

Н.П.Коннов, С.П.Заднова, О.С.Кузнецов

ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ДВУХ ФЕНОТИПИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛОНОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА МЕТОДАМИ ТРАНСМИССИОННОЙ И СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлены данные по изучению ультраструктуры двух фенотипически различных клонов (токсигенного и нетоксигенного) штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35 методами электронной микроскопии. На поверхности бактерий у нетоксигенного клона обнаружен дополнительный слой (капсула) полисахаридной природы (отсутствующий у токсигенного), который способствовал изменению морфологии колоний.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, токсигенные и нетоксигенные клетки, экзополисахаридный слой, трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия.

N.P.Konnov, S.P.Zadnova, O.S.Kuznetsov

Examination of the Ultrastructure of Two Phenotypically Different Clones of *V. cholerae* by Means of Transmission and Scanning Electron Microscopy

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Submitted are the data of examination of the ultrastructure of two phenotypically different clones (toxigenic and non-toxigenic) of *V. cholerae* Dakka35 strain by means of electron microscopy. Additional layer (capsule) of polysaccharide nature is identified on the surface of non-toxigenic clone bacteria. This layer (absent in toxigenic clone) alters colony morphology.

Key words: *Vibrio cholerae*, toxigenic and non-toxigenic cells, exopolysaccharide layer, transmission and scanning electron microscopy.

Несмотря на глубокие биологические и генетические исследования возбудителя холеры, многие свойства этого патогена остаются малоизученными. В частности, в настоящее время установлено, что популяция холерных вибрионов выделенных из различных сред обитания (от больных холерой, вибрионосителей, внешней среды) является гетерогенной [5, 6]. При изучении популяционного состава природных штаммов холерного вибриона классического биовара, выделенных на территории Пакистана и Индии в 1942–1969 гг. и хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий института «Микроб», были выявлены штаммы, в популяции которых присутствовали как типичные мелкие прозрачные Т-колонии (от англ. translucent), так и формирующие атипичные опалесцирующие мутные О-колонии (от англ. opaque). По данным ряда авторов [2, 7], изменение морфологии колоний таких штаммов коррелировало с изменением их признаков, в частности, они отличались по продукции ряда факторов патогенности, вирулентности и персистенции.

Существование различий в морфологии колоний могло быть связано с изменением биосинтеза поверхностных структур клетки, включая белки внешней мембраны, и экзополисахаридного слоя, обнаруженного у холерных вибрионов эльтор [4, 9]. Более того, появление клонов с атипичной морфологией могло быть следствием избирательной активности набора различных генов, в том числе и генов вирулентности [11].

В ранее проведенных исследованиях были обна-

ружены штаммы *Vibrio cholerae* классического биовара – Дакка 35, 9361 и В1307, популяции которых содержали колонии двух типов, отличающихся друг от друга не только по морфологии, продукции растворимой гемагглютинин/протеазы, подвижности, но и по уровню синтеза холерного токсина. По данным реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ), Т-колонии указанных штаммов продуцировали холерный токсин (Tox⁺ фенотип), тогда как О-клоны не синтезировали этот белок (Tox⁻ фенотип) [2]. Поскольку различия между колониями по четырем свойствам были наиболее выражены у штамма Дакка 35 серогруппы О1 классического биовара, то именно этот штамм был выбран в качестве модельного для последующих экспериментов.

В связи с вышеизложенным, целью наших исследований было изучение особенностей ультраструктуры бактерий *Vibrio cholerae* Дакка 35 и обнаруженных ими колоний методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы

В качестве питательных сред использовали бульон и агар Хоттингера (рН 7,2), LB-бульон и агар (рН 6,8). Бактерии токсигенного и нетоксигенного вариантов штамма Дакка 35 выращивали в течение суток при 37 °С. Трансмиссионную электронную микроскопию проводили, применяя следующие варианты исследований: метод ультратонких срезов, негативного контрастирования, электронно-

