – *M. smegmatis* sliding colony,

WT – *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 strain,  $\Delta rel_{Msm}$  – *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 with  $rel_{Msm}$  deletion, К – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine]



Для того, чтобы сделать достоверный вывод о плотности расположения бактериальных клеток в монослое, мы разработали метод преобразования полученных визуальных данных в числовые значения, пригодные для статистической обработки. Учитывая описанные проблемы, связанные с физиологическими особенностями микобактерий (см. «Введение»), в данной работе проведена оценка изменения пространства между клетками. Для этого фотографии монослоя обрабатывали согласно использованному нами методу (см. «Материалы и методы»), позволяющему охарактеризовать величину межклеточного пространства в поле зрения микроскопа. Благодаря этому нам удалось количественно оценить соотношение пространства между бактериями в монослое и пространства, занимаемого клетками. Для того, чтобы исключить разброс значений в разрешении фотографий, межклеточное пространство оценивали как процентную величину от общей площади поля зрения.

В ходе сравнительного исследования межклеточного пространства в скользящих колониях *M. smegmatis* было установлено, что как полиамины, так и отсутствие Rel<sub>Msm</sub> статистически значимо влияли на данный параметр. Спермидин и делеция *relMsm* приводили к значительному увеличению количества свободного пространства, в то время как спермин концентрации уменьшал его. При этом эффекты полиаминов и делеции суммировались (рис. 3). Поскольку данные факторы не влияли на скорость роста микобактерий [Tsyganov, Tkachenko, 2022], изменение плотности бактерий в колонии отражалось на ее площади.

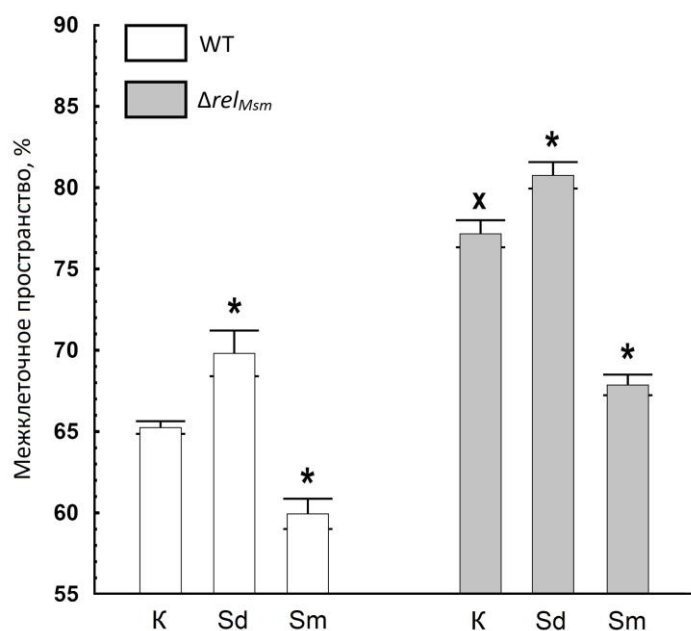


Рис. 3. Изменение межклеточного пространства колоний штаммов *M. smegmatis* в присутствии полиаминов:

WT – штамм *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 без делеций генов, Δ*relMsm* – штамм *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 с делецией гена *relMsm*, K – без добавок полиаминов, Sd – спермидин, Sm – спермин.

\* – статистически значимые отличия от площади контроля соответствующего штамма без добавки полиамина,

x – статистически значимые отличия от площади колонии родительского штамма WT (с использованием Т критерия Стьюдента, p≤0.05)

[Changes in the intercellular space of colonies of *M. smegmatis* strains with polyamines:

WT – *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 strain, Δ*relMsm* – *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 with *relMsm* deletion, K – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine.

\* – statistically significant differences from the control area of the corresponding strain without the addition of polyamine, x – statistically significant differences from the colony area of the WT strain (using the T-test, p≤0.05)]

При сравнительном анализе площадей скользящих колоний *M. smegmatis* и доли межклеточного пространства на микрофотографиях данных колоний становится заметна положительная корреляция между данными параметрами (рис. 3, 4). Увеличение или уменьшение площади всегда сопровождалось соответствующим возрастанием или снижением межклеточного пространства в скользящих колониях микобактерий.

