

Влияние pH-стресса на спектры жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*

Е.С.Шипко, О.В.Дуванова, Р.В.Писанов, В.Д.Кругликов

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,
Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель. Изучить спектры жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae* разной эпидемической значимости, выделенных из различных источников, в условиях кислотного и щелочного стрессов.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп (ctxAB⁺tcpA⁺, ctxAB⁺tcpA⁻). Для моделирования кислотного/щелочного стресса в условиях *in vitro* штаммы инкубировали в жидкой питательной среде с добавлением соляной, уксусной кислот и щелочи до pH 4,0–11,5. Из клеток получали препараты жирных кислот и анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе «Маэстро 2-7802» («ИнтерЛаб», Москва) при помощи коммерческой библиотеки масс-спектров NIST17.

Результаты. При анализе спектров жирных кислот были выявлены отличия в ответной реакции на краткосрочный кислотный стресс у клинических штаммов и штаммов, выделенных из воды поверхностных водоемов: клинические штаммы активировали механизм cis/trans-изомеризации ненасыщенных жирных кислот, тогда как водные повышали сатурацию фосфолипидов. В то же время в условиях пролонгированного умеренного кислотного стресса у всех штаммов, взятых в исследование, детектированы аналогичные реакции: увеличение ненасыщенности мембранных липидов и циклизация ацильных цепей. Под воздействием щелочного стресса у штаммов *V. cholerae* независимо от объекта выделения наблюдалось появление trans-изомеров моноеновых и диеновых жирных кислот, синтез разветвленных, циклопропановых и гидроксикислот. Помимо изменений в жирно-кислотном составе, в условиях pH-стресса отмечен синтез сахаров, аминов, спиртов, амидов жирных кислот и некоторых вторичных метаболитов, возможно, играющих протективную роль.

Заключение. Специфические изменения в липидоме и метаболоме клетки в ответ на изменения pH среды могут увеличивать адаптационный/персистентный потенциал холерного вибриона, способствуя сохранению возбудителя в объектах окружающей среды и в организме человека.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, жирные кислоты, кислотный стресс, щелочной стресс

Для цитирования: Шипко Е.С., Дуванова О.В., Писанов Р.В., Кругликов В.Д. Влияние pH-стресса на спектры жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*. Бактериология. 2025; 10(3): 26–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-26-32

The effect of pH stress on the fatty acid spectra of *Vibrio cholerae* strains

E.S.Shipko, O.V.Duvanova, R.V.Pisanov, V.D.Kruglikov

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Goal. To study the spectra of fatty acids of *Vibrio cholerae* strains of different epidemic significance isolated from various sources under conditions of acid and alkaline stress.

Materials and methods. *V. cholerae* strains O1, O139 and nonO1/non O139 serogroups (ctxAB⁺tcpA⁺, ctxAB⁺tcpA⁻) were used in the work. To simulate acid/alkaline stress under *in vitro* conditions, the strains were incubated in a liquid nutrient medium with the addition of hydrochloric, acetic acids and alkali to pH 4.0–11.5. Fatty acid preparations were obtained from the cells and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry on the Maestro 2-7802 device (InterLab, Moscow) using the NIST17 commercial mass spectrum library.

Results. When analyzing the spectra of fatty acids, differences were revealed in the response to short-term acid stress in clinical strains and strains isolated from surface water: clinical strains activated the mechanism of cis/trans isomerization of unsaturated fatty acids, whereas aqueous ones increased phospholipid saturation. At the same time, under conditions of prolonged moderate acid stress, similar reactions were detected in all strains taken into the study: an increase in the unsaturation of membrane lipids and cyclization of acyl chains. Under the influence of alkaline stress in *V. cholerae* strains, regardless of the object of isolation, the appearance of trans isomers of monoene and diene fatty acids, the synthesis of branched, cyclopropane and hydroxyacids was observed. In addition to changes in the fatty acid composition, the synthesis of sugars, amines, alcohols, fatty acid amides, and some secondary metabolites, possibly playing a protective role, was noted under pH stress conditions.

