

С.П.Заднова, Н.И.Смирнова

## РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА В АДАПТАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

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

В обзоре представлены литературные данные об участии внеклеточного экзополисахарида в формировании морфологически измененных ругозных вариантов холерного вибриона, отличающихся большей устойчивостью к действию неблагоприятных факторов внешней среды, а также генетическим контролем синтеза ругозного экзополисахарида. Кроме того, приведены собственные экспериментальные данные об обнаружении в популяции *Vibrio cholerae* классического биовара клонов с измененной морфологией колоний (мутные) в результате продукции внеклеточного экзополисахарида и координированным изменением синтеза некоторых важных факторов патогенности (холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, подвижности). Полученные данные позволили высказать предположение о выявлении нового механизма адаптации холерных вибрионов классического биовара при смене среды обитания.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, ругозные варианты, экзополисахарид, адаптация.

*Vibrio cholerae* вызывает опасное заболевание человека – холеру, известное человечеству с 1817 г., когда была зафиксирована первая пандемия. Всего известно 7 пандемий холеры, вызванных холерными вибрионами O1 серогруппы разных биоваров. Предполагается, что возбудителями первых шести пандемий азиатской холеры (с 1817 по 1926 год) были вибрионы *V. cholerae* классического биовара. Причиной седьмой пандемии (с 1961 г. по настоящее время) являются холерные вибрионы другого биовара – эльтор, отличающиеся от классических вибрионов по ряду фенотипических и генетических свойств. Появившийся в 1992 г. новый возбудитель холеры O139 серогруппы вызывает локальные вспышки заболевания. Эльтор вибрионы являются менее вирулентными, чем классические, но они отличаются большей устойчивостью к действию неблагоприятных факторов внешней среды и могут длительное время находиться в воде открытых водоемов. Установлено, что при нахождении во внешней среде холерные вибрионы выработали несколько стратегий для выживания – переход в некультивируемое состояние, формирование биопленки и образование ругозных колоний [11, 17, 19, 28, 47, 48]. Два последних процесса зависят от способности *V. cholerae* синтезировать экзополисахарид или EPS (от англ. exopolysaccharide), или VPS (от англ. *Vibrio* polysaccharide) [9, 37, 47]. Необходимо отметить, что холерные вибрионы синтезируют три вида поверхностных структур, включающих полисахариды, – липополисахарид (LPS), капсула и EPS. Предполагают, что липополисахарид и капсула в основном защищают *V. cholerae* в организме человека, а EPS – во внешней среде [17]. Продукция экзополисахарида является важным этапом при формировании биопленки. Синтезируясь на конечном этапе формирования биопленки, EPS окружает клетки защитным чехлом и способствует формированию сложной трехмерной структуры с

каналами, через которые поступают питательные вещества к бактериям и вымываются продукты их жизнедеятельности [12, 13, 52]. Повышенная продукция экзополисахарида на поверхности отдельных клеток приводит к изменению морфологии колоний и формированию ругозных (морщинистых) или р колоний (рис. 1). При этом переключение «гладкие-ругозные» варианты у холерного вибриона классифицируется

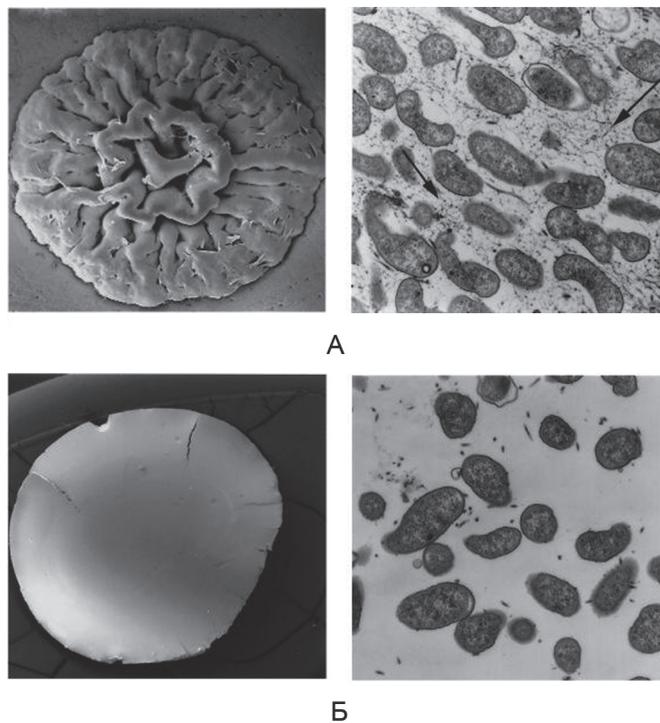


Рис. 1. Морфология колоний *V. cholerae* и электронно-микроскопическое выявление экзополисахаридного слоя (окраска рутением красным) [Yildiz F.H. et al., 2001]:

А – ругозная морфология колоний. Стрелками слева отмечен экзополисахаридный слой, окружающий бактерии.  
Б – гладкая морфология колоний

как фазовые вариации [8, 11, 15, 31, 34, 36, 37, 42, 45, 47, 49].