Таким образом, благодаря применению разработанного нами метода удалось статистически достоверно дифференцировать эффекты ограничения скольжения, вызываемые спермином, и усиление бактериального скольжения в присутствии спермидина. Кроме того, нам удалось показать связь между присутствием алармонсинтазы Rel<sub>Msm</sub> и характером скольжения *M. smegmatis*.

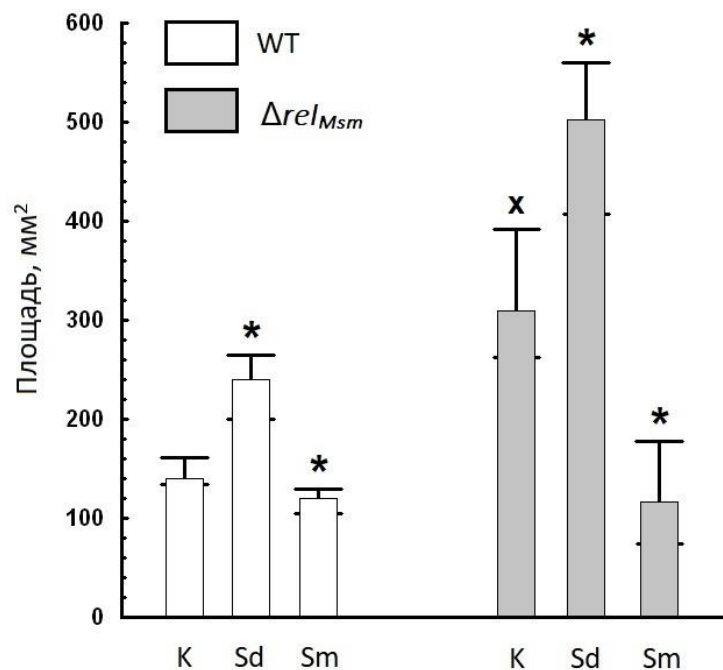


Рис. 4. Изменение площадей скользящих колоний штаммов *M. smegmatis* в присутствии полиаминов WT – штамм *M. smegmatis* без делеций генов,  $\Delta rel_{Msm}$  – штамм *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 с делецией гена *rel<sub>Msm</sub>*, K – без добавок полиаминов, Sd – спермидин, Sm – спермин.

\* – статистически значимые отличия от площади контроля соответствующего штамма без добавки полиамина, x – статистически значимые отличия от площади колонии родительского штамма WT (с использованием критерия Мана-Уитни,  $p \leq 0.05$ )

[Changes in the areas of *M. smegmatis* sliding colony strains in the presence of polyamines:

WT – *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 strain,  $\Delta rel_{Msm}$  – *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 with *rel<sub>Msm</sub>* deletion, K – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine.

\* – statistically significant differences from the control area of the corresponding strain without the addition of polyamine, x – statistically significant differences from the colony area of the WT strain (using the Man-Whitney test,  $p \leq 0.05$ )

Согласно ранее описанной модели [Recht et al., 2000], способность к скольжению связана с изменением структуры поверхности микобактерий. Гидрофобная оболочка, как предполагается в описанной модели, позволяет микобактериям снижать трение о поверхность среды и облегчать скольжение. Таким образом, можно было бы ожидать, что бактерии с более гидрофобной бактериальной оболочкой должны испытывать меньшее сопротивление среды, благодаря чему они должны были бы формировать большие по площади колонии, характеризующиеся более высоким значением межклеточного пространства. И наоборот, чем менее гидрофобна бактериальная поверхность, тем большее сопротивление должны испытывать клетки в процессе скольжения и, соответственно, тем более плотно они должны располагаться относительно друг друга, что уменьшало бы площадь всей колонии.

С целью исследования механизма влияния алармонсинтетазы *Rel<sub>Msm</sub>* и полиаминов на скольжение нами изучено изменение гидрофобности поверхности бактериальных клеток *M. smegmatis*. Несмотря на статистически достоверные отличия в скольжении при добавлении в среду полиаминов, это не отражалось на гидрофобности родительского штамма (рис. 5). В то же время гидрофобность штамма с делецией гена *rel<sub>Msm</sub>*, при добавлении в среду полиаминов увеличивалась.

При этом результаты оценки скольжения обоих штаммов микобактерий в присутствии поликатионов не только отличались от контроля, но и демонстрировали разнонаправленный характер: спермидин стимулировал скольжение, тогда как спермин подавлял его.

