

УДК 579.24+576.54

О РОЛИ ДИОКСИДА УГЛЕРОДА В РЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ БАКТЕРИЙ

© 2024 г. О. Е. Петрова^{а, *}, О. И. Парфирова^а, В. Н. Воробьев^{а, b}, В. Ю. Горшков^{а, b}

^аКазанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, 420111, Россия

^bИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, 420008, Россия

*e-mail: roe60@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.

После доработки 02.03.2024 г.

Принята к публикации 21.03.2024 г.

Адаптивная пролиферация бактерий или клеточное деление в отсутствие экзогенного органического субстрата контролируется с помощью плотно-зависимых механизмов при участии АГЛ- и АИ-2-зависимых систем кворум сенсинга. Наряду с сигнальными молекулами этих систем бактериальной коммуникации в регуляции также могут принимать участие метаболиты бактерий, которые перманентно выделяются в процессе микробного метаболизма, например, CO₂, и, таким образом, могут служить биомаркерами клеточной плотности. Установлено, что диоксид углерода необходим для инициации адаптивной пролиферации, а повышенное содержание атмосферного CO₂ вызывает преждевременную остановку этого процесса. Таким образом, CO₂ способен регулировать адаптивные реакции бактерий, в том числе, вероятно, является одним из сигналов, участвующих в инициации и терминеции процесса адаптивной пролиферации. Показано, что CO₂ в виде бикарбонат-иона HCO₃⁻ может активировать цАМФ-зависимый сигнальный каскад, а также включается в клеточную массу бактерий.

Ключевые слова: адаптация, диоксид углерода, клеточная плотность, межклеточная коммуникация, цАМФ, *Pectobacterium atrosepticum*

DOI: 10.31857/S0026365624050145

Адаптивные реакции бактерий регулируются на популяционном уровне с участием систем межклеточной коммуникации (кворум сенсинга) (Williams, Camara, 2009; Striendnig, Hilbi, 2022). Когда численность клеток в популяции недостаточна для активации адаптивных ответов, бактерии могут увеличить ее до уровня кворума посредством деления клеток. Это явление, адаптивная пролиферация, то есть клеточное деление в отсутствие экзогенного органического субстрата, описано для ряда гетеротрофных бактерий при голодании (Мясник, 1969; Gorshkov et al., 2010; Petrova et al., 2014; 2023). Поскольку адаптивная пролиферация осуществляется за счет внутренних резервов клеток бактерий, крайне важно ее своевременное прекращение по достижении плотности популяции, необходимой для активации систем кворума и реализации адаптивного ответа. В нашем недавнем исследовании было показано, что сигнальные молекулы ацилгомосеринлактон-зависимой и АИ-2-зависимой систем кворум сенсинга участвуют в прекращении адаптивной пролиферации фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*, однако подавляя этот процесс не полностью, а лишь частично (Petrova

et al., 2023). Это предполагает участие других бактериальных метаболитов в регуляции адаптивной пролиферации. В том числе, остается открытым вопрос о сигнале/сигналах, индуцирующих процесс адаптивной пролиферации.

Мы предположили, что в регуляции адаптивной пролиферации могут участвовать метаболиты микроорганизмов, которые не являются специализированными сигнальными молекулами бактериальной коммуникации. Они перманентно выделяются в процессе микробного метаболизма, такие, например, как диоксид углерода, и, следовательно, могут служить биомаркерами клеточной плотности (Stretton, Goodman, 1998). CO₂ оказывает как прямое, так и опосредованное воздействие на различные группы микроорганизмов, включая гетеротрофные бактерии. Благодаря своим физико-химическим свойствам, CO₂ влияет на функцию биологических мембран, препятствуя делению клеток, поглощению или транспорту субстрата; снижение pH, вызванное гидратацией CO₂, может нарушить внутриклеточный гомеостаз и целостность клеток (Stretton, Goodman, 1998; Jo et al., 2013). CO₂ может принимать участие в передаче сигналов бактерий,

активируя цАМФ-зависимые сигнальные каскады в ответ на действие стрессовых факторов: осмолярность, голодание, высокую плотность клеток или состояние организма-хозяина в случае патогенных микроорганизмов (Merlin et al., 2003). Депривация атмосферного CO_2 ведет к ингибированию роста и даже гибели гетеротрофных микроорганизмов (Sorokin, 1962; Dehority, 1971).

