

БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПРОЗООНОЗОВ К ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

^{1,2} Бузолева Л.С., ²Кривошеева А.М., ^{1,2}Богатыренко Е.А., ³Синельникова М.А.

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия, buzoleva@mail.ru

²ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, Владивосток, Россия

³ФГБОУ ВПО «Приморская государственная сельскохозяйственная академия», Уссурийск, Россия

Для изучения механизмов адаптаций, обеспечивающих возможность размножения патогенных бактерий в объектах окружающей среды, референс - штаммы *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* культивировали на разных минеральных и органических средах при температурах 6-8°C, 18-20°C и 37°C. Показано, что при низкой температуре (6-8°C) сначала наблюдалась задержка размножения бактерий, но затем кривая роста достигала тех же показателей, что и при температуре 37°C. При этом были получены доказательства размножения, а не переживания исследуемых культур при низкой температуре. Скорость гидролиза ацетилтиохолина персиниями при низких температурах увеличивалась по сравнению с температурой 37°C. Показано существование конформационных изменений ферментов исследуемых культур при смене температурных условий. При низкотемпературном культивировании бактерий псевдотуберкулеза и листериоза было выявлено увеличение синтеза НАД и НАДФ в 1,5-2 раза и РНК на 7-8% по сравнению с культивированием бактерий при температуре 37°C. У *Y. pseudotuberculosis*, культивируемых на минеральных и органических средах в условиях низкой температуры отмечено более интенсивное накопление в мембранах ненасыщенных жирных кислот, чем при 37°C.

Ключевые слова: сапрозоозы, температура, биохимические адаптации

BIOCHEMICAL ADAPTATIONS OF SAPROZOOONOSIS AGENTS TO ENVIRONMENTAL FACTORS

^{1,2}Buzoleva L.S., ²Krivosheeva A.M., ^{1,2}Bogatyrenko E.A., ³Sinelnikova M.A.

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, e-mail: buzoleva@mail.ru

²Research institute of epidemiology and microbiology n.a. G.P. Somov, Vladivostok, Russia

³Primorsky state agricultural academy, Ussuriisk, Russia

For studying of adaptations mechanisms providing possibility of pathogenic bacteria reproduction in objects of environment the strains *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* were cultivated on different mineral and organic mediums at temperatures 6-8 °C, 18-20 °C and 37 °C. It is shown that at a low temperature (6-8 °C) at first the delay of bacteria reproduction was observed, but then the curve of growth reached the same indicators as at 37 °C. Thus the evidence of reproduction, but not surviving of the studied cultures was obtained at a low temperature. Hydrolysis of acetylthiocholin by *Y. pseudotuberculosis* at low temperatures increased in comparison with 37 °C. Existence of conformational enzymes changes of studied cultures with changing of temperature conditions is shown. Low temperature cultivation of *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* increased synthesis of NAD and NADPH in 1,5-2 times and RNA for 7-8% in comparison with cultivation of bacteria at 37 °C. *Y. pseudotuberculosis* cultivated on mineral and organic mediums in the conditions of low temperature had more intensive accumulation of nonsaturated fatty acids in membranes than at 37 °C.

Keywords: saprozoonosis, temperature, biochemical adaptations

Сообщения о длительном пребывании и размножении в окружающей среде ряда патогенных микроорганизмов заставили пересмотреть положение об источнике инфекции, и в последние годы объекты окружающей среды, наряду с теплокровным организмом, признаются в качестве резервуара для возбудителей сапрозоозов [3, 7]. В связи с этим появилась необходимость изучения широкого круга вопросов, связанных с сапрофитной фазой жизненного цикла факультативных паразитов. При попадании из теплокровного организма, где на них действуют относительно стабильные факторы среды (трофика,

температура, влажность, рН), в объекты окружающей среды, будь то почва, вода или растительный субстрат, патогенные бактерии испытывают влияние больших суточных и сезонных колебаний температур, рН, влажности, количества питательных веществ. Исходя из данных литературы и материалов собственных исследований, можно отметить, что возбудители сапрозоонозов способны осваивать огромное количество совершенно различных по своим условиям экологических ниш, поэтому они должны обладать высокой экологической пластичностью, обеспечиваемой различными адаптационными механизмами.

Цель исследования - изучение механизмов адаптации, обеспечивающих возможность размножения патогенных бактерий в объектах окружающей среды.

