

Особенности обмена некультивируемых форм холерных вибрионов

**А.В. Соколенко, Ю.М. Ломов, Л.Е. Асеева, В.С. Каграманов,
О.С. Бурша**

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт,
Ростов-на-Дону, Россия

Приведенные материалы исследования позволяют заключить следующее. Изменения в диссимляции глюкозы происходят еще до утраты клетками способности образовывать колонии на питательных средах. Уменьшение количества и замедление выхода радиоактивного углекислого газа в НФ холерных вибрионов, вероятно, связано с перестройкой метаболизма, проявляющемся в сдвиге его в сторону гликолиза и разрывом цепей цикла Кребса, характерным для хемолитоавтотрофов. Пребывание в условиях микрокосмов при низкой температуре индуцирует функционирования цикла Кальвина, что вероятно, обеспечивает клетку необходимыми пластическими материалами и способствует выживанию при отсутствии органических питательных веществ.

Некультивируемыми принято считать бактерии, которые под влиянием различных физико-химических или биологических факторов обратимо утрачивают способность расти на традиционных питательных средах. В настоящее время известно, что 1) переходить в некультивируемую форму (НФ) способны многие виды бактерий, в том числе и возбудители особо опасных инфекций: чумы [11], туляремии [9], холеры [13], 2) в некультивируемом состоянии (НС) клетки сохраняют вирулентность и способны к реверсии [12,15], 3) предполагается, что в НС возбудители различных заболеваний переживают неблагоприятные условия окружающей среды, являясь потенциальным источником заражения [4,13]. Биологические свойства НФ, в том числе и холерных вибрионов, изучены недостаточно. В доступной литературе отсутствуют сведения об особенностях обменных процессов в некультивируемых клетках, в том числе и холерных вибрионов. Между тем они представляет большой научно-практический интерес, так как являются ключевыми для понимания механизмов образования НФ и их выживания в неблагоприятных условиях внешней среды.

Целью настоящей работы является обнаружение функционирования основных энергетических и биосинтетических путей в некультивируемых клетках холерных вибрионов. Для этого изучен катаболизм меченой глюкозы в реакциях цикла Кребса и активность ключевого фермента цикла Кальвина – рибULOZO-1,5-ДИФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ (РДФК).

Материалы и методы

Для работы использованы три штамма холерных вибрионов: *Vibrio cholerae* O1 17551, 17558 и *V. cholerae* O139 17673. По морфологическим, культуральным и биохимическим признакам культуры были типичными. Для получения НФ вибрионы в течение трех часов выращивали на 0,3% агаре Мартена, рН 7,6 с последующим пересевом на 2% агар Мартена, рН 7,7-7,8. Через 18 часов, в зависимости от целей эксперимента, агаровую культуру суспендировали в морской воде, 0,85% растворе NaCl, 1мМ растворе янтарной кислоты, 0,001% растворе витамина Е, 1мМ растворе каталазы или дистиллированной воде. В стеклянных флаконах емкостью 100 мл объем микробной взвеси доводили до 70 мл средой суспендирования и конечной концентрации 109 м.кл/мл. Приготовленные таким образом микрокосмы помещали при + 4оС без освещения. О динамике перехода в НС судили по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаре, для чего каждые 5-7 дней из флаконов с дистиллированной водой и 14 дней из остальных делали высевы. Некультивируемыми считали пробы, в которых высевы на агар не выявляли растущих клеток, но витальным окрашиванием акридиновым оранжевым (разведение 1:5000) обнаруживали подвижные вибрионы, окрашенные в зеленый цвет. В переходных пробах часть клеток (102 – 105 м.кл/мл) еще сохраняла способность расти на питательных средах .

Пути диссимиляции глюкозы изучали радиореспирометрическим методом [16]. В опытах использовали 1С14-, 2С14 -, 6С14 -, 1,6С14 – глюкозу, а также 1.4С14 – янтарную кислоту фирмы «Изотоп». Реакционная смесь объемом 5 мл содержала 5·10⁹ м.кл/мл, суспендированных в 0,85% NaCl, 15 мМ глюкозы-носителя, 0,8 мкюри радиоактивной глюкозы, 60 мМ фосфатного буфера рН 7,8. Выделенную в процессе дыхания углекислоту улавливали 5 N NaOH. Инкубацию проводили в течение трех и семнадцати часов при 37оС. «Ловушки» помещали в 96о этиловый спирт, который затем переносили в сцинтилляционную жидкость. Радиоактивность исследуемых проб измеряли счетчиком Mark II (Searle, USA). Результаты выражали в имп/мин.