Целью исследования было выяснение роли диоксида углерода в инициации и/или терминации процесса адаптивной пролиферации на примере фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*SCRI1043.

Клетки *P. atrosepticum* культивировали в герметичных сосудах в питательной среде LB (Luria-Bertani бульон) или в безуглеродной среде АВ в отсутствие CO_2 или при его повышенной концентрации — 5, 10, 20%. Для удаления газообразного CO_2 использовали химический поглотитель натронную известь (ХП-И, “Лен-Реактив”) в концентрации 0.85 г/л в пересчете на общий объем сосуда. Постоянная циркуляция газовой фазы осуществлялась при помощи перистальтического насоса ВТ100-1L. Проводили постоянный контроль pH среды. Уровень экспрессии целевых генов определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Количество транскриптов целевых генов нормализовали на нормирующий фактор, рассчитанный для транскриптов генов домашнего хозяйства *ffh*, *tuf*, *recA* *P. atrosepticum* в этих же образцах с помощью алгоритма geNorm. Нормализованные значения отражают относительный уровень экспрессии изучаемых генов. Включение

радиоактивной метки в биомассу клеток измеряли методом жидкостной сцинтилляции с помощью сцинтилляционного анализатора Tri-Carb.

Удаление CO_2 из газовой фазы снижало титр КОЕ пектобактерий, растущих на питательной среде LB, на два порядка величин по сравнению с бактериями, растущими в присутствии атмосферного CO_2 . В то же время отсутствие CO_2 в газовой фазе губительно действовало на клетки *P. atrosepticum* при культивировании бактерий на безуглеродной среде АВ: титр клеток снижался до неопределяемых величин уже на первые сутки культивирования (рис. 1).

Таким образом, присутствие диоксида углерода, по-видимому, является необходимым условием для инициации процесса адаптивной пролиферации и выживания пектобактерий в условиях голодания.

Для проверки влияния повышенных концентраций CO_2 на рост и на адаптивную пролиферацию бактерий, *P. atrosepticum* культивировали на питательной среде LB или безуглеродной среде АВ в присутствии разных концентраций диоксида углерода. CO_2 не влиял на рост бактерий на питательной среде (рис. 2а).

Процесс адаптивной пролиферации несколько угнетался (т.е. снижался титр клеток, при котором происходила терминация клеточного деления) при концентрации уже 5% CO_2 , а 20% CO_2 полностью подавляли адаптивную пролиферацию (процесс не иницировался), при этом бактерии оставались жизнеспособными (рис. 2б). Т.е. в условиях эксперимента повышение уровня CO_2 могло служить сигналом для преждевременной (до достижения уровня кворума) терминации адаптивной пролиферации.

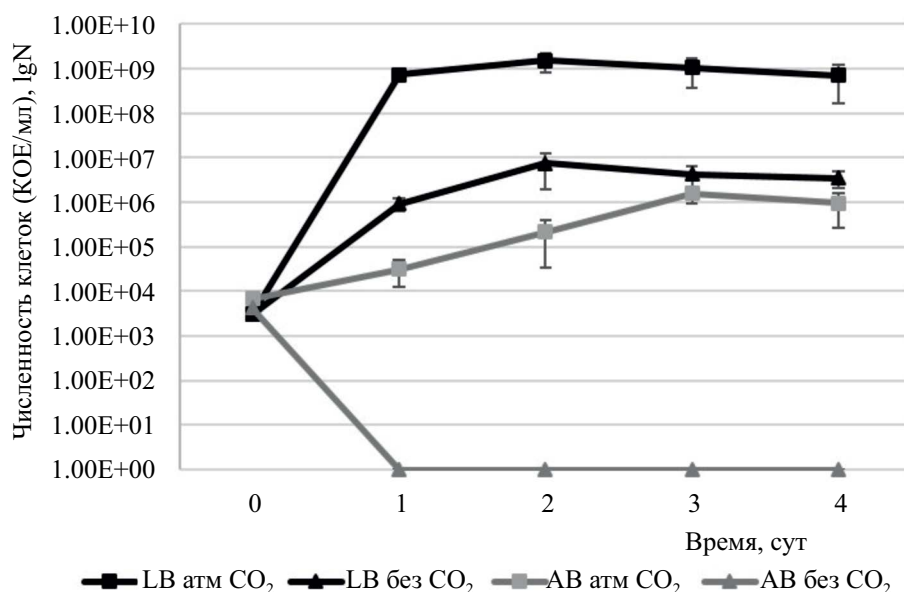


Рис. 1. Динамика численности КОЕ в культурах *P. atrosepticum* SCRI1043, растущей на питательной среде LB (черные линии), или культивируемой на безуглеродной среде АВ (серые линии) в присутствии атмосферного CO_2 (квадраты) или в его отсутствии (треугольники).