#### Состав и функция экзополисахарида ругозных вариантов

Ругозные варианты впервые описаны I. Balteneau в 1926 г. Впоследствии они были выявлены и другими исследователями в популяции как клинических штаммов *V. cholerae*, так и штаммов, выделенных из внешней среды. Очень часто холерные вибрионы, имеющие ругозную морфологию колоний, обнаруживаются в составе биопленки. Необходимо учитывать, что ругозные варианты не растут на TCBS (от англ. thiosulfate citrate bile salts) агаре, который используется для выделения природных изолятов *V. cholerae*. Так как в состав данной среды входит сахароза, наличие которой, как и других сахаров (декстрозы, фруктозы, мальтозы, арабинозы) в среде выращивания, приводит к резкому снижению продукции экзополисахарида. В связи с этим холерные вибрионы в ругозной форме не обнаруживаются при мониторинговых исследованиях [9, 27].

При смене морфологии колоний вирулентность штаммов *V. cholerae* не изменяется, ругозные варианты сохраняют полную вирулентность. Ругозные формы обнаружены не только у холерных вибрионов O1 серогруппы, но и у *V. cholerae* O139 серогруппы, а также у вибрионов неO1/неO139 серогрупп, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, что указывает на общий процесс, характерный для рода *Vibrio*. Кроме того, эти формы выявлены и у других патогенных бактерий (*Salmonella*, *Pseudomonas*) [8, 20, 32, 34].

В лабораторных условиях ругозные варианты получают при длительном культивировании штаммов на агаре LB при 37 °С, в щелочной пептонной воде, пептонной воде с 0,05 % цитрата железа, минимальной среде M9 при 16 °С или при 4 °С с аэрацией. Для эпидемических штаммов эльтор вибрионов, выделенных от больных, переход гладких вариантов в ругозные и обратно является довольно частым явлением [8, 15, 34].

Кроме морфологии колоний, ругозные варианты отличаются от гладких сниженной подвижностью, что связано с изменением экспрессии генов, необходимых для хемотаксиса и биосинтеза жгутика [8, 49]. Однако, несмотря на незначительную подвижность, которая является одним из необходимых составляющих при формировании биопленки, ругозные варианты лучше прикрепляются к абиотической поверхности и образуют более значительную биопленку, чем варианты с гладкой морфологией колоний. Толщина биопленки, образованной ругозными колониями, составляет более 35 мкм, а гладкие варианты формируют биопленку толщиной менее 25 мкм [8, 11, 47]. Это связано, во-первых, с повышенной продукцией EPS в ругозных вариантах, во-вторых, с увеличенной экспрессией генов, кодирующих хитиназу, участвующую в прикреплении вибрионов к абиотической поверхности, и, в-третьих, с уменьшением в ругозных вариантах синтеза аутоиндукторов, что имитирует

условия низкой плотности клеточной популяции и стимулирует процесс формирования биопленки [40, 49, 51].

Ругозные варианты в меньшей степени подвержены истреблению простейшими, обладают большей устойчивостью к действию сывороток, комплемента и различных повреждающих факторов внешней среды (хлор, кислая реакция среды, ультрафиолетовое излучение, осмотический и оксидативный стрессы), чем гладкие варианты [12, 31, 35, 36, 37, 42, 45, 47, 49]. Устойчивость ругозных вариантов к неблагоприятным факторам связана со способностью клеток к агрегации и образованию защитного полисахаридного матрикса [35, 37]. При этом сахара, входящие в состав экзополисахарида, способны инактивировать некоторые агенты, например хлор. Необходимо отметить, что сохранение патогена в хлорированной воде имеет очень важное эпидемиологическое значение, так как вспышки холеры чаще всего развиваются при водном пути заражения [49].

При химическом анализе экзополисахарида, выделенного из различных штаммов холерного вибриона эльтор биовара, были обнаружены незначительные отличия в составе моносахаридов. Так EPS штамма *V. cholerae* A1552 состоял в основном из глюкозы и галактозы и небольшого количества N-ацетил-D-глюкозамина, маннозы и ксилозы [47]. В то же время в экзополисахариде штамма *V. cholerae* TSI-4 глюкоза не обнаружена, но выявлены N-ацетилглюкозамин, D-манноза, 6-дезоксид-галактоза и D-галактоза [42]. Экзополисахаридный слой холерного вибриона, как и других грамотрицательных и грамположительных бактерий, выявляется методом электронной микроскопии при окраске бактерий поликатионными красителями (рис. 1).