Для определения активности РДФК культуру концентрировали центрифугированием при 10000 g 15 мин. Клетки разрушали растиранием с песком, отмывали фосфатным буфером, рН 7,6. Реакционная смесь содержала 18мМ Трис-HCl, рН 8.0, 20мМ MgCl₂ · 6H₂O , 10мМ дитиотрептола, 4мМ рибозо - 5 - дифосфата и 500 мкл суспензии разрушенных клеток. Смесь инкубировали 30 мин при 30оС для превращения рибозо-5-фосфата в рибулозо-5-дифосфат под действием эндогенной фосфорорибозоизомеразы. В реакционную смесь добавляли 0,026мМ NaHC₁₄ O₃ , 6мМ АТФ, 0,6 мМ НАДН и инкубировали 5 мин. Реакцию останавливали 0,02 мл 100% трихлоруксусной кислотой. Центрифугировали 30 мин при 8000g, 200 мкл супернатанта помещали в 5 мл сцинтилляционной жидкости. Радиоактивность измеряли счетчиком Mark II. Активность фермента выражали в имп/мин.

Результаты и обсуждение

Углеводы являются важным источником энергии и углерода для микроорганизмов. Утилизация энергии углеводов клеткой происходит в цепи последовательных реакций фосфорилирования промежуточных продуктов, дегидрирования, переноса электронов на кислород или другие акцепторы. Механизм диссимиляции различных сахаров отражает не существование какого-либо специфического пути их распада, а лишь способность микроорганизма к синтезу некоторых ферментов, катализирующих превращение конкретных субстратов [5]. Поэтому изучение процессов диссимиляции глюкозы у НФ вибрионов позволяет судить о катаболизме углеводов в целом.

К настоящему времени известно три пути диссимиляции углеводов до C_3 -соединений и пирувата. Это гликолиз (или путь Эмбдена - Мейергофа – Парнаса), гексозомонофосфатный путь (пентозофосфатный цикл) и, встречающийся только у некоторых бактерий, путь Энтнера – Дудорова. Гликолиз и гексозомонофосфатный шунт функционируют у холерных вибрионов одновременно, обеспечивая клетку энергией и компонентами синтеза белков, жиров, нуклеиновых кислот. По гликолитическому пути расщепляется 89-93% глюкозы, а на долю гексозомонофосфатного шунта приходится 7-11% [1].

Установить метаболические пути, в которые вовлекается углеводов, позволяет сопоставление количественного выхода радиоактивного CO_2 в процессе распада $1C^{14}$ – и $6C^{14}$ - глюкозы. Известно, что включение радиоактивных меток в углекислоту наблюдается при распаде $1C^{14}$ -- глюкозы по гексозомонофосфатному пути (ГМФП). Точкой образования радиоактивного CO_2 является реакция декарбоксилирования 6-фосфоглюконата, образующегося из глюкозо-6-фосфата. Использование в опыте $6C^{14}$ – глюкозы приводит к тому, что это атом, также как и первый (в отличие от остальных атомов) при распаде карбогидрата по пути Эмбдена-Мейергофа попадает в метильную группу пирувата, и при дальнейшем метаболизме в цикле Кребса судьба шестого атома углерода аналогична судьбе первого. Однако при распаде $6C^{14}$ - глюкозы по ГМФП включение метки в CO_2 на происходит, так как при декарбоксилировании 6-фосфоглюконата шестой углеродный атом переходит в состав рибулозо-5-фосфата. Обычно одинаковая радиоактивность CO_2 наблюдается при диссимиляции $1C^{14}$ – и $6C^{14}$ - глюкозы и указывает на расщепление молекул карбогидрата по пути Эмбдена-Мейергофа (гликолиза) с последующей утилизацией продуктов распада в цикле Кребса (цикле ди- и трикарбоновых кислот).