Материал и методы исследования

Для модельных экспериментов использовали референс-штаммы грамположительных *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis*, обладающих типичными биологическими свойствами. Для посевов использовали минеральные среды: Хирша, Герхарда, Классовского, бентонитовые, цеолитовые, фосфатно-буферный раствор и органические среды: растворы гуминовых кислот, растительный субстрат, рыбный питательный бульон. Температура культивирования составила 6-8°C, 18-20°C и 37°C. Для исследования активности холиноэстераз использовали субстраты: ацетилтиохолин, бутирилтиохолин и пропионилтиохолин. Активность ферментов исследовали по стандартным методикам [4]. Для построения кривых роста бактерий динамику численности последних определяли по мутности культуральной среды [10]. Для доказательства размножения, а не переживания исследуемых культур при низкой температуре использовали радиоизотопный метод с применением меченого по тритию тимидина [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительные исследования, проведенные нами при периодическом культивировании при низких и высоких температурах (6-8°C, 18-20°C и 37°C), в разных трофических условиях (минеральные среды: Хирша, Герхарда, Классовского, бентонитовые, цеолитовые, фосфатно-буферный раствор и органические среды: растворы гуминовых кислот, растительный субстрат, рыбный питательный бульон), показали, что кривые роста исследуемых бактерий имеют разный характер. При этом при относительно высокой температуре (37°C, 18-20°C) динамика размножения бактерий на любых органических средах выражалась обычной S-образной кривой, и культуры погибали на 15-30 сутки в зависимости от штамма и среды. В противоположность этому при низкой температуре (6-8°C) как на органических, так и на минеральных средах сначала наблюдалась задержка размножения, а затем кривая достигала тех же показателей, как при температуре 37°C, и

часто даже превышала ее. Стационарная фаза роста бактерий удерживалась на этом уровне в течение 9 месяцев (срок наблюдения). Следует отметить, что были получены доказательства размножения, а не переживания исследуемых культур при низкой температуре с помощью радиоизотопного метода с применением меченого по тритию тимидина. Выявленная закономерность была отмечена во всех исследуемых нами случаях при использовании самых различных питательных сред.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что температурный фактор является индуктором при переходе бактериальной популяции к новым условиям существования, способствуя переключению обменных процессов в клетке бактерий при низкой температуре на другой путь метаболизма, отличный от такового при температуре 37°C. Особый интерес в этом отношении имеет низкая температура культивирования бактерий, так как для возбудителей сапрозоонозов, способных обитать не только в организме теплокровных, но и в объектах окружающей среды, низкая температура столь же естественна, как и температура 37-39°C [5].

Известно, что в адаптивных реакциях организма на изменение условий окружающей среды большую роль играет регуляция активности уже существующих ферментов. Временные параметры биохимической адаптации варьируют в широких пределах – от длительных периодов, необходимых для эволюционного изменения аминокислотных последовательностей, до долей секунды, за которые может измениться активность уже присутствующих в клетке ферментов. Именно мгновенное изменение активности ферментов способствует восстановлению биохимических функций исследуемых бактерий при резкой смене сред обитания (теплокровный организм-окружающая среда) [9].

Проведенные нами сравнительные исследования активности гидролиза субстратов (ацетилтиохолина, бутирилтиохолина и пропионилтиохолина) холинэстеразами псевдотуберкулезного микроба при разных температурах показали, что при низкой температуре скорость гидролиза ацетилтиохолина увеличивается по сравнению с температурой 37°C. При этом скорость гидролиза субстратов находится в обратной зависимости от длины углеводородного радикала в ацильной части молекулы субстрата (АТХ >ПТХ >БТХ). Нами показано существование конформационных изменений у исследуемых культур при смене температурных условий с помощью сравнительного изучения субстратно-ингибиторных свойств ферментов этих бактерий при разных температурах. Применение фосфорорганических ингибиторов привело к увеличению разницы в активности сравниваемых температурных вариантов ферментов в 210 раз. Столь значительные отличия, по всей вероятности, объясняются различиями в структуре гидрофобных участков каталитического центра ферментов.

При низкотемпературном культивировании бактерий псевдотуберкулеза и листериоза было выявлено увеличение количества НАД и НАДФ в 1,5-2 раза по сравнению с культивированием бактерий при температуре 37° С, что согласуется с данными литературы [8] и свидетельствует о том, что пиридинзависимые дегидрогеназы при низкой температуре играют более значительную роль в клеточном дыхании, чем при высокой, активизируя, по-видимому, перенос электронов водорода по электронтранспортной цепи клеток и сопряженный с этим процессом синтез аденозинтрифосфата, являющегося основным аккумулятором энергии в клетках.