#### Генетическая детерминированность синтеза экзополисахарида

Продукция экзополисахарида кодируется генами *vps* (30,7 т.п.н.) (от англ. *Vibrio polysaccharide synthesis*), расположенными на большой хромосоме в двух кластерах – *vpsI* (*vpsA-K*) и *vpsII* (*vpsL-Q*) (рис. 2). С одной стороны, данный участок ограничен геном *acrD*, ответственным за синтез белка, определяющего устойчивость холерных вибрионов к лекарственным средствам, а с другой – геном *glyA*, кодирующим серин гидроксиметил трансферазу [7, 47, 49]. Мутация в любом гене из *vps* кластера приводит к образованию гладких колоний и формированию вибрионами незначительной биопленки [7, 47, 48, 50]. В межгенном регионе находятся пять *rbmA-F* (от англ. rugosity and biofilm structure modulators) генов, участвующих в формировании ругозных колоний и поддержании архитектуры биопленки (рис. 2). При этом секретируемый белок RbmA (от англ. for rugosity and biofilm structure modulation), кодируемый первым геном, выполняет одновременно структурную и регуляторную функции, участвуя в стабилизации структуры экзополисахарида, а также контролируя содержание в клетке важной сигнальной молекулы –

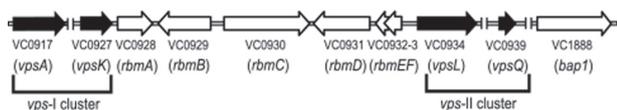


Рис. 2. Генетическая организация локуса хромосомы, содержащего гены *vps* [Fong J.C.N., Yildiz F.H., 2007]

вторичного мессенжера 3',5'-циклического дигуанинмонофосфата или c-di-GMP [21].

Позитивными регуляторами транскрипции генов *vps* являются белки VpsR (от англ. *Vibrio polysaccharide regulator*) и VpsT, которые гомологичны белкам двухкомпонентных регуляторных систем (рис. 3). Кроме генов *vps*, белок VpsR позитивно контролирует экспрессию еще 118 белков и репрессирует 173, причем функция половины из них не изучена. Данный белок принадлежит к транскрипционным регуляторам семейства NtrC, для которых характерно взаимодействие с альтернативными сигма факторами [14, 36, 48, 49]. При активации транскрипции генов *vps* белок VpsR взаимодействует с альтернативным сигма-фактором  $\sigma^{54}$  или белком RpoN, который сам выполняет роль глобального регулятора, так как контролирует транскрипцию более 20 % генов холерного вибриона. Установлено, что в ругозных вариантах RpoN позитивно регулирует транскрипцию 379 генов и негативно – 429 [26, 48, 49]. Экспрессия VpsR позитивно контролируется еще одним глобальным белком-регулятором – CRP (от англ. cyclic AMP receptor protein) [27]. Белки VpsR и VpsT являются не только позитивными регуляторами продукции экзополисахарида, но и белков, например RbmA, а также позитивно контролируют собственную транскрипцию (рис. 3) [49].

В 2004 г. F.H.Yildiz и соавторы высказали предположение, что регуляторная система, участвующая в синтезе экзополисахарида и формировании биопленки, функционирует не только при нахождении холерного вибриона во внешней среде, но и в организме человека и взаимосвязана с системой, контролирующей продукцию факторов патогенности (рис. 3). Впоследствии и другие исследователи, подтвердили данное предположение. B.W.Lim и со-

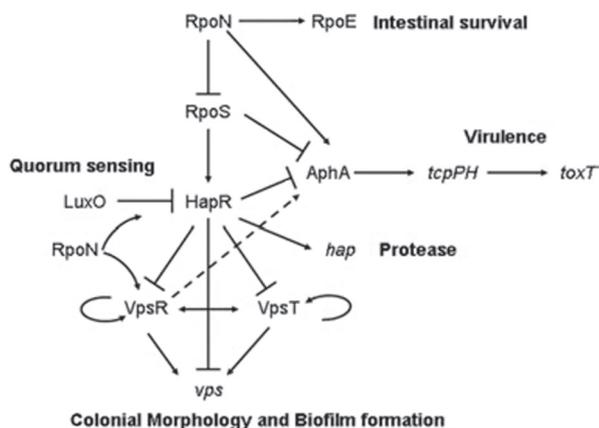


Рис. 3. Схема регуляторной сети *V. cholerae*, контролирующей экспрессию генов вирулентности и *vps* [Yildiz F.H. et al., 2004]