Для корреспонденции:

Шипко Елена Сергеевна, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9133

Статья поступила 11.08.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Elena S. Shipko, Junior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9133

The article was received 11.08.2025, accepted for publication 30.09.2025

Conclusion. Specific changes in lipids and cell metabolism in response to changes in the pH of the environment can increase the adaptive/persistent potential of *V. cholerae*, contributing to the preservation of the pathogen in environmental objects and in the human body.

Key words: *Vibrio cholerae*, fatty acids, acid stress, alkaline stress

For citation: Shipko E.S., Duvanova O.V., Pisanov R.V., Kruglikov V.D. The effect of pH stress on the fatty acid spectra of *Vibrio cholerae* strains. Bacteriology. 2025; 10(3): 26–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-26-32

Одним из наиболее важных параметров окружающей среды, влияющих на рост и размножение микроорганизмов, является локальная концентрация протонов, которую измеряют как pH.

Микроорганизмы сталкиваются с флуктуациями pH как во внешней среде (в результате естественных геохимических, бактериальных метаболических процессов, антропогенных факторов), так и внутри макроорганизма в течение инфекционного процесса или установления симбиотических связей [1]. Способность выживать при прохождении через кислотный/щелочной барьеры желудочно-кишечного тракта человека является важнейшим этапом жизненного цикла энтеропатогенных бактерий, в т.ч. холерного вибриона, и связано с развитием адаптивной реакции на стресс, известной как реакция толерантности (РТ). Показано, что РТ повышает процент выживших бактериальных клеток в организме хозяина, увеличивая инфекционность возбудителя [2, 3]. РТ зависит от ряда факторов: типа кислоты, концентрации, уровня pH, фазы роста; в ее реализации задействовано более одного молекулярного механизма. Для противодействия критическому изменению pH внутриклеточной среды в условиях кислотного/щелочного стресса бактерии используют несколько стратегий: производство буферных соединений, активацию специальных мембранных насосов, компенсаторные ферментативные сдвиги метаболизма, биопленкообразование [4, 5]. Одним из механизмов устойчивости бактерий к экологическим стрессам является ремоделирование композиционного состава клеточной мембраны. Ключевыми структурными компонентами мембран, первыми реагирующими на изменения параметров окружающей среды, являются жирные кислоты (ЖК), спектры которых, как показано в ряде работ, коррелируют с ацидо/алкилотолерантностью некоторых микроорганизмов [6–8]. Десатурация, элонгация, циклопропанирование, iso/anteiso-разветвления и cis/trans-изомеризация ацильных цепей ЖК модифицируют физические свойства клеточной мембраны, включая температуру фазового перехода, микровязкость, заряд, которые, в свою очередь, модулируют активность мембраносвязанных ферментов, рецепторов, каналов и транспортеров, обеспечивая мощный адаптационный ответ, направленный на защиту внутриклеточной среды. Вызывая изменения в клеточной структуре, метаболизме, транспортных схемах, РТ также может индуцировать перекрестную защиту от других типов стресса, включая стресс, индуцированный антибактериальными препаратами, способствовать переходу в некультивируемое состояние (крайнюю форму адаптации) [9]. Учитывая, что развитие РТ к pH-стрессу повышает степень колонизации биотопов хозяина, интенсивность пролиферации и инвазии, модулирует уровень токсинопродукции, изучение механизмов адаптации к данному виду стресса имеет большое значение.

Цель работы состояла в изучении спектров жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae* разной эпидемической значимости, выделенных из различных источников, в условиях кислотного и щелочного стрессов.

Материалы и методы

В экспериментах использовали следующие штаммы *V. cholerae*: токсигенные штаммы, выделенные из клинического материала: O1 classical №13603, O1 El Tor №18332, O139 №16064, и нетоксигенные штаммы, выделенные из воды: O1 El Tor №P-20000, O139 №17682, nonO1/nonO139 №P-20453. Все штаммы были получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, где они хранились в ампулах в лиофилизированном состоянии.

Моделирование pH-стресса в условиях *in vitro* проводили согласно схеме, представленной в таблице.

Во всех экспериментах контролями служили культуры штаммов *V. cholerae*, выращенные в 1%-й пептонной воде (pH 7,8) при 37°C.

Жизнеспособность (наличие или отсутствие роста) исследуемых штаммов оценивали бактериологическим методом.