Результаты изучения путей диссимиляции глюкозы исходных, переходных и НФ холерных вибрионов с использованием глюкозы, меченой по первому или шестому атомам, представлены в Таблице 1. Изучение динамики изменений катаболизма глюкозы в клетках холерных вибрионов, пребывающих в микрокосмах, показало, что в популяциях, в которых 102- 103 м.кл/мл сохра-

няют способность расти на агаре Мартена, наблюдаются значительные изменения утилизации углеводов. Также как и в исходных культурах, в переходных и НФ уровень радиоактивности CO₂, выделенного в результате катаболизма глюкозы, меченой по первому и шестому атомам, был приблизительно равным.

Таблица 1.

Радиоактивность выделенного CO₂ при диссимиляции глюкозы некультивируемыми штаммами *V.cholerae* eltor и их исходными вариантами (2 часа инкубации)

Штаммы	Форма	Время в НС	Количество метки в % добавленной радиоактивности	
			1С14- глюкоза	6С14 - глюкоза
<i>V. cholerae</i> eltor 17551	исходная	-	23,9	16,8
	перех.	рост 105	0,04	0,039
<i>V. cholerae</i> eltor 17551	исходная	-	29,5	26,7
	перех.	рост 102	0,01	0,008
<i>V. cholerae</i> eltor 17551	исходная	-	26,4	22,7
	НФ	3 сут.	0,007	0,006
<i>V. cholerae</i> eltor 17551	исходная	-	29,8	23,4
	НФ	14 сут.	0	0
<i>V. cholerae</i> eltor 17551	исходная	-	21,9	19,6
	НФ	4 мес.	0	0
<i>V. cholerae</i> eltor 17558	исходная	-	30,6	29,4
	НФ	4мес.	0	0

Также как и в исходных культурах, в переходных и НФ уровень радиоактивности CO₂, выделенного в результате катаболизма глюкозы, меченой по первому и шестому атомам, был приблизительно равным. Однако уровень радиоактивности переходных и некультивируемых проб после двух часов инкубации был значительно ниже, чем у исходных вариантов. Выделение радиоактивного углекислого газа пропорционально длительности пребывания в микрокосмах. Через два часа инкубации остаточный уровень радиоактивно-

сти обнаружен в трехдневных некультивируемых пробах, в то время как в четырнадцатидневных и более старых радиоактивный респираторный CO₂ не обнаружен.

Увеличение времени инкубации с радиоактивной меткой до 17-18 часов в наших опытах привело к увеличению выхода меченого CO₂ и позволило обнаружить его у 14-дневных НФ (Таблица 2).

Таблица 2

Радиоактивность CO₂, выделенного при диссимиляции 1C¹⁴-глюкозы исходными и НФ холерных вибрионов при разном времени инкубации

Штаммы	Время в НФ	Форма	Радиоактивность CO ₂ , имп/мин	
			2 часа	17 часов
V. cholerae eltor 17551	-	исходная	21,840	157,580
-//-	-	переходная	1,102	16,127
-//-	3 сут.	НФ	0,007	2,420
-//-	14 сут.	НФ	0	0,507

Выделение углекислоты в результате утилизации 1C¹⁴-глюкозы по сравнению с исходными культурами в НФ снизилось до 1,5% - 0,3% у трехдневных и четырнадцатидневных вариантов соответственно. В переходных пробах этот показатель составил 10,4%. Увеличение времени инкубации до 17 часов позволило обнаружить остаточный уровень радиоактивности и в 25-дневных пробах. Согласно данным литературы [7], суммарная скорость образования респираторного CO₂ из атома 1C¹⁴-глюкозы, прямо характеризует скорость катаболизма по пентозофосфатному пути. Однако в системе гликолиз - цикл Кребса также может происходить эта реакция. Но превращение атома C¹ в CO₂ по пентозофосфатному пути является быстрым процессом (включает три ферментативных стадии), в то время, как соответствующие превращения в системе гликолиз - цикл Кребса предполагает прохождение всех реакций гликолиза и более чем однократного прохождения ферментативных реакций цикла Кребса, что ведет к замедленному выходу радиоактивного CO₂.