авторы [28], установили, что c-di-GMP, являющийся положительным регулятором транскрипции генов *vps* и увеличивающий синтез экзополисахарида и формирование биопленки, контролирует также продукцию факторов вирулентности у *V. cholerae*. Как известно, синтез и деградация c-di-GMP в клетках микроорганизмов контролируется белками с дигуанилат циклазной (DGC) и фосфодиэстеразной активностью (PDE) и содержащих соответственно GGDEF и EAL домены. У холерного вибриона в настоящее время выявлено 72 белка, обладающих данными активностями, синтез 7 из которых увеличен в ругозных вариантах [11, 17, 28, 29, 41, 50]. Первым идентифицированным белком, положительно контролирующим продукцию ругозного экзополисахарида посредством регуляции содержания c-di-GMP в клетках, был белок RocS (от англ. regulation of cell signaling). Данный белок содержит оба GGDEF и EAL домена и регулирует у *V. cholerae* не только продукцию EPS, но и подвижность [8, 36]. В 2010 г. исследования, проведенные M.Yang и соавт., показали, что важный белок регуляторного каскада – AphA (рис. 3), участвующий в активации транскрипции генов вирулентности, является в то же время и положительным регулятором гена *vpsT* [46].

Кроме позитивных, существуют и негативные регуляторы генов *vps* – белки CytR, RpoS и HapR. Белок CytR контролирует экспрессию генов, участвующих в катаболизме нуклеотидов. При мутации в гене *cytR* увеличивается уровень нуклеотидов, что является сигналом для планктонных клеток к формированию биопленки и синтезу экзополисахарида. Белок RpoS (альтернативный сигма фактор  $\sigma^5$ ) участвует в адаптации бактерий к различным стрессам, контролируя экспрессию большого количества генов в экспоненциальной и стационарной фазах роста. В том числе RpoS негативно регулирует экспрессию VpsT, но позитивно HapR, что приводит к снижению синтеза экзополисахарида [24, 49]. Транскрипционный регулятор HapR является центральным белком-регулятором в системе «quorum sensing» (QS), в которой координированная экспрессия различных генов зависит от плотности клеточной популяции и синтеза особых сигнальных молекул – аутоиндукторов. Методом транспозонного мутагенеза было показано, что HapR негативно регулирует формирование ругозных вариантов эльтор вибрионов, репрессируя продукцию и секрецию экзополисахарида. Причем, HapR, с одной стороны, уменьшает экспрессию генов *vps*, непосредственно блокируя промотор генов *vpsI* и уменьшая экспрессию *vpsR* и *vpsT* (рис. 3), а с другой – увеличивает экспрессию негативного регулятора *cytR* [23, 33, 49, 52]. Недавно установлено, что HapR также является непосредственным негативным регулятором транскрипции гена *cdgA*, кодирующего белок с дигуанилат циклазной активностью. В *hapR* мутантах продукция белка CdgA увеличена, что приводит к повышению концентрации c-di-GMP и стимулирует

процесс формирования ругозных колоний [11, 43].

Предполагается, что смена морфологии колоний от гладких к ругозным и наоборот является следствием изменения регуляторных процессов под влиянием определенных сигналов внешней среды, в том числе голодания. В то же время изменения рН и осмолярности не оказывают влияние на данный процесс [9]. Методом транспозонного мутагенеза между гладкими и ругозными вариантами выявлена дифференциальная экспрессия 124 генов, из которых в ругозных вариантах индуцируется 77 и репрессируется 47. Все обнаруженные гены объединены в один регуляторный сет, обозначенный как *S/R-pvr* (от англ. smooth-to-rugose phase variation regulated gene). В связи с тем, что для формирования ругозных колоний необходима продукция экзополисахарида, у данных вариантов обнаружена повышенная экспрессия генов *vps* оперона. При этом важная роль принадлежит генам *vpsA* из первого кластера и *vpsL* из второго, кодирующих продукцию ферментов, участвующих в биосинтезе полисахаридов. При мутации в этих генах бактерии формируют гладкие колонии [48, 49]. Необходимо отметить, что *S/R-pvr* гены участвуют не только в фазовых вариациях «гладкие-ругозные», но и в выполнении других функций клетки – формировании биопленки, регулировании подвижности, изменении гидрофобности поверхности и т.д. [27, 49]. Так, например, в ругозных вариантах увеличена продукция белков, входящих в систему секреции II типа и кодируемых *eps* (от англ. extracellular protein secretion) опероном. Как известно, через систему секреции II типа транспортируются холерный токсин, растворимая гемагглютинин/протеаза, хитиназа, нейраминидаза, липаза, белки внешней мембраны и т.д. [39, 49]. Для формирования ругозных колоний особенно необходима экспрессия двух генов секреторной системы – *epsD* и *epsE*, кодирующих соответственно белок-порин, участвующий в формировании пор во внешней мембране, и АТФ-азу, ответственную за энергетические процессы [6].