Определение спектров ЖК мембранных липидов проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе «Маэстро-2» («Интерлаб», Россия), созданном на базе Agilent при помощи коммерческого ПО «MSD ChemStation» и базы данных химических соединений NIST2017. Дериватизацию ЖК выполняли согласно протоколу, описанному ранее [10]. Концентрации отдельных ЖК выражали в процентах от общей площади пиков и представляли в виде средних арифметических значений (полученных в трех независимых экспериментах).

Индекс насыщенности фосфолипидов определяли по соотношению насыщенных жирных кислот (НЖК) к ненасыщенным жирным кислотам (ННЖК).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Для проведения попарных сравнений использовали t-критерий Стьюдента. Доверительный интервал был установлен на уровне 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение ростовых характеристик *V. cholerae* при разных значениях pH среды

Для изучения механизмов адаптации возбудителя холеры к pH-стрессу первоначально была изучена динамика роста штаммов *V. cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 в диапазоне pH 4,0–11,5. Выявлено, что у всех штаммов *V. cholerae*, взя-

Таблица. Схема моделирования кислотного/щелочного стрессов
 Table. Acid/alkaline stress modeling scheme

Стресс/ Stress	Питательная среда / Nutrient medium	pH	Корректирующий агент / Corrective agent	Концентрация клеток, кл/мл / Cell concentration, cells/ml	Время инкубации, ч / Incubation time, h
Сублетальный кислотный / Sublethal acid	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	4,0	6N HCl	109	0,25–0,5–1–1,5–2
Умеренный кислотный / Moderate acid	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	6,0	1N CH ₃ COOH	109	2–24
Умеренный щелочной / Moderate alkaline	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	9,0	5N NaOH	109	2–24
Экстремальный щелочной / Extreme alkaline	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	11,5	5N NaOH	109	2–24

тых в исследование, диапазон роста составлял pH 6,0–11,5 с оптимумом в области 7,8–9,0. При pH 4,0 рост отсутствовал, а жизнеспособность культуры резко снижалась по мере увеличения времени инкубации с 15 до 60 мин (КОЕ/мл $10^4 \rightarrow 10^1$). При инкубации >60 мин ни один штамм не смог вырасти и сформировать колонии на агаризованной среде. Штаммы *V. cholerae* проявляли разную степень толерантности к уксусной кислоте. Наибольшую устойчивость продемонстрировали штаммы O1 El Tor №P-20000 и nonO1/nonO139 №P-20453: наличие активного роста через 24 ч инкубации при концентрации уксусной кислоты в питательной среде 90 и 50 мМ/л соответственно. Наименьшей устойчивостью обладал штамм O1 classical 13603 – 20 мМ/л. При pH 11,5 все штаммы возбудителя холеры формировали плотную пленку на границе жидкость/воздух (10^8 КОЕ/мл).

Таким образом, были определены следующие условия постановки экспериментов: инкубация при pH 4,0 в течение 60 мин для моделирования сублетального кислотного стресса; инкубация при pH 6,0 в течение 2 и 24 ч для моделирования умеренного кислотного стресса; инкубация при pH 9,0 и 11,5 в течение 2 и 24 ч для моделирования умеренного и экстремального щелочного стрессов.

Влияние кислотного стресса на спектр жирных кислот штаммов *V. cholerae*

Анализ спектров ЖК, выявленных у контрольных образцов (37°C; pH 7,8) штаммов *V. cholerae*, показал преимущественное содержание гексадекановой (C16:0), гексадеценовой (C16:1Δ7) и октадеценовой (C18:1Δ9 и C18:1Δ11) кислот. Суммарное количество этих ЖК варьировало от 62,56 до 80,95%.

После инкубации в условиях сублетального (pH 4,0) и умеренного (pH 6,0) кислотного стресса были выявлены статистически значимые изменения в составе ЖК относительно контролей ($p \leq 0,05$).