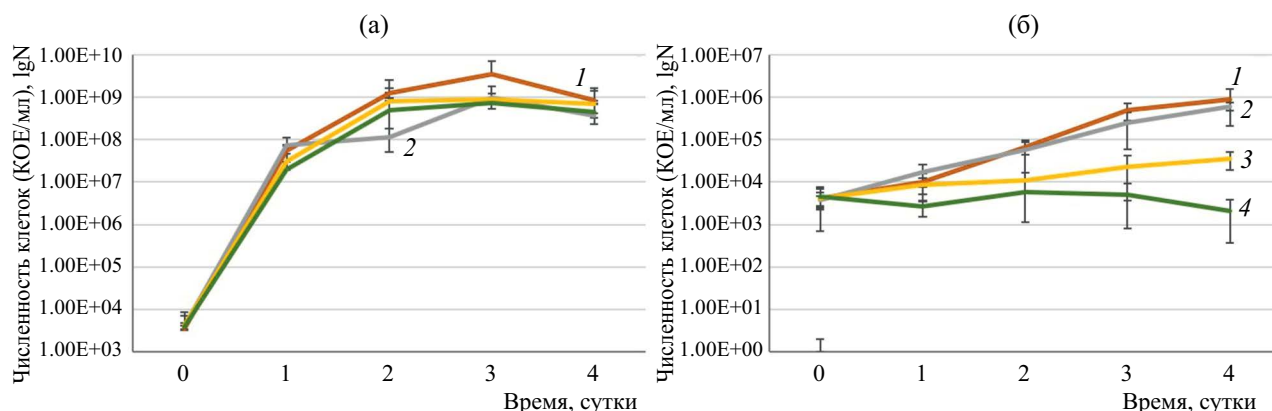


Рис. 2. Динамика численности КОЕ в культурах *P. atrosepticum* SCRI1043, растущей на питательной среде LB (а), или культивируемой на безуглеродной среде АВ (б) в присутствии разных концентраций CO_2 : 1 – атм CO_2 ; 2 – 5% CO_2 ; 3 – 10% CO_2 ; 4 – 20% CO_2 .

Таким образом, терминация клеточного деления при голодании, вероятно, является следствием формирования многокомпонентного сигнального фона, в состав которого, наряду с медиаторами систем кворума АГЛ и АИ-2 (Petrova et al., 2023), может входить и диоксид углерода.

Газообразный CO_2 хорошо растворим в водных растворах и липидах и может свободно диффундировать в клетку и из нее (Smith et al., 2000). В клетке CO_2 при участии карбоновой ангидразы преобразуется в бикарбонат-ион HCO_3^- , который участвует в бактериальном сигналинге и в анаболических процессах. Экспрессия гена *eca3327*, кодирующего цитоплазматическую ангидразу *P. atrosepticum*, индуцировалась в первые часы голодания на безуглеродной среде АВ и сохранялась на постоянном уровне в течение трех суток, т.е. в процессе адаптивной пролиферации (рис. 3а).

Бактериальная сигнализация связана с функционированием глобального регулятора – цАМФ, действующего как сигнальная молекула и регулирующего многие биологические процессы у млекопитающих и микроорганизмов (Kalia et al., 2013; Stulke Kruger, 2020). Синтез цАМФ происходит при участии фермента аденилатциклазы. Бикарбонат не участвует напрямую в каталитическом процессе, но стимулирует активность аденилатциклазы, кратковременно взаимодействуя с ферментом в течение каждого каталитического цикла и вызывая конформационные изменения фермента (Steegborn et al., 2005). Растворимые аденилатциклазы чувствительны к физиологическим колебаниям бикарбоната в концентрации от 5 до 25 М и считаются ферментами “обнаружения” CO_2 (Chen et al., 2000). Экспрессия гена *suuA*, кодирующего аденилатциклазу *P. atrosepticum*, заметно активировалась к третьим суткам голодания