Таким образом, механизмы адаптации эльтор вибрионов во внешней среде, связанные с повышенной продукцией экзополисахарида и способностью к формированию биопленки и ругозных вариантов, изучены достаточно подробно. Однако, несмотря на широкое распространение эльтор вибрионов, классические вибрионы не исчезли совсем. Они выделялись в Бангладеш в 1979–1981 гг., а в 1982 г. вызвали большую вспышку холеры в данном регионе. В 2006 г. классические вибрионы наряду с эльтор были выделены в Ираке из реки Куфа. В настоящее время в разных регионах мира обнаружены штаммы *V. cholerae eltor*, содержащие в геноме профага СТХ классического типа. Как известно, в состав данного профага входят гены *ctxAB*, кодирующие продукцию холерного токсина, который является одним из ключевых факторов вирулентности и отвечает за развитие диареи. Данные штаммы продуцируют холерный токсин первого типа (классического) и отличаются

повышенной вирулентностью, что выражается в увеличении числа спорадических случаев холеры и утяжелении клиники заболевания. Предполагается, что приобретение генома фага СТХ классического биовара могло произойти в процессе трансформации при нахождении эльтор вибрионов на хитиновом субстрате в составе биопленки во внешней среде [5, 10, 22, 30, 38]. Принято считать, что холерные вибрионы классического биовара образуют естественный резервуар генов вирулентности. Однако механизмы, способствующие выживанию *V. cholerae* классического биовара во внешней среде, почти не изучены. К тому же, учитывая, что процент выделения ругозных вариантов эльтор вибрионов из водоемов даже на эндемичной по холере территории (Бангладеш) довольно низкий (3,5 %) [17], можно предположить, что существуют и другие механизмы, способствующие адаптации *V. cholerae* во внешней среде.

#### **Выявление и фенотипический анализ клонов *V. cholerae* классического биовара с координированной продукцией экзополисахарида и факторов патогенности**

Нами при изучении популяционного состава 105 природных штаммов холерного вибриона классического биовара было обнаружено 25 штаммов (23,8 %), в популяции которых присутствовали мутные (опалесцирующие) колонии в S форме. Выявленные варианты согласно данным литературы были обозначены как O (от англ. opaque) в отличие от типичных T (от англ. translucent) колоний. При дальнейшем изучении T и O клонов классических вибрионов было обнаружено 12 штаммов, у которых варибельность морфологии колоний сопровождалась изменением продукции 2–3 факторов вирулентности. Наибольшее внимание привлекли 4 штамма (*V. cholerae* 9361, Дакка 35, В-1307, 49520), у которых два варианта колоний четко отличались друг от друга по трем фенотипическим признакам – продукции холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, а также подвижности. O варианты были менее токсигенны, чем T клоны, продуцировали большее количество растворимой гемагглютинин/протеазы и были более подвижными. Как известно, растворимая гемагглютинин/протеаза и подвижность необходимы как для патогенеза, так и для выживания холерного вибриона во внешней среде [16, 44]. Необходимо отметить, что O колонии в штаммах холерного вибриона исследователи обнаруживали и ранее. При этом было выявлено, что T и O варианты эльтор вибрионов отличались по вирулентности и продукции гемолизина [3, 4, 18]. В то же время сведения о свойствах O вариантов классических вибрионов отсутствовали, не были установлены также поверхностные структуры, участвующие в изменении морфологии колоний O вариантов, не выявлены сигналы внешней среды, способствующие появлению O вариантов классических вибрионов, и не изучена их биологическая функция.

Для установления причины изменения морфологии колоний в штаммах холерного вибриона проведено электронно-микроскопическое и биохимическое изучение двух вариантов модельного штамма *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара. В результате было установлено, что изменение морфологии колоний у O клонов связано с синтезом дополнительного экзополисахаридного слоя [1]. Изучение моносахаридного состава экзополисахарида методом тонкослойной хроматографии показало наличие в нем рамнозы, глюкозы, галактозы, гексозамина. Сравнение состава EPS классических вибрионов с эльтор выявило, что в составе EPS ругозных колоний штаммов *V. cholerae* биовара эльтор входят также глюкозамин и манноза [47], не обнаруженные в EPS классических вибрионов. Для выяснения функциональной роли экзополисахарида был проведен сравнительный анализ резистентности O и T клонов к действию неблагоприятных факторов внешней среды, в качестве которых использовались высокие концентрации соли (2,5 М раствор NaCl) и перекиси водорода (20 мМ). В результате было обнаружено, что O варианты более устойчивы к действию осмотического и оксидативного стрессов по сравнению с T клонами. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы и подтверждают, что синтез экзополисахарида на поверхности клеток холерного вибриона способствует их устойчивости к действию этих факторов [8].