С целью обнаружения функционирования цикла Кребса в НФ использовали 2C¹⁴-глюкозу и 1,4C¹⁴-янтарную кислоту. Известно, что второй углеродный атом глюкозы при превращении ее по пути Эмбдена-Мейергофа попадает в карбоксильную группу ацетата и выделяется в виде радиоактивной углекислоты при диссимиляции в цикле Кребса на уровне α-кетоглутарата на втором обороте цикла. Также как и при использовании глюкозы, меченой по первому и шестому атомам, выход радиоактивного углекислого газа в НФ значительно ниже, чем в исходных культурах. В результате утилизации 2C¹⁴-

глюкозы он составил 20,2% от исходного, а 1,4C14-янтарной кислоты – 19% процентов. Обнаружено, что 2C14- глюкоза включается в CO₂ у четырнадцатидневных НФ, в то время, как 6C14-глюкоза не приводит к выходу радиоактивной углекислоты. Можно предположить, что у НФ холерного вибриона функционирует фрагмент цикла Кребса, где включается карбоксильная группа ацетата. Подтверждением этому предположению является включение 1,4C14 - янтарной кислоты, первый меченый атом которой превращается в 5-й углерод лимонной кислоты с последующим декарбоксилированием на уровне α-кетоглутарата, что приводит к выделению радиоактивного углекислого газа уже на первом обороте цикла. (Таблица 3).

Из данных литературы известно, что у некоторых гетеротрофов, например у *E. coli* [3], *Y. pestis* [10] может функционировать цикл Кребса, но в разорванном виде, таким образом, что одна часть реакций осуществляется от лимонной кислоты до α-кетоглутаровой, а вторая в обратном направлении – от щевелевоуксусной к янтарной. Запускается такая система реакций на основе метаболитов, получаемых в цикле Кальвина. Эти данные, а также сведения о функционировании цикла Кальвина в вибрионах, длительно пребывающих в морской воде [2] послужили основанием для попытки его выявления в НФ.

Таблица 3.

Радиоактивность CO₂ (% от добавленной радиоактивности) при диссимиляции добавленного субстрата исходными и некультивируемыми клетками холерных вибрионов через 2 часа инкубации

Штамм	Время в НФ	Субстрат			
		1,4C14-янтарная кислота		2C14-глюкоза	
		исходная	НФ	исходная	НФ
<i>V.cholerae</i> eltor 17551	14 сут	25,107	3,712	26,905	5,115
		21,240	5,177	21,217	4,556
		23,173	4,444	24,061	4,975
		x=23,173	x=4,444	x=24,061	x=4,882

С этой целью проведена серия опытов по определению активности одного из двух ключевых ферментов цикла Кальвина - рибулозодифосфаткарбоксилазы (РДФК), систематическое название 3-фосфо-D-глицерат-карбоксилаза димеризирующая. Синтез этого энзима клетками свидетельствует о функционировании пентозофосфатного цикла [6]. Указанный фермент катализирует фиксацию CO₂ в результате чего образуется первичный стабильный продукт

реакции – 3-фосфоглицерат. Функционирование цикла Кальвина обеспечивает клетку гексозами, пентозами для синтеза нуклеиновых кислот, фосфоглицериновым альдегидом, из которого в дальнейшем синтезируется пировиноградная кислота, используемая для образования аминокислот, липидов и других компонентов клетки.

Обнаружено (Таблица 4), что в двухмесячных НФ холерных вибрионов активно функционирует РДФК.

Таблица 4.

Активность рибулозодифосфаткарбоксилазы исходных, переходных и НФ холерных вибрионов

Штаммы	Среда микрокосма	Форма	Активность (имп/мин)
V. cholerae eltor 17551	физ.р-р	исходная	1,833
---	морская вода	переходная	9,800
---	дист.вода	НФ, 2 мес.	7,716
---	янт. к-та	НФ, 2 мес.	12,075
---	витамин Е	НФ, 2 мес.	1,668
---	каталаза	НФ, 2 мес.	3,969
V. cholerae 0139 17673	физ.р-р	исходная	1,764
---	морская вода	переходная	7,980
---	дист.вода	НФ, 2 мес.	3,634
---	янт. к-та	НФ, 2 мес.	11,201
---	витамин Е	НФ, 2 мес.	1,404
---	каталаза	НФ, 2 мес.	8,660

