

## Резюме

На основании анализа 22 локусов, кодирующих аллозимное разнообразие 12 ферментных систем, получены данные о генетической изменчивости, структуре и дифференциации популяций ели сибирской, произрастающей на территории Томской области (Западная Сибирь) в различных условиях водно-минерального питания (типичные евтрофные болота, осушенное евтрофное болото, заболоченный участок со слабо развитым торфяным горизонтом, суходол).

On the basis of analysis at 22 loci, coding allozyme diversity of 12 enzyme systems, the data about genetic variability, structure and differentiation of Siberian spruce populations growing on the territory of Tomsk region (Western Siberia) under different conditions of water-mineral nutrition (typical eutrophic swamps, reclaimed eutrophic swamp, waterlogged ground with underdeveloped peat level, dry valley) were obtained.

**<sup>1</sup>КРИВОХИЖАЯ М.В., <sup>1</sup>НАВРУЛИН В.О., <sup>2</sup>КАЛИНИЧЕНКО С.В.,  
<sup>1</sup>ВОРОБЬЕВА Л.И.**

<sup>1</sup>Харьковский Национальный Университет имени В.Н. Каразина,  
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: genetics@univer.kharkov.ua

<sup>2</sup>Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова НАН Украины  
Украина, 61057, Харьков, ул. Пушкинская, 14, e-mail: imiamn@mail.ru

## **МУТАГЕНЕЗ БАКТЕРИЙ ВИДА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПОД ВЛИЯНИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ**

Высокая мутабельность бактерий связана с особенностями организации генома и репарационных систем [4], а также с высокой их скоростью размножения и роста [6]. Известно, что ряд факторов окружающей среды может индуцировать стресс-ответ у бактерий, что, в свою очередь, также сказывается на изменчивости [1]. Поглощение света нуклеиновыми кислотами лежит в основе мутагенного и бактерицидного действия УФ-излучения [3]. При этом не только в молекуле ДНК возникают повреждения [4], но и инактивируются ферменты репарации [2], что и приводит к возникновению мутаций. *Staphylococcus aureus* — типичный кожный комменсал, но, при определенных условиях, он может быть высокопатогенным микроорганизмом [5]. Золотистый стафилококк устойчив к разным стрессовым факторам [1], а отдельные его штаммы обладают резистентностью ко многим типам антибиотиков [4]. Стафилококки синтезируют пигмент — стафилоксантин, который является каротиноидом [10]. Этот пигмент защищает *S. aureus* от атак нейтрофилов и позволяет противостоять действию синглетного кислорода в фагосомах [9]. Синтез данного пигмента регулируется *rsbUVWsigB* системой [11]. При возникновении мутации в одном из генов системы синтез стафилоксантина снижается или полностью ингибируется [10]. Поэтому исследование факторов, влияющих на синтез каротиноидов у *S. aureus* [12], является очень важным для понимания условий изменчивости микроорга-

низмов данного вида. Другим важным фактором патогенности стафилококков является экзогенная выработка ферментов лецитовителлазы (лецитиназа) и плазмокоагулазы. Лецитиназа — фермент, расщепляющий лецитин, важный компонент клеточных мембран [6]. Плазмокоагулаза — фермент, участвующий в активации протромбина и фактора VII плазмы крови, вызывая тем самым коагуляцию последней [5]. Этот фермент подавляет фагоцитарную активность и выработку антител, маскируя патогенный агент, усиливая тем самым инвазивные свойства возбудителя [7].

Постоянные воздействия негативных факторов в медицинских учреждениях, таких как облучение ультрафиолетом, воздействие бактерицидными препаратами приводят к образованию «госпитальных» штаммов *S. aureus* [6]. Эти штаммы имеют высокую устойчивость к разного рода факторам окружающей среды и повышенную агрессивность и являются причиной вспышек стафилококковых инфекций. Поэтому изучение мутагенеза *S. aureus* под влиянием повреждающих факторов является актуальным для современной науки и медицинской практики. Целью данной работы было изучить влияние ультрафиолетового излучения на признаки патогенности *Staphylococcus aureus*.

#### **Материалы и методы**

Для исследований влияния УФ-излучения использовались микроорганизмы разных генотипов: эталонный штамм *S. aureus* ATCC 25923 из коллекции НИИ микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова, и 3 штамма дикого типа, которые были выделены у больных сотрудниками этого НИИ. В качестве источника УФ-излучения была использована ртутно-кварцевая лампа ПРК-4, которая обеспечивала диапазон длин волн ультрафиолетового облучения  $\lambda = 240\text{--}578$  нм. Облучение проводили в режимах 10-, 20- и 30-минутной экспозиции.