Обнаружено, что в ответ на сублетальный кислотный стресс (pH 4,0), индуцированный добавлением в питательную среду соляной кислоты, штаммы возбудителя холеры O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп задействовали несколько типов реакций. Клинические штаммы №№ 13603, 18332, 16064 увеличивали синтез ННЖК (C16:1Δ7; C18:1Δ11) и активировали процесс cis/trans-изомеризации. Геометрическая изомерия является одной из срочных реакций бактериальной клетки на резко изменившиеся условия среды и реализуется в том случае, когда синтез ЖК *de novo* не может быть осуществлен. trans-ННЖК имеют более линейную

структуру по сравнению с cis-изомерами и, подобно НЖК, повышают вязкость мембраны. Количество trans-изомеров (trans-C18:1Δ11) достигало 10–25% от всех детектированных ЖК. Напротив, штаммы, изолированные из объектов окружающей среды, в ответ на сублетальный кислотный шок увеличивали индекс насыщенности мембранных липидов с 1,64–3,5 до 6,96–15,2. Данный процесс был обусловлен увеличением продукции гексадекановой (штамм O139 №17682) и октадекановой кислот (C18:0) (штаммы O1 №P-20000 и nonO1/nonO139 №P-20453) (рис. 1).

Однако высокая сатурация фосфолипидов приводит к избыточной жесткости мембраны и отрицательно сказывается на активности и функциях мембраносвязанных белков. Поэтому на фоне истощения ННЖК в экстремально кислых условиях штаммы холерных вибрионов, изолированные из окружающей среды, вводят в липидный состав разветвлен-

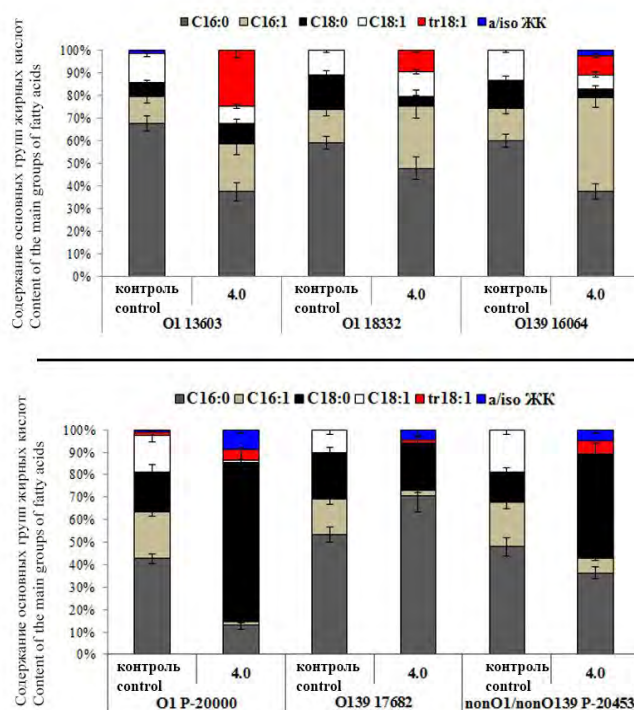


Рис. 1. Спектры ЖК штаммов *V. cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп при сублетальном кислотном стрессе соляной кислотой (pH 4,0, 37°C, 60 мин). Вверху – штаммы ctx⁺tcp⁺. Внизу – ctx⁺tcp⁺.

Fig. 1. FA spectra of *V. cholerae* strains O1, O139, nonO1/nonO139 serogroups under sublethal acid stress with hydrochloric acid (pH 4.0, 37°C, 60 minutes). Strains ctx⁺tcp⁺ are at the top. Strains ctx⁺tcp⁺ are at the bottom.