Поскольку данные наших экспериментов показали, что конструктивные процессы у «холодовых» и «тепловых» вариантов исследуемых культур протекают с разными энергетическими затратами, это позволило предположить существование у них разных путей метаболизма. Подтверждает это и разный характер роста исследуемых бактерий на метаболитах этих же культур при низкой и высокой температуре. Полученные результаты свидетельствуют о том, что культивирование *Y.pseudotuberculosis* при 37° С сопровождается снижением биосинтеза метаболитов цикла Кребса и свободных аминокислот, необходимых для последующего биосинтеза из них белков. При «тепловом» культивировании бактерии псевдотуберкулеза меньше синтезируют аминокислоты и органические кислоты, а больше потребляют готовые из культуральной среды, что подтверждается снижением их количества в среде. При «холодовом» культивировании обменные биохимические процессы в клетках исследуемых бактерий с участием органических кислот и аминокислот идут более экономно. Как свидетельствуют полученные нами данные, аминокислоты при низкой температуре почти не потребляются из культуральной среды, а в большей степени синтезируются бактериальной клеткой в цикле Кребса, активность работы которого подтверждалась наличием в культуральной среде органических кислот. Следовательно, адаптация исследуемых микроорганизмов к смене условий обитания находится в прямой зависимости от белоксинтезирующих процессов, т.е. от регуляции экспрессии генома, которая у прокариот идет на уровне транскрипции.

Одним из основных доказательств этого положения является усиленный синтез РНК [2]. В связи с этим были проведены сравнительные исследования, которые показали, что «холодовые» варианты исследуемых бактерий синтезировали РНК на 7-8% больше по сравнению с «тепловыми». Кроме того, проведенное сравнительное электронномикроскопическое исследование температурных вариантов ультраструктур клеток модельных бактерий показало, что при низкой температуре у псевдотуберкулезного и листериозного микробов отмечена значительно большая насыщенность клеток рибосомами. Известно, что при снижении температуры культивирования у бактерий уменьшается

продуктивность рибосом [6] и для того, чтобы поддержать скорость роста бактерий на определенном уровне, они компенсируют малую эффективность рибосом дополнительным синтезом этих органелл, проявляющимся в дополнительном увеличении содержания РНК в цитоплазме.

Компенсаторные процессы при воздействии низкой температуры проявлялись и на уровне изменения липидного состава мембран исследуемых бактерий. Так, у *Y. pseudotuberculosis*, культивируемых на минеральных и органических средах в условиях низкой температуры, среди жирных кислот, составляющих основную массу липидов, отмечено в большей степени накопление ненасыщенных жирных кислот, чем при 37°C. Накопление большого количества фосфолипидов и СЖК ненасыщенного ряда создает возможность большей «текучести» липидов и поддержания полужидкого состояния внутриклеточных мембран, что повышает их проницаемость и является одним из важных механизмов температурной адаптации.

Заключение

Таким образом, исследуемые микроорганизмы *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* - возбудители сапрозоонозов в процессе эволюции выработали механизмы адаптации к изменяющимся условиям среды, в частности к температуре, позволяющие сохранять метаболизм в пределах физиологической нормы. Образование ферментов с иной структурой активной поверхности, по-видимому, является стратегией организма в процессе его адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Данные наших исследований позволяют сделать вывод, что низкая температура является фактором, обеспечивающим возбудителям сапрозоонозов независимо от степени питания конкурентоспособность при жизнеобитании в различных объектах окружающей среды, что имеет большое эколого-эпидемическое значение.

Список литературы

1. Адаме Р. Использование радиоактивных изотопов в клеточной культуре. - М.: Наука, 1985. – 110 с.
2. Асеева И.В., Лысак Л.В. Влияние температуры культивирования на содержание нуклеиновых кислот у психрофильных почвенных бактерий // Микробиология. - 1981.- Т.50, № 5. – С. 818-822.
3. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д. Саморегуляция паразитарных систем. - Л.: Медицина, 1987. – 240 с.
4. Герхард Ф. Методы общей бактериологии.- М.: Мир,1984. – Т.2. – 467 с.

5. Лях С.П. Адаптация микроорганизмов к низким температурам.- М.: Наука, 1976. – 159 с.
6. Скворцова И.Н., Паникова Е.Л. Изучение почвенного психрофильного псевдомонаса // Микробиология. – 1977. - Т.46, № 4.- С. 1127-1129.
7. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: Экологические аспекты. – Новосибирск: Наука,1988. – 208 с.
8. Тафельштейн Э.Е., Голубинский Е.П., Марамович А.С., Попов А.В. Адаптивные механизмы в экологии псевдотуберкулезного микроба // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1995. – №4. – С.30-34.
9. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. - М.: Мир, 1988. – 568 с.
10. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

Рецензенты:

Мартынова А.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Владивосток;

Кузнецова Т.А., д.б.н., зав. лабораторией иммунологии ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, г. Владивосток.