Для приготовления взвеси использовали штаммы бактерии, которые предварительно культивировали в течении 20 ч при температуре 37 °С. Суспензию микроорганизмов готовили согласно стандарту мутности по шкале McFarland (1,0 ед.) с помощью прибора Densi-La-Meter. Синхронизацию культур проводили воздействием низкой температуры. Облученные и контрольные культуры высевали на питательный агар (ПА) на 20 ч и культивировали при 37 °С. Определение количества жизнеспособных колониеобразующих единиц производилось методом серийных разведений [3]. Определение активности синтеза лецитиназы и стафилоксантина, производилось посредством выделения изолятов на желточно-солевом агаре Чистовича [6]. Активность связанной коагулазы определяли по Никитину В.М. [7]. В эксперименты были взяты изоляты, синтезирующие пигмент стафилоксантин и лецитиназу, и колонии, имеющие коагулазную активность.

Для статистического анализа полученных данных, была использована программа STATISTICA 8.0.550. Для определения достоверности влияния фактора на исследуемые признаки использовали дисперсионный анализ [8].

## Результаты и обсуждение

В ходе исследований установлено, что облучение ультрафиолетом вызывает уменьшение жизнеспособности клеток бактерий (табл. 1).

Согласно полученным данным, количество клеток, способных к образованию колоний, уменьшается в 1,07–2,8 раз в зависимости от экспозиции для эталонного штамма *S. aureus*, и в 0,15–2,55 раз в среднем для штаммов дикого типа по сравнению с контролем. При этом, для некоторых штаммов характерно увеличение количества жизнеспособных колониеобразующих единиц с увеличением экспозиции облучения, что, по-видимому, связано с преодолением порога активации систем SOS-репарации.

УФ-излучение вызывает сильное снижение интенсивности синтеза стафилоксантина и вплоть до полной утраты для некоторых генотипов (табл. 2).

Для некоторых штаммов уже при экспозиции в 10 мин. наблюдается угнетение синтеза пигмента. Данный факт свидетельствует о возникновении мутаций в *rsbUVWsigB* системе, регулирующей синтез этого пигмента. Для других генотипов после 30 минутного облучения 100% изолятов имеют пигментацию. Штаммы дикого типа имели более высокий уровень синтеза стафилоксантина после облучения по сравнению с эталонным штаммом. Также в культурах эталонного штамма уровень спонтанного мутагенеза и

Таблица 1

### Влияние ультрафиолета на колониеобразующую способность стафилококков

Генотип	Средние показатели жизнеспособности, log(KOE/мл)			
	контроль	облучение 10 мин	облучение 20 мин	облучение 30 мин
Штамм ATCC	9,18 ± 0,067	8,52 ± 0,036	7,21 ± 0,011	4,40 ± 0,070
Штамм 1	9,46 ± 0,231	7,40 ± 0,074	8,22 ± 0,055	6,02 ± 0,031
Штамм 2	9,20 ± 0,079	7,18 ± 0,016	7,46 ± 0,022	3,60 ± 0,015
Штамм 3	9,38 ± 0,065	7,38 ± 0,088	4,53 ± 0,015	5,98 ± 0,026

Таблица 2

### Влияние ультрафиолета на синтез стафилоксантина у *S. aureus*

Генотип	Изоляты, синтезирующие стафилоксантин, %				Изоляты, синтезирующие лецитиназу, %			
	конт- роль	облучение			конт- роль	облучение		
		10 мин	20 мин	30 мин		10 мин	20 мин	30 мин
Штамм ATCC	81%	0%	28%	0%	100%	98%	72%	69%
Штамм 1	97%	15%	54%	100%	100%	100%	100%	100%
Штамм 2	100%	83%	13%	0%	100%	100%	100%	100%
Штамм 3	92%	88%	48%	90%	100%	100%	100%	100%

возникновения мутантов, не синтезирующих пигмент, выше (19% “белых” изолятов), чем у штаммов дикого типа (3%). Выявлено достоверное влияние генотипа и дозы облучения на интенсивность синтеза “золотистого” пигмента *S. aureus* ( $F_{\text{табл}} < F_{\text{факт}}$ ,  $p < 0,001$ ).

Что касается уровня интенсивности синтеза фермента лецитовителлазы, достоверного влияния изученных доз облучения на этот признак не выявлено как у эталонного штамма, так и у штаммов дикого типа (табл. 2).

Анализ плазмокоагулазной активности показал, что колонии исходного необлученного штамма *S. aureus* ATCC обладают коагулазной активностью равной 480 усл.ед./мл. После УФ-облучения в течение 10 мин обнаружено, что у 40% колоний активность фермента утрачивалась, у 40% — значительно увеличивалась (до 960 усл.ед./мл), остальные 20% колоний не имели достоверных изменений. При увеличении времени облучения до 20 мин у 60% колоний активность фермента составила 960 усл.ед./мл, а у 40% — фермент был не активен. Экспозиция 30 мин привела к увеличению варибельности по данному показателю и к снижению общей доли колоний с минимальной и максимальной активностью плазмокоагулазы.