Аналогичный результат был получен при исследовании влияния делеции *rel<sub>Msm</sub>* на гидрофобность микобактерий. Суспензия контрольного родительского штамма в водном буферном растворе демонстрировала снижение оптической плотности после контакта с органической фазой. Это подтверждало высокую гидрофобность клеток *M. smegmatis*. В свою очередь, оптическая плотность водной фазы штамма с делецией гена *rel<sub>Msm</sub>* после экспозиции с гексадеканом практически не менялась, что свидетельствует о снижении гидрофобности по сравнению с родительским штаммом (рис. 5). Таким образом, согласно полученным нами данным, штамм, который способен лучше скользить по гидрофильной среде, обладает более гидрофильной оболочкой, что противоречит ранее опубликованной модели скольжения [Recht et al.,

2000]. Изменения в скольжении и гидрофобности штаммов микобактерий в присутствии полиаминов также не согласуются с общепринятой моделью. Спермидин и спермин, оказывавшие разнонаправленный эффект на скольжение, статистически значимо повышали гидрофобность у штамма с делецией гена *relMsm*, но не оказывали значительного эффекта на гидрофобность родительского штамма.

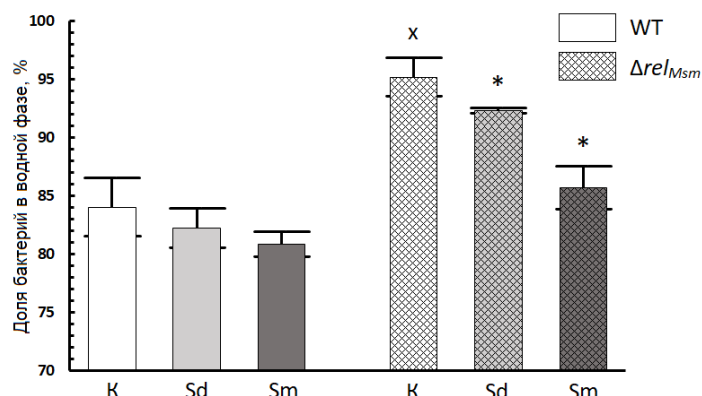


Рис. 5. Влияние полиаминов на гидрофобность бактериальной поверхности *M. smegmatis*:

K – без добавок полиаминов, Sd – спермидин 2 мМ, Sm – спермин 2 мМ,

\* – статистически значимые отличия от площади контроля соответствующего штамма без добавки полиамина, x – статистически значимые отличия от площади колонии родительского штамма WT (с использованием критерия Т-критерий Стьюдента,  $p \leq 0.05$ )

[Changes in the areas of *M. smegmatis* sliding colony strains in the presence of polyamines:

K – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine.

\* – statistically significant differences from the control area of the corresponding strain without the addition of polyamine,

x – statistically significant differences from the colony area of the WT strain (using the T-test,  $p \leq 0.05$ )

В то же время полученные нами результаты исследования гидрофобности и скольжения штаммов согласуются с нашими ранними исследованиями биопленкообразования *M. smegmatis* [Tsyganov, Tkachenko, 2022]. В цитируемой работе нами было показано, что отсутствие алармонсинтетаз у мутантных штаммов приводит к снижению количества ГПЛ в наружной оболочке, что, в свою очередь, вызывало снижение уровня гидрофобности клеточной поверхности и, по-видимому, было одной из причин нарушения процесса образования поверхностных биопленок микобактерий (пелликул). В конечном итоге поверхностные биопленки штаммов с делециями алармонсинтетаз фрагментировались и оседали на дно, в то время как пелликулы родительского штамма оставались целыми и продолжали удерживаться на поверхности [Tsyganov, Tkachenko, 2022]. При этом результаты, представленные нами в настоящей статье (рис. 5), дают возможность ретроспективно подтвердить, что восстановление целостности пелликул, наблюдаемое нами ранее у штаммов с делецией алармонсинтетазы в присутствии полиаминов, сопровождается возрастанием гидрофобности бактериальной оболочки. На этом основании можно прийти к заключению о том, что достаточно высокий уровень гидрофобности микобактерий необходим для биопленкообразования, однако не является ключевым фактором, регулирующим скольжение микобактерий. Установление полного механизма скольжения микобактерий является перспективой наших дальнейших исследований.