Поскольку у холерных вибрионов координированная экспрессия факторов вирулентности и персистенции контролируется несколькими глобальными регуляторными системами, то изменение активности данных генов может сопровождаться изменением уровня экспрессии генов, кодирующих белки с другими функциями. В этой связи проведен двумерный форец белковых экстрактов клеток двух фенотипически разных вариантов штамма *V. cholerae* Дакка 35. При сопоставлении протеомных профилей обнаружена дифференциальная экспрессия 57 различных белков, из которых в O клетках репрессировался синтез 26 белков и индуцировался синтез 31. При этом в продуцирующих экзополисахарид O вариантах выявлена повышенная экспрессия мембранных – OmpU и TolC и цитоплазматических – с метилтрансферазной и антиоксидантной активностью белков, обеспечивающих защиту клетки от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды [2].

При выявлении сигналов внешней среды, способствующих повышению экспрессии экзополисахарида, а также изменению других свойств клеток в штаммах холерного вибриона классического биовара, было установлено, что только при культивировании на средах с pH 9,0 в популяции T вариантов с частотой 80–85 % происходило появление клонов с координированным изменением уровня экспрессии генов, определяющих продукцию экзополисахарида, холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, а также подвижности, что приводило к смене

их фенотипа. Из этого следует, что pH окружающей среды является одним из сигналов, вызывающих переключение активности данных генов. Необходимо отметить, что водоемы с подобной щелочной реакцией среды во множестве присутствуют на эндемичной по холере территории, где и обнаруживаются классические вибрионы [25].

При проведении модельных экспериментов по изучению популяционного состава T клонов модельного штамма после их пребывания в неблагоприятных условиях внешней среды и O клонов после пребывания в организме крольчат-сосунков было установлено, что биологическая функция выявленного одновременного изменения нескольких свойств холерного вибриона классического биовара заключается, по-видимому, в том, что благодаря работе переключающего механизма популяция вибрионов получает возможность сохраняться при изменении окружающих ее условий. Поскольку O клетки штамма Дакка 35 продуцируют такие факторы персистенции, как экзополисахарид и белок OmpU, именно это тип клонов должен, по-видимому, доминировать в популяции T вариантов при попадании их во внешнюю среду. В организме чувствительного животного селективное преимущество должны иметь клетки, продуцирующие основной фактор вирулентности – холерный токсин, т.е. T варианты. Действительно, изучение популяционного состава T клона, находившегося в течение 6 сут в 0,9 % растворе натрия хлорида при комнатной температуре, показало, что среди 96 проверенных изолированных колоний у 54 (или 56,3 %) одновременно снизился синтез холерного токсина в 2,5–10 раз, но возросла продукция растворимой гемагглютинин/протеазы и экзополисахарида, а также увеличилась подвижность. В то же время изучение популяционного состава O клонов после их пребывания в тонком и толстом кишечнике кроликов-сосунков в течение 24–48 ч показало, что среди 775 изолированных колоний, полученных после посева содержимого кишечника на плотные среды, 50,8 % колоний стали продуцировать холерный токсин, и у них снизилась подвижность. Кроме того, фенотип 47 колоний (что составляет 6,0 % от общего числа проверенных колоний) был сходен с таковым T клонов. Эти данные показывают, что смена популяционного состава модельного штамма Дакка 35 действительно определяется различными факторами окружающей среды. Кроме того, обнаруженные нами в популяции холерных вибрионов клоны, не продуцирующие холерный токсин, но имеющие высокий уровень биосинтеза экзополисахарида и растворимой гемагглютинин/протеазы, содержат в хромосоме весь набор ключевых генов вирулентности, т.е. по своему генотипу они не отличались от эпидемически опасных штаммов. Обнаружение таких штаммов в окружающей среде может служить указанием на возможность эпидемических осложнений, поскольку при их попадании в организм человека состав

популяций может достаточно быстро измениться вследствие селективного отбора в макроорганизме клонов, продуцирующих основные факторы вирулентности.