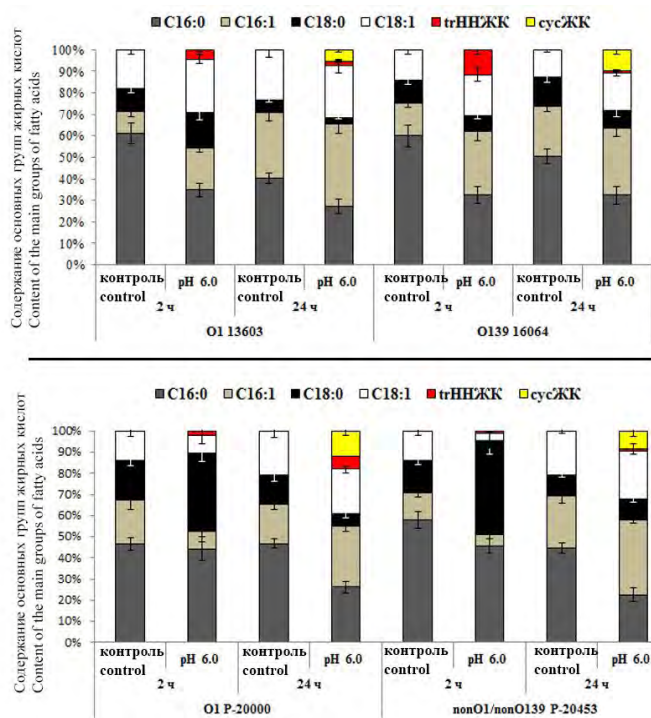


Рис. 2. Спектры жирных кислот штаммов *V. cholerae* при умеренном кислотном стрессе уксусной кислотой (pH 6,0, 37°C, 2–24 ч).

Fig. 2. Fatty acid spectra of *V. cholerae* strains under moderate acid stress with acetic acid (pH 6.0, 37°C, 2–24 hours). Strains *ctx+**tcp+* at the top. Strains *ctx-**tcp-* at the bottom.

ные ЖК и стериноподобные соединения, поддерживающие адекватную текучесть липидного бислоя. Содержание anteiso-разветвленных ЖК (a17:0 и a18:0) в условиях кислотного шока (pH 4,0) составляло 5–20%. Эксперименты на модельных мембранах показали, что мембраны, содержащие фосфолипиды с разветвленными ЖК, оказались более текучие, чем мембраны, содержащие линейные ЖК. ЖК с anteiso-разветвлением более эффективно разжижали мембраны, чем iso-разветвленные. Корреляция между увеличением доли anteiso-ЖК и устойчивостью к pH-стрессу выявлена у ряда других бактериальных патогенов [11].

У штаммов *V. cholerae*, выделенных из воды: O1 El Tor №P-20000, nonO1/nonO139 №P-20453 и O139 №17682, в условиях сублетального кислотного стресса отмечена аккумуляция изопrenoидных соединений: сквалена, геранилгераниола. Сквален – ациклический тритерпен, важный промежуточный продукт для синтеза многих биоактивных терпеноидов, таких как гопаиноиды и стеринны, которые выполняют жизненно важные функции в клетках микроорганизмов, включая антиоксидантную. Данные соединения связаны с образованием функциональных мембранных микродомов, также называемых липидными рафтами. Эти области имеют относительно низкую текучесть мембраны и связаны с белками-флотилинами [12]. Делеция генов, ответственных за синтез гопаиноидов и стериннов, повышает чувствительность бактерий к антибиотикам и детергентам, а также восприимчивость к стрессам, включая изменение pH, температуры и осмотического давления. Ранее у представителей рода *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* и *V. fischeri*) была обнаружена способность синтезировать

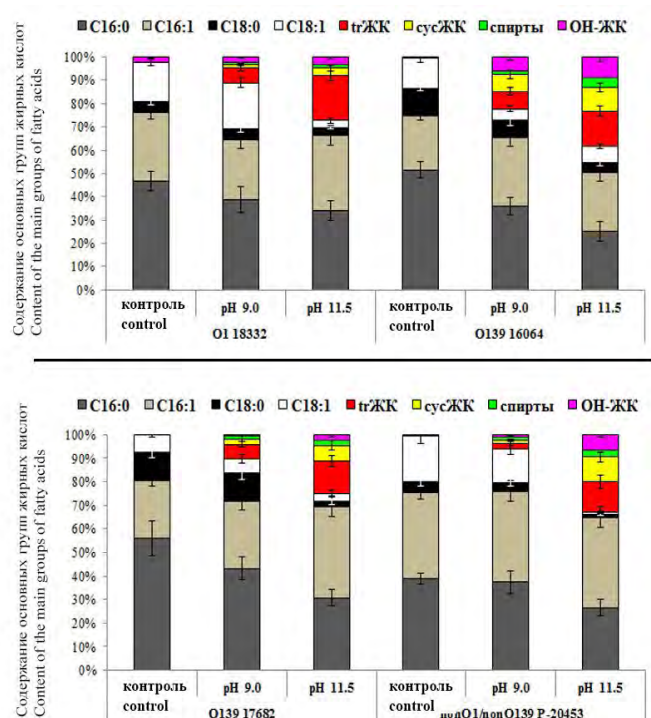


Рис. 3. Спектры ЖК штаммов *V. cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп при щелочном стрессе (pH 9,0–11,5, 37°C, 24 ч).