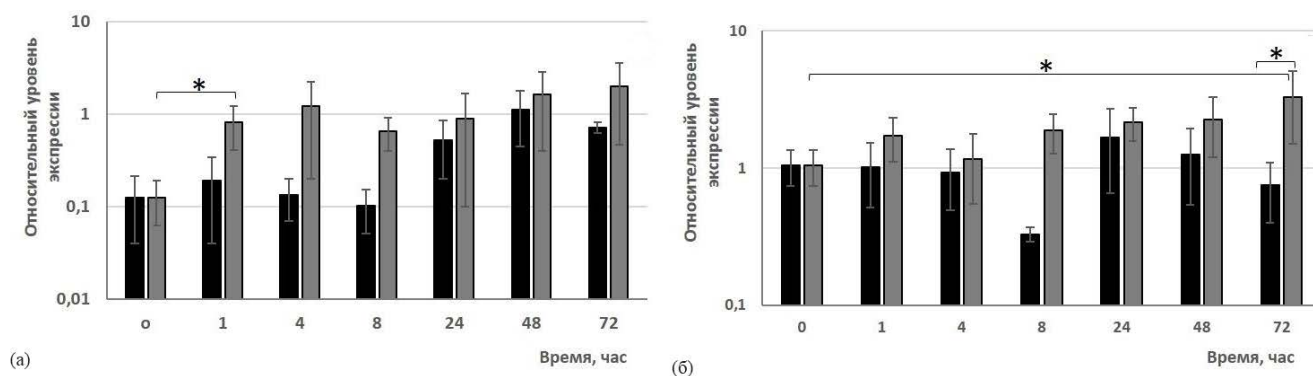


Рис. 3. Экспрессия генов карбоновой ангидразы (а) и аденилатциклазы (б) в *P. atrosepticum* SCRI1043, растущей на питательной среде LB (черные столбики), или культивируемой на безуглеродной среде АВ (серые столбики) в присутствии атмосферного CO_2 . Уровень экспрессии целевых генов определялся относительно нормирующего фактора, рассчитанного для генов домашнего хозяйства *fhh*, *tuf*, *recA* *P. atrosepticum*. Представленные значения являются средними значениями из пяти биологических повторностей. Звездочки (*) показывают достоверные различия (двусторонний тест Манна–Уитни, $p < 0.05$) между вариантами, обозначенными скобками.

Таблица. Включение ¹⁴C в биомассу *P. atrosepticum* SCRI1043 при росте на среде LB или голодании на безуглеродной среде AB

Условия культивирования	¹⁴ HCO ₃ ⁻ импульсов в минуту на 1 клетку			
	0 ч	1 день	2 день	3 день
Рост на среде LB	1.15 × 10 ⁻²	4.6 × 10 ⁻⁵	2.8 × 10 ⁻⁵	1.3 × 10 ⁻⁵
Голодание на безуглеродной среде AB	—	1.2 × 10 ⁻⁴	1.8 × 10 ⁻⁴	8.7 × 10 ⁻⁵

и более чем в 4 раза превышала экспрессию этого гена у клеток пектобактерий, выросших на питательной среде LB. При росте пектобактерий на среде LB не было отмечено достоверного увеличения уровня экспрессии гена *суаА* (рис. 36). Таким образом, при адаптивной пролиферации, вероятно, происходила активация сигнальной ветви включения диоксида углерода в метаболизм *P. atrosepticum*.

Гетеротрофная фиксация CO₂ поставляет 1–8% углерода клеточной массы гетеротрофных бактерий в ростовых условиях и до 9% при голодании (Braun et al., 2021). Об использовании CO₂ в процессах анаболизма может свидетельствовать включение меченого углерода бикарбоната ¹⁴HCO₃⁻ в клеточную массу бактерий. В процессе адаптивной пролиферации гетеротрофная бактерия *P. atrosepticum* ассимилировала диоксид углерода. При этом эффективность включения меченого углерода в биомассу голодающих бактерий, была несколько выше, чем у бактерий при росте на питательной среде LB (таблица).