Таким образом, можно предположить, что нами обнаружен новый механизм, способствующий повышению адапционных свойств клеток холерного вибриона классического биовара при попадании из организма хозяина во внешнюю среду, заключающийся в координированном уменьшении под действием определенных сигналов продукции холерного токсина, но увеличении синтеза экзополисахарида и других факторов персистенции. Возможно, благодаря работе данного переключющего механизма, популяция штаммов *V. cholerae* классического биовара получает возможность сохраняться во внешней среде.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заднова С.П., Топорков А.В., Исаев Н.Д. Фенотипический анализ штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35 Огава, имеющего гетерогенную популяцию. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:86–8.
2. Заднова С.П., Исаев Н.Д., Кутейкин-Тепляков К.Б., Тихонова О.В., Торопыгин И.Ю., Арчаков А.И., Смирнова Н.И. Протеомный анализ двух изогенных вариантов *Vibrio cholerae* классического биовара с альтернативной экспрессией генов вирулентности. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:11–6.
3. Милютин В.Н., Дрожжевкина М.С., Ломов Ю.М., Ураева В.С., Либинзон А.Е., Подосинникова Л.С. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов. Ростов н/Д: Ростовское книжное изд-во; 1981. 176 с.
4. Смирнова Н.И., Давыдова Н.И., Ливанова Л.Ф. Картирование генетического детерминанта, определяющего повышенный синтез холерного токсина штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 1994; 2:25–28.
5. Смирнова Н.И., Челдышева Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):3–12.
6. Ali A., Johnson J.A., Franco A.A., Metzger D.J., Connell T.D., Morris J.G., Sozhamannan S. Mutations in the extracellular protein secretion pathway genes (*eps*) interfere with rugose polysaccharide production in and motility of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2000a; 68:1967–74.
7. Ali A., Mahmud Z.H., Morris J.G., Sozhamannan S., Johnson J.A. Sequence analysis of TnpA insertion sites in *Vibrio cholerae* mutants defective in rugose polysaccharide production. Infect. Immun. 2000b; 68:6857–64.
8. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K.R. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68:5773–8.
9. Ali A., Morris J.G., Johnson J.A. Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:1426–9.
10. Al-Radhi A.A., Neama J.K., Dosh N.A. Catch up of classical and El-Tor *Vibrio cholerae* from Kufa river during disappearance of cholera in middle Euphrates area, Iraq. The second conference on the Biology of Vibrios «Vibrio 2007», 28 November – 1 December 2007 Institut Pasteur, Paris, France. Abstract book. Organizing committee D.Mazel, D.Gevers., F.Thompson. France; 2007. P98. P. 136.
11. 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 signaling pathway. Mol. Microbiol. 2007; 63:995–1007.
12. Beyhan S., Bilecen K., Salama S.R., Casper-Lindley C., Yildiz F.H. Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of *vpsT*, *vpsR*, and *hapR*. J. Bacteriol. 2007; 189:388–402.
13. Bomchil N., Watnick P., Kolter R. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. J. Bacteriol. 2003; 185:1384–90.
14. Casper-Lindley C., Yildiz F.H. VpsT is a transcriptional regulator required for expression of *vps* biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. J. Bacteriol. 2004; 186:1574–8.
15. Crutchley M.J. Rugose forms of an El Tor vibrio. J. Gen. Microbiol. 1968; 50(3):7.
16. Epstein P.R., Ford T.E., Colwell R.R. Marine ecosystems. Lancet. 1993; 342:1216–9.
17. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae* genomics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. P. 111–21.
18. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence and detachment. Infect. Immun. 1992; 60:472–8.
19. Fong J.C.N., Yildiz F.H. The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2007; 189:2319–30.
20. Grau B.L., Henk M.C., Garrison K.L., Oliver B.J., Schulz R.M., O'Reilly K.L., Pettis G.S. Further characterization of *Vibrio vulnificus* rugose variants and identification of a capsular and rugose exopolysaccharide gene cluster. Infect. Immun. 2008; 76:1485–97.
21. Fong J.C.N., Karplus K., Schoolnik G.K., Yildiz F.H. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2006; 188:1049–59.
22. Halder K., Das B., Nair G.B., Bhadra R.K. Molecular evidence favouring step-wise evolution of Mozambique *Vibrio cholerae* O1 El Tor hybrid strain. Microbiology. 2010; 156:99–107.
23. Hammer B.K., Bassler B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 2003; 50:101–4.
24. Haugo A.J., Watnick P.I. *Vibrio cholerae* CytR is a repressor of biofilm development. Mol. Microbiol. 2002; 45:471–83.
25. Huq A., Sack R.B., Nizam A., Longini I.M., Nair G.B., Ali A. et al. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 56:2370–73.
26. Klose K.E., Novik V., Mekalanos J.J. Identification of multiple sigma54-dependent transcriptional activators in *Vibrio cholerae*. Bacteriol. 1998; 180:5256–9.
27. Liang W., Silva A.J., Benitez J.A. The cyclic AMP receptor protein modulates colonial morphology in *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73:7482–7.
28. Lim B., Beyhan S., Meir J., Yildiz F.H. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. Mol. Microbiol. 2006; 60:331–48.
29. Lim B., Beyhan S., Yildiz F.H. Regulation of *Vibrio* polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2007; 189:717–29.
30. Nair G.B., Faruque Sh.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3296–9.
31. Matz C., McDougald D., Moreno A.M., Yung P.Y., Yildiz F.H., Kjelleberg S. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 2005; 102:16819–24.
32. McCarter L.L. OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 1998; 180:3166–73.
33. Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K., Bassler B.L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. Cell. 2002; 110:303–14.
34. Mizunoe Y., Wai S.N., Takade A., Yoshida S.I. Isolation and characterization of rugose form of *Vibrio cholerae* O139 strain MO10. Infect. Immun. 1999; 67:958–63.
35. Morris J.G., Szein M.B., Rice E.W., Natano J.P., Losonsky G.A., Panigrahi P., Tacket C.O., Johnson J.A. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. J. Infect. Dis. 1996; 174:1364–8.
36. Rashid M.H., Rajanna C., Ali A., Karaolis D.K. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. FEMS Microbiol. Lett. 2003; 227:113–9.
37. Rice E.W., Johnson C.H., Clark R.M., Fox K.R., Reasoner D.J., Dunnigan M.E., Panigrahi P., Johnson J.A., Morris J.S. Chlorine and survival of “rugose” *Vibrio cholerae*. Lancet. 1992; 340:740.
38. Samadi A.R., Hug M.I., Shahid N., Khan M.U., Eusde A., Rahman A.S.M.M., Yunus M., Faruque A.S.G. Classical *Vibrio cholerae* biotype displaces El Tor in Bangladesh. Lancet. 1983:805–7.
39. Sandkvist M. Biology of type II secretion. Mol. Microbiol. 2001; 40:271–83.
40. Schauder S., Shokat K., Surette M.G., Bassler B.L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. Mol. Microbiol. 2001; 41:463–76.
41. Tamayo R., Schild S., Pratt J.T., Camilli A. Role of cyclic di-GMP during El Tor biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the in vivo-induced cyclic di-GMP phosphodiesterase CdpA. Infect. Immun. 2008; 76:1617–27.
42. Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide material that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64:3648–55.
43. Waters C.M., Lu W., Rabinowitz J.D., Bassler B.L. Quorum