## Заключение

Таким образом, с помощью разработанного метода анализа микобактериального монослоя изучена связь между скольжением и гидрофобностью микобактерий, а также оценена специфичность воздействия эндогенных и экзогенных факторов адаптации к стрессу на скольжение, представляющее собой один из признаков вирулентности микобактерий [Lai et al., 2018]. Нам удалось дифференцировать влияние на скольжение микобактерий алармонсинтетазы и биогенных полиаминов от влияния сопутствующих неспецифических изменений ростовых параметров, что ранее было затруднительно. Исследования монослойной структуры скользящей колонии посредством сравнения расположения бактерий относительно друг друга сделали возможным получение прямых доказательств модуляции скольжения за счет воздействия изучаемых факторов на этот процесс. Кроме того, использованный нами метод может быть адаптирован для исследования сопутствующих явлений, таких как агрегация бактерий или иных видов их поверхностного перемещения, например, роения (swarming) и подтягивания (twitching) [Цыганов, Нестерова, Ткаченко, 2021]. С помощью использованного в работе метода можно также значительно ускорить процесс подсчета бактерий, например, в камере Горяева. В наших исследованиях результаты



подсчета бактерий традиционным методом, в сравнении с использованным для оценки скольжения, отличались не более, чем на 5%, что соответствует стандартному р-значению  $p \leq 0.05$ .

Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии прямой зависимости между наличием гидрофобной оболочки микобактерий и их способностью к скольжению по гидрофильным поверхностям. Это указывает на то, что механизм скольжения является более сложным процессом и его регуляция зависит не только от скорости деления бактерий и силы трения о поверхность. Установление реальных факторов регуляции скольжения позволит усовершенствовать методы борьбы с возбудителями микобактериозов.

### Список источников

1. Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Скольжение бактерий: способ пассивного распространения без использования жгутиков и пилей (обзор) // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2021. Вып. 4. С. 263–274. DOI: 10.17072/1994-9952-2021-4-263-274.
2. Brennan P.J., Nikaido H. The envelope of mycobacteria // Annual Review of Biochemistry. 1995. Vol. 64. P. 29–63. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
3. Chakraborty P., Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? // Microbial Cell. 2019. Vol. 6, № 2. P. 105–122. DOI: 10.15698/mic2019.02.667.
4. Daffé M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity // Advances in microbial physiology. 1997. Vol. 39. P. 131–203. DOI: 10.1016/s0065-2911(08)60016-8.
5. Ghosh S., Indi S.S., Nagaraja V. Regulation of lipid biosynthesis, sliding motility, and biofilm formation by a membrane-anchored nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis* // Journal of bacteriology. 2013. Vol. 195, № 8. P. 1769–1778. DOI: 10.1128/JB.02081-12.
6. Gupta K.R. et al. Regulation of growth, cell shape, cell division and gene expression by second messengers (p) ppGpp and c-di-GMP in *Mycobacterium smegmatis* // Journal of bacteriology. 2016. Vol. 198, № 9. P. 1414–1422. DOI: 10.1128/JB.00126-16.
7. Gupta K.R., Kasetty S., Chatterji D. Novel functions of (p)ppGpp and Cyclic di-GMP in mycobacterial physiology revealed by phenotype microarray analysis of wild-type and isogenic strains of *Mycobacterium smegmatis* // Applied Environmental Microbiology. 2015. Vol. 81, № 7. P. 2571–2578. DOI: 10.1128/AEM.03999-14.
8. Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification // Bacteriological reviews. 1972. Vol. 36, № 4. P. 478–503. DOI: 10.1128/br.36.4.478-503.1972.
9. Hölscher T., Kovács Á.T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor // Environ Microbiology. 2017. Vol. 19, № 7. P. 2537–2545. DOI: 10.1111/1462-2920.13741.
10. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2010. Vol. 42, № 1. P. 39–51. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.07.009.
11. Lai L.Y. et al. Role of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 Secretion System in Sliding Motility and Biofilm Formation // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. Art. 1160. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01160
12. Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria // Journal of bacteriology. 1999. Vol. 181, № 23. P. 7331–7338. DOI: 10.1128/JB.181.23.7331-7338.1999.
13. McNeil M.B., Dennison D., Parish T. Mutations in MmpL3 alter membrane potential, hydrophobicity and antibiotic susceptibility in *Mycobacterium smegmatis* // Microbiology. 2017. Vol. 163, № 7. P. 1065–1070. DOI: 10.1099/mic.0.000498.
14. Mohan A. et al. Complete Genome Sequences of a *Mycobacterium smegmatis* Laboratory Strain (MC<sup>2</sup> 155) and Isoniazid-Resistant (4XR1/R2) Mutant Strains // Genome Announcements. 2015. Vol. 3, № 1. Art. e01520-14. DOI: 10.1128/genomeA.01520-14.
15. Nesterova L.Yu., Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. Vol. 56, № 4. P. 387–394. DOI: 10.1134/S0003683820040110.
16. Petchiappan A., Naik S.Y., Chatterji D. RelZ-Mediated Stress Response in *Mycobacterium smegmatis*: ppGpp Synthesis and Its Regulation // Journal of Bacteriology. 2020. Vol. 202, № 2. Art. e00444-19. DOI: 10.1128/JB.00444-19.
17. Primm T.P. et al. III. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival // Journal of Bacteriology. 2000. Vol. 182. P. 4889–4898. DOI: 10.1128/jb.182.17.4889-4898.2000.
18. Prossliner T. et al. Ribosome Hibernation // Annual Review of Genetics. 2018. Vol. 23, № 52. P. 321–348. DOI: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.
19. Recht J. et al. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis* // Journal of bacteriology. 2000 Vol. 182, № 15. P. 4348–4351. DOI: 10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000.