Бактерии обладают так называемым чувством диффузии “diffusion sensing”, способны воспринимать колебания уровня CO₂ и реагировать на них. Полученные результаты указывают на то, что CO₂ способен регулировать адаптивные реакции бактерий, в том числе, вероятно, является одним из сигналов, участвующих в инициации и терминации процесса адаптивной пролиферации *P. atrosepticum*. Включение углерода из CO₂ в биомассу гетеротрофных бактерий, вероятно, может частично (хотя и в очень малой степени) компенсировать дефицит экзогенного углерода при голодании.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено при поддержке гранта Российского Научного Фонда 22-24-00787.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В статье нет данных работ с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мясник М.Н. Динамика клеточной популяции бактерий при исчезающе малых количествах питательных веществ в среде // Тез. докладов II Всесоюзного совещания “Управляемый синтез и биофизика популяций”. Красноярск, 1969. С. 287.

Braun A., Spona-Friedl M., Avramov M., Elsner M., Baltar F., Reinthaler T., Herndl G., Griebler C. Reviews and syntheses: heterotrophic fixation of inorganic carbon – significant but invisible flux in environmental carbon cycling // Biogeosci. 2021. V. 18. P. 3689–3700.

Chen Y., Cann M.J., Litvin T.N., Iourgenko V., Sinclair M.L., Levin L.R., Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor // Science. 2000. V. 289. P. 625–628.

Dehority B.A. Carbon dioxide requirement of various species of rumen bacteria // J. Bacteriol. 1971. V. 105. P. 70–76.

Gorshkov V., Petrova O., Gogoleva N., Gogolev Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 during adaptation to stress conditions // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010. V. 59. P. 378–385.

Jo B.H., Kim I.G., Seo J.H., Kang D.G., Cha H.J. Engineered *Escherichia coli* with periplasmic carbonic anhydrase as a biocatalyst for CO₂ sequestration // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 6697–6705.

Kalia D., Merey G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y., Guo M., Roembke B., Sintim H.O. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 305–341.

Merlin C., Masters M., McAteer S., Coulson A. Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 6415–6424.

Petrova O., Gorshkov V., Daminova A., Ageeva M., Moleleki L.N., Gogolev Y. Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density // Res. Microbiol. 2014. V. 165. P. 119–127.

- Petrova O., Parfirova O., Gogoleva N., Vorob'ev V., Gogolev Y., Gorshkov V. The role of intercellular signaling in the regulation of bacterial adaptive proliferation // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Art. 7266.
- Smith K.S., Ferry J.G. Prokaryotic carbonic anhydrases // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. P. 335–366.
- Sorokin C. Inhibition of cell division by carbon dioxide // Nature. 1962. V. 194. P. 496–497.
- Steeghorn C., Litvin T.N., Levin L.R., Buck J., Wu H. Bicarbonate activation of adenyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 32–37.
- Stretton S., Goodman A.E. Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms // Antonie Van Leeuwenhoek. 1998. V. 73. P. 79–85.
- Striednig B., Hilbi H. Bacterial quorum sensing and phenotypic heterogeneity: how the collective shapes the individual // Trends Microbiol. 2022. V. 3. P. 379–389.
- Stulke J., Kruger L. Cyclic di-AMP signaling in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2020. V. 74. P. 159–179.
- Williams P., Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules // Curr. Opin. Microbiol. 2009. V. 12. P. 182–191.

SHORT COMMUNICATIONS

The Role of Carbon Dioxide in the Regulation of Bacterial Adaptive Proliferation

O. E. Petrova^{1, *}, O. I. Parfirova¹, V. N. Vorob'ev^{1, 2}, and V. Yu. Gorshkov^{1, 2}

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center KazSC RAS, Kazan, 420111, Russia

²Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008, Russia

*e-mail: poe60@mail.ru

Abstract. The adaptive proliferation of bacteria or cell division in the absence of an exogenous organic substrate is controlled by density-dependent mechanisms with the participation of AHL- and AI-2-dependent quorum sensing systems. Along with the signaling molecules of these bacterial communication systems, bacterial metabolites that are permanently released during microbial metabolism, for example, CO₂, can also participate in regulation and can serve as biomarkers of cell density. It has been established that carbon dioxide is necessary for the adaptive proliferation launch, and the increased content of atmospheric CO₂ causes a premature stop to this process. Thus, CO₂ is able to regulate the adaptive reactions of bacteria, including, probably, being one of the signals involved in the initiation and termination of the process of adaptive proliferation. It has been shown that CO₂ in the form of the bicarbonate ion HCO₃⁻ can activate the cAMP-dependent signaling cascade and is also included in the bacterial cell mass.

Keywords: adaptation, carbon dioxide, cell density, intercellular communication, cAMP, *Pectobacterium atrosepticum*