### **Выводы**

Установлено, что при действии УФ-облучения у *S. aureus* снижается или полностью прекращается синтез видоспецифического пигмента — стафилоксантина. Но на синтез лецитиназы действие УФ в изученных дозах влияния не оказывает. Активность фермента плазмокоагулазы после облучения увеличивается. Появление микроорганизмов с подобными мутациями затрудняет идентификацию золотистого стафилококка, и эти штаммы могут быть приняты за непатогенные. Мутантный бактериальный геном характеризуется высоким уровнем реверсий и существует вероятность восстановления дикого типа, что, в свою очередь, может привести к увеличению агрессивности патогенного стафилококка. Поэтому дальнейшие исследования в этом направлении могут иметь большое значение для решения общебиологических и прикладных медицинских проблем.

Авторы выражают благодарность Волковой Н.Е и Шабанову Д.А за участие в обсуждении, сотрудникам НИИ имени И.И. Мечникова за поддержку и помощь в работе.

### **Литература**

1. *Баснакьян И.А.* Стресс у бактерий.— М.: Медицина, 2003.— 136 с.
2. *Владимиров Ю.А.* Инактивация ферментов ультрафиолетовым облучением // Соросовский образовательный журнал.— 2001.— Т.7, №2.— С. 20–27.
3. *Герхард Ф.* Методы общей бактериологии.— М.: Мир, 1989.— 354 с.
4. *Девис Р., Вотстайн Д., Рот Дж.* Генетика бактерий.— М.: Мир, 1984.— 176 с.
5. *Клер К., Шмитт, Карен С., Мейсик, Алисон Д.* О’Бразн Бактериальные токсины: друзья или враги? // КМАХ — 2000.— Т.2, №1.— С. 4–15.
6. *Лабинская А.С., Блинковой Л.П., Ешина А.С.* Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований.— М.: Медицина, 2004.— 319 с.

7. Никитин В.М. Справочник методов биохимической экспресс-индикации микробов.— Кишнев: Карта Молдовескэ, 1989.— 296 с.

8. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии: Учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. ун-тов.— М.: Изд-во МГУ, 1978.— 265 с.

9. George Y. Liu, Anthony Essex, John T. Buchanan Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity // J. Exp. Med.— 2005.— Vol.202(2).— P. 209–215.

10. Katzif Samuel, Lee Eun-Hee, Law Anthony B. CspA Regulates Pigment Production in Staphylococcus aureus through a SigB-Dependent Mechanism // Journal of Bacteriology.— 2005.— Vol.187, №23.— P. 8181–8184.

11. Wieland B, Feil C, E Gloria-Maercker, Thumm G, Lechner M. Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of Staphylococcus aureus // Journal of Bacteriology.— 1994, Vol.176.— P. 7719–7726.

12. Wu S., H. De Lencastre, and A. Tomasz. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of Staphylococcus aureus RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing // Journal of Bacteriology.— 1996, Vol.178.— P. 6036–6042.

### **Резюме**

В работе изучали влияние ультрафиолета на разные штаммы стафилококков. Воздействие УФ-излучения на клетки *S. aureus* вызывает изменение свойств бактерий по признакам патогенности. Это приводит к затруднению в идентификации патогена, но не снижает его агрессивность.

У роботі вивчали вплив ультрафіолету на різні штами стафілококів. Дія УФ-опромінення на клітини *S. aureus* викликає зміну властивостей бактерій за ознаками патогенності. Це призводить до труднощів у ідентифікації патогена, але не знижує його агресивність.

We studied the effect of ultraviolet radiation on different strains of staphylococci. Impact of UV radiation on cells of *S. aureus* causes a change in the properties of bacteria on the grounds of pathogenicity. This leads to difficulties in identification of the pathogen, but does not reduce its aggressiveness.

### **КУЗЬМИН С.Р.**

*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Россия, 660036 Красноярск,  
Академгородок, 50/28; e-mail: sergio7@akadem.ru*

## **ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АНАТОМИИ ДРЕВЕСИНЫ ВИДОВ ХВОЙНЫХ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ВОДНОГО РЕЖИМА ПОЧВЫ**

Рост древесных растений чаще ослабляется вследствие водного дефицита, чем из-за какого-либо другого отдельного фактора. Литературные данные, обобщенные Р. Занером [1], показывают наличие корреляции между ростом растений в высоту, по диаметру и количеством доступной воды. Отмечается, что 70–80% изменений ширины годичных колец во влажных районах и 90% в сухих местообитаниях можно отнести за счет различий в напряженности водного режима. Водный дефицит изменяет анатомию, мор-