20. Schorey J.S., Sweet L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis // *Glycobiology*. 2008. Vol. 18, № 11. P. 832–841. DOI: 10.1093/glycob/cwn076.
21. Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. 2022. Vol. 26, № 5. P. 458–466. DOI: 10.18699/VJGB-22-56.
22. Zamakhaev M. et al. *Mycobacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // *International Journal of Mycobacteriology*. 2020. Vol. 9, № 2. P. 138–143. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy\_48\_20.
23. Zegadło K. et al. Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, № 2. Art. 1707. DOI: 10.3390/ijms24021707.

## References

1. Tsyganov I.V., Nesterova L.Yu., Tkachenko A.G. [Sliding motility: the way of passive spreading of bacteria without flagella and pili]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2021): pp. 263-274. (In Russ.) DOI: 10.17072/1994-9952-2021-4-263-274.
2. Brennan P.J., Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. V. 64 (1995): pp. 29-63. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
3. Chakraborty P., Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microbial Cell*. 2019. V. 6, No. 2 (2019): pp. 105-122. DOI: 10.15698/mic2019.02.667.
4. Daffé M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*. V. 39 (1997): pp. 131-203. DOI: 10.1016/s0065-2911(08)60016-8.
5. Ghosh S., Indi S.S., Nagaraja V. Regulation of lipid biosynthesis, sliding motility, and biofilm formation by a membrane-anchored nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*. V. 195, No. 8 (2013): pp. 1769-1778. DOI: 10.1128/JB.02081-12.
6. Gupta K.R., Baloni P., Indi S.S., Chatterji D. Regulation of growth, cell shape, cell division and gene expression by second messengers (p) ppGpp and c-di-GMP in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*. V. 198, No. 9 (2016): pp. 1414-1422. DOI: 10.1128/JB.00126-16.
7. Gupta K.R., Kasetty S., Chatterji D. Novel functions of (p)ppGpp and Cyclic di-GMP in mycobacterial physiology revealed by phenotype microarray analysis of wild-type and isogenic strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Applied Environmental Microbiology*. V. 81, No. 7 (2015): pp. 2571-2578. DOI: 10.1128/AEM.03999-14.
8. Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews*. V. 36, No. 4 (1972): pp. 478-503. DOI: 10.1128/br.36.4.478-503.1972.
9. Hölscher T., Kovács Á.T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ Microbiology*. 2017. V. 19, No. 7 (2017): pp. 2537-2545. DOI: 10.1111/1462-2920.13741.
10. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. V. 42, No. 1 (2010): pp. 39-51. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.07.009.
11. Lai L.Y., Lin T.L., Chen Y.Y., Hsieh P.F., Wang J.T. Role of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 Secretion System in Sliding Motility and Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*. V. 9 (2018). Art. 1160. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01160.
12. Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria. *Journal of bacteriology*. V. 181, No. 23 (1999): pp. 7331-7338. DOI: 10.1128/JB.181.23.7331-7338.1999.
13. McNeil M.B., Dennison D., Parish T. Mutations in MmpL3 alter membrane potential, hydrophobicity and antibiotic susceptibility in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. V. 163, No. 7 (2017): pp. 1065-1070. DOI: 10.1099/mic.0.000498.
14. Mohan A., Padiadpu J., Baloni P., Chandra N. Complete Genome Sequences of a *Mycobacterium smegmatis* Laboratory Strain (MC<sup>2</sup> 155) and Isoniazid-Resistant (4XR1/R2) Mutant Strains. *Genome Announcements*. V. 3, No. 1 (2015). Art. e01520-14. DOI: 10.1128/genomeA.01520-14.
15. Nesterova L.Yu., Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. V. 56, No. 4 (2020): pp. 387-394. DOI: 10.1134/S0003683820040110.
16. Petchiappan A., Naik S.Y., Chatterji D. RelZ-Mediated Stress Response in *Mycobacterium smegmatis*: ppGpp Synthesis and Its Regulation. *Journal of Bacteriology*. V. 202, No. 2 (2020). Art. e00444-19. DOI: 10.1128/JB.00444-19.
17. Primm T.P., Andersen S.J., Mizrahi V., Avarbock D., Rubin H., Barry C.E. III. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *Journal of Bacteriology*. V. 182 (2000): pp. 4889-4898. DOI: 10.1128/jb.182.17.4889-4898.2000.
18. Prossliner T., Skovbo Winther K., Sørensen M.A., Gerdes K. Ribosome Hibernation. *Annual Review of Genetics*. V. 23, No. 52 (2018): pp. 321-348. DOI: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.