Различий в активности фермента между штаммами не выявлено как у исходных, так и у переходных и НФ. Активность фермента в исходных пробах была на фоновом уровне. Существенные различия получены в пробах из микрокосмов с разным составом. Максимальная активность обнаружена в некультивируемой пробе с добавлением 1мМ янтарной кислоты. Несколько более низкие, но превышающие исходный уровень в 5,4-4,6 раз, значения получены для переходных вариантов в микрокосмах с морской водой. Минимальные значения активности обнаружены в микрокосмах, где в качестве антиоксиданта добавлен витамин Е.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить:

Изменения в диссимилиации глюкозы происходят еще до утраты клетками способности образовывать колонии на питательных средах. Уменьшение количества и замедление выхода радиоактивного углекислого газа в НФ холер-

ных вибрионов, вероятно, связано с перестройкой метаболизма, проявляющемся в сдвиге его в сторону гликолиза и разрывом цепей цикла Кребса, характерным для хемолитоавтотрофов.

Пребывание в условиях микрокосмов при низкой температуре индуцирует функционирования цикла Кальвина, что вероятно, обеспечивает клетку необходимыми пластическими материалами и способствует выживанию при отсутствии органических питательных веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.П. Пути диссимиляции глюкозы, манозы и глюконата у неагглютинирующихся и Эль-Тор вибрионов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Ростов-на-Дону, 1975.
2. Бурша О.С., Каграманов В.С., Соколенко А.В. Определение активности рибулозодифосфаткарбоксилазы у неактивных вариантов *Vibrio cholerae* eltor. // Журн. микробиол., эпидемиоло. и иммунобиол. - 1999. - № 6.- С. 90.
3. Вершигора А.Е. Общая микробиология. – Киев, «Выща школа». 1988 –342с.
4. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. Некультивируемые формы бактерий и их роль в сохранении возбудителей сапронозов во внешней среде. // Журн. микробиол., эпидемол. и иммунобиол. – 1997. - №3. – С.116.
5. Голубинский Е.П. Дыхательный аппарат и окислительный метаболизм чумного микроба. Автореф. дис. ... док. мед. наук. Саратов, 1974..
6. Готшалк Г. Метаболизм бактерий. М., «Мир», 1982, 310с.
7. Доис Э. Количественные проблемы биохимии. М., «Мир», 1983 373с.
8. Ломов Ю.М., Асеева Л.Е., Каграманов В.С. Диссимиляция глюкозы штаммами Л-форм холерных вибрионов. //Микробиол. журн. –1983. –Т.45. -№3. – С.42.
9. Пичурина Н.Л. Эпидемиологические аспекты туляремии и совершенствование методов лабораторной диагностики (на примере Ростовской области). Автореф. дисс. ...канд.мед.наук – Саратов – 1999.
10. Рублев Б.Д. Пути обмена глюкозы и глюконата и окислительное фосфорилирование у чумного микроба. Автореф. дисс.... канд. мед. наук , Ростов-на-Дону, 1972.
11. Сучков Ю.Г., Худяков И.В., Емельяненко Е.Н. и др. О возможности сохранения возбудителя чумы в почве в покоящейся форме

- ме (некультивируемой форме). // Журн.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. –1997. -№4. –С.42.
12. Colwell R.R. Nonculturable but still viable and potentially pathogenic .//
 13. Int. J. Med. Microbiol.Virol.Parasitol.Infect.Dis. – 1993. –v.279. – N2. -p.154.
 14. Colwell R.R. Global climate and infections diseases: the cholera paradigm. //Scienc.- 1996.- V.274. –Dec.20.-P.2025
 15. Colwell R.R., Bryton P. R., Grimes D.J. et.al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for the releas of genetically engineered microorganisms. // Bio/ Technology. – 1985. –V.3. –P.817.
 16. Nilsson L., Oliver J.D., Kjelleberg S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state // J. Bacteriol., - 1991.- V.173., -N16,- P.5054.
 17. Wang C.H., Stern J., Gilmour C.M. et.al. Comparativ study of glucose catabolism by radiorespirometrie method . // J. Bacteriol. – 1958. –V.76. –N1. – P.207.