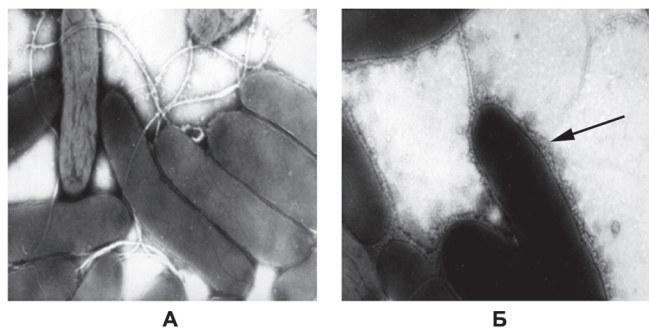


Рис. 1. Электронограмма поверхности клеток Т- (А) и О- (Б) клонов штамма *V. cholerae* Дакка 35. Стрелкой показан дополнительный слой, присутствующий на внешней поверхности клеток О-клона. Негативное контрастирование ФВК. Увеличение $\times 30000$

гистохимический метод, а также сканирующую электронную микроскопию [3]. Препараты просматривали в электронном микроскопе NU-12А и его сканирующей приставке HSE-2 («Hitachi», Япония).

Результаты и обсуждение

Для выявления особенностей клеточных структур, участвующих в изменении морфологии колоний в штаммах холерного вибриона, методом негативного контрастирования была изучена поверхность клеток и содержание в них поли- β -гидроксibuтирата модельного штамма *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара, имеющего в популяции Т- и О-клоны. При этом было установлено, что клетки Т- и О-клонов не содержали электронно-плотных гранул поли- β -гидроксibuтирата. В то же время при изучении двух фенотипически измененных вариантов *V. cholerae* Дакка 35 было выявлено, что на поверхности и между клетками О-вариантов присутствует рыхлый слой, который отсутствует у Т-клонов (рис. 1).

Обнаруженный дополнительный слой был выделен с поверхности двух фенотипически разных вариантов штамма *V. cholerae* Дакка 35, и при биохимическом исследовании было установлено, что он имеет полисахаридную природу [1].

Для подтверждения факта наличия у штамма *V. cholerae* Дакка 35 экзополисахаридного слоя бак-

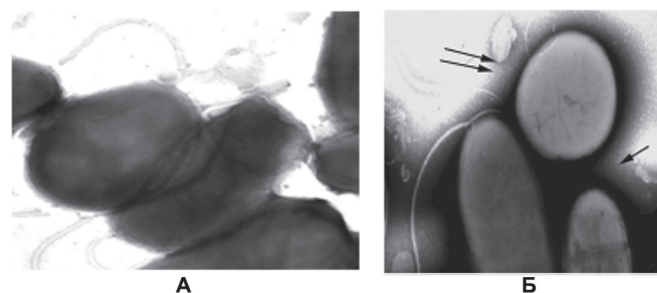


Рис. 2. Электронограмма двух фенотипически разных вариантов *V. cholerae* Дакка 35, окрашенных рутением красным. Негативное контрастирование:

А – Т-клоны, не синтезирующие экзополисахарид;

Б – О-клоны, продуцирующие экзополисахарид;

стрелкой отмечен экзополисахаридный слой. Увеличение $\times 35000$

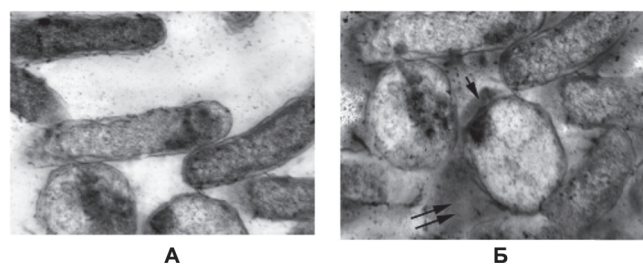


Рис. 3. То же, что на рис. 2. Ультратонкие срезы. Стрелками показан экзополисахаридный слой. Увеличение $\times 30000$

терии Т- и О-клонов были исследованы электронно-гистохимическим методом после их обработки красителем рутением красным, применяемым для обнаружения экзополисахарида у грамотрицательных бактерий [8, 10]. При изучении популяции клеток в электронном микроскопе было выявлено, что действительно между клетками О-варианта Дакка 35 является аморфный электронно-плотный слой окрашенных экзополисахаридов, тогда как у Т-варианта такой слой отсутствовал (рис. 2, 3).