19. Recht J., Martínez A., Torello S., Kolter R. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*. V. 182, No. 15 (2000): pp. 4348-4351. DOI: 10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000.

20. Schorey J.S., Sweet L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*. V. 18, No. 11 (2008): pp. 832-841. DOI: 10.1093/glycob/cwn076.

21. Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. V. 26, No. 5 (2022): pp. 458-466. DOI: 10.18699/VJGB-22-56.

22. Zamakhaev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycolicibacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines. *International Journal of Mycobacteriology*. V. 9, No. 2 (2020): pp. 138-143. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy\_48\_20.

23. Zegadło K., Gieroń M., Żarnowiec P., Durlík-Popińska K., Kręcisz B., Kaca W., Czerwonka G. Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections. *International Journal of Molecular Sciences*. V. 24, No. 2 (2023). Art. 1707. DOI: 10.3390/ijms24021707.

Статья поступила в редакцию 12.09.2024; одобрена после рецензирования 06.11.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 12.09.2024; approved after reviewing 06.11.2024; accepted for publication 26.11.2024.

#### **Информация об авторах**

И. В. Цыганов – инженер лаборатории адаптации микроорганизмов, младший научный сотрудник лаборатории органического синтеза;

Л. Ю. Нестерова – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, доцент кафедры физиологии растений и экологии почв;

А. Г. Ткаченко – д-р мед. наук, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов, профессор кафедры микробиологии и иммунологии.

#### **Information about the authors**

I. V. Tsyganov – Engineer of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms, Junior Researcher of the Laboratory of Organic Synthesis;

L. Yu. Nesterova – Candidate of Biology, Senior Scientist of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms, Associate Professor, Department of Plant Physiology and Soil Ecology;

A. G. Tkachenko – Doctor of Medicine, Head of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms, professor of the Department of microbiology and immunology.

#### **Вклад авторов:**

Цыганов И. В. – концепция исследования; развитие методологии; экспериментальная работа; обработка материала; написание исходного текста; итоговые выводы.

Нестерова Л. Ю. – экспериментальная работа; доработка исходного текста.

Ткаченко А. Г. – научное руководство; доработка исходного текста; итоговые выводы.

#### **Contribution of the authors:**

Tsyganov I. V. – research concept; methodology development; experimental work; processing of the material; writing the draft; final conclusions.

Nesterova L. Yu. – experimental work; text revision.

Tkachenko A. G. – research supervision; text revision; final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.