S.P.Zadnova, N.I.Smirnova

### The Role of Extracellular Exopolysaccharide in Cholera Agent Adaptation in the Environment

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The review presents literary data as regards the role of extracellular exopolysaccharide in formation of morphologically altered rugose variants of cholera vibrio. These variants differ by greater resistance to unfavorable factors of the environment as well as genetic control of synthesis of rugose exopolysaccharide. Besides, presented are authors' experimental data on detection of the clones with altered colony morphology (opaque) in the population of *Vibrio cholerae* of classical biovar. They appeared as a result of production of extracellular exopolysaccharide and coordinated alteration of synthesis of some vital pathogenicity factors (cholera toxin, soluble hemagglutinin/protease, motility). The data received suggest that revealed is new mechanism of classical cholera vibrios adaptation at a change of environmental conditions.

*Key words:* *Vibrio cholerae*, rugose variants, exopolysaccharide, adaptation.

#### Об авторах:

Заднова С.П., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

#### Authors:

Zadnova S.P., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 31.03.10.

sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. J. Bacteriol. 2008; 190:2527–36.

44. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol. Microbiol. 1999; 34:586–95.

45. Watnick P.I., Lauriano C.M., Klose K.E., Croal L., Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol. Microbiol. 2001; 39:223–35.

46. Yang M., Frey E.M., Liu Z., Bishar R., Zhu J. The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating expression of the biofilm regulator VpsT. Infect. Immun. 2010; 78:697–703.

47. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96:4028–33.

48. Yildiz F.H., Dolganov N.A., Schoolnik 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; 183:1716–26.

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

50. Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. Trends Microbiol. 2009; 17:109–18.

51. Zhu J., Miller M.B., Vance R.E., Dziejman M., Bassler B.L., Mekalanos J.J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99:3129–34.

52. Zhu J., Mekalanos J.J. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. Dev. Cell. 2003; 5:647–56.