На следующем этапе работы было высказано предположение, что присутствие дополнительного экзополисахаридного слоя на поверхности клеток О-вариантов может привести к изменению структуры колоний. Для проверки данного предположения было проведено изучение двух фенотипически разных вариантов штамма *V. cholerae* Дакка 35 в сканирующем электронном микроскопе. Исследование показало, что О-колонии *V. cholerae* Дакка 35 имели рыхлую поверхность с отпочкованными островковыми структурами (микрocolонии, рис. 4, А, стрелка), расположенными на ее поверхности. В основной своей массе, клетки были покрыты слизистой оболочкой в результате продукции экзополисахарида. Иное строение колоний было у популяции Т-клонов (рис. 4, Б). Поверхность размножающихся бактерий имела гладкую форму, клетки расположены упорядоченно в центре колонии и хаотично по ее краям.

В итоге, с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии было подтверждено наличие экзополисахаридного слоя у О-холерных вибрионов классического биовара, который способствовал изменению морфологии колоний. Таким образом, экзополисахаридный слой обеспечивает

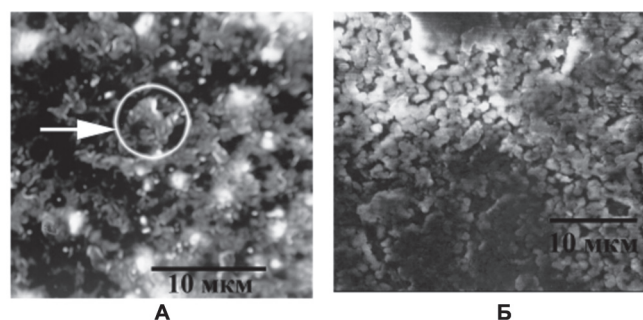


Рис. 4. Сканограммы колоний *V. cholerae* Дакка 35:

А – колонии О-варианта; Б – колонии Т-варианта

защиту возбудителя в неблагоприятных условиях внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заднова С.П., Топорков А.В., Исаев Н.Д. Фенотипический анализ гетерогенного штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35 Огава. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:86–8.
2. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Популяционная неоднородность природных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара: координированное изменение морфологии колоний, подвижности, токсигенности и ферментативных свойств. Пробл. особо опасных инф. 2005; 1(89):43–6.
3. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 224 с.
4. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68(1):5773–8.
5. Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. Mol. Microbiol. 2007; 63(4):995–1007.
6. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae* genomics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2008. 218 p.
7. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Sengupta D.K., Page W.J., Stranley C.M., Phillips T.E. Colonial opacity variations among the cholerae vibrios. Microbiology. 1997; 143(1):23–34.
8. Johnson J.A., Panigrahi P., Morris J.G. Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. Infect. Immun. 1992; 60(3):864–9.
9. Yildiz F.H., Schoonik G.K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96(7):4028–33.

10. Yildiz F.H., Dolganov N.A., Schoonik G.K. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of vps biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. J. Bacteriol. 2001; 183(5):1716–26.

11. Yildiz F.H., Lie X.S., Heydorn A., Schoonik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. Mol. Microbiol. 2004; 53(2):497–515.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Zаднова С.П., Топорков А.В., Исаев Н.Д. [Phenotypical analysis of heterogenic *Vibrio cholerae* strain Dacca 35 Ogawa]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 3:86–8.

2. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. [Populational heterogeneity of natural *Vibrio cholerae* strains of classical biovariant: coordinated changes in colony, morphology, motility, toxigenicity, and enzymatic characteristics]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2005; (89):43–6

3. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. [The Causative Agent of Plague: Ultrastructure and Localization in a Vector]. М.: Meditsina; 2007. 224 p.

Authors:

Konnov N.P., Zаднова S.P., Kuznetsov O.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@micoobe.ru

Об авторах:

Коннов Н.П., Заднова С.П., Кузнецов О.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@micoobe.ru

Поступила 27.10.11.