Fig. 3. Fatty acid spectra of *V. cholerae* strains O1, O139, nonO1/nonO139 serogroups under alkaline stress (pH 9.0–11.5, 37°C, 24 h).

изопrenoиды по мевалонатному и по альтернативному 2С-метил-D-эритритол-4-фосфатному пути [13]. Две изопреновые единицы конденсируются с образованием геранилпирофосфата, трех единиц фарнезилпирофосфата, а при конденсации – еще двух единиц геранилгераниолпирофосфата. Затем они циклизуются, гликозилируются и модифицируются с получением различных терпеноидов: моно-, ди-, три-, тетра- и сесквитерпеноидов.

Помимо соляной кислоты, в желудке хозяина бактериальные клетки подвергаются воздействию слабых органических кислот, продуцируемых факультативно-анаэробной и облигатно-анаэробной микрофлорой терминальной части подвздошной и толстой кишок: уксусной, пропионовой, масляной, валериановой и др., механизмы адаптации к которым у бактерий мало изучены. Органические кислоты способны свободно диффундировать через бактериальные мембраны в незаряженном состоянии, а затем диссоциировать внутри клетки с высвобождением протонов во внутриклеточную среду, вызывая подкисление цитоплазмы, нарушение химического градиента и основных метаболических путей [2, 14]. Анионы диссоциированной кислоты, накапливаясь внутри клетки, вызывают тургорный стресс, снижают подвижность клеток и нарушают функцию мембраны. Уксусная кислота является доминирующим экзосимбиотом эндосимбионта человека (60% от всех летучих кислот). Многообразное действие и клинические проявления этого действия позволили отнести молекулы уксусной кислоты и других летучих кислот к классу универсальных химических носителей информации в организме человека [15]. Показано, что экзогенный ацетат влияет на подвижность, образование биопленок, реакции на

стресс и модулирует патофизиологические реакции некоторых энтеропатогенов [16].

Начиная с первых часов воздействия умеренного кислотного стресса (рН 6,0), индуцированного добавлением в питательную среду уксусной кислоты, у большинства штаммов *V. cholerae*, взятых в исследование, отмечено увеличение уровня *cis*-ННЖК (С16:1 и С18:1), за исключением штаммов O1 №P-20000 и nonO1/nonO139 №P-20453, у которых кратковременный стресс вызывал увеличение С16:0 и С18:0, а пролонгированный – их десатурацию (рис. 2).

Ранее на модели *Escherichia coli* зарубежными исследователями продемонстрирована роль двухкомпонентной системы Cpx в распознавании кислого pH среды и активации транскрипции генов биосинтеза ННЖК, что приводит к изменению текучести клеточной мембраны и обеспечивает рост *E. coli* в условиях кислотного стресса. Предполагают, что увеличение ненасыщенности фосфолипидов в условиях кислотного стресса не только влияет на текучесть мембраны энтеропатогенов, но и регулирует активность F1F0-АТФазы, которая участвует в поддержании гомеостаза цитозольного pH путем вытеснения протонов из клетки, а также модулирует активность фосфотрансферазной системы (регулирует широкий спектр транспортных процессов, экспрессию многочисленных генов, служит прокариотам для коммуникации и координации, подобно нервной системе животных) [17, 18]. Более того, авторы выдвинули гипотезу, что умеренно кислый pH (например, кишечника хозяина) может также являться активирующим сигналом для системы Cpx *in vivo* и играть важную роль не только в персистенции возбудителя, но и в регуляции факторов вирулентности, включая пили адгезии, секретируемые эффекторы и транспортную систему секреции III типа.

Показана роль данной системы в выведении избытка катионов натрия при щелочном стрессе у некоторых бактерий [19].

Возможно, у возбудителя холеры реализуется аналогичный механизм устойчивости при умеренном кислотном стрессе.

Через 24 ч инкубации в условиях умеренного кислотного стресса часть С16:1 была преобразована в циклопропановые ЖК (сус17:0), количество которых достигало 5–25% от всех ЖК, детектированных в клетке. Молекулярно-динамическое моделирование показало двоякую роль циклопропановых ЖК в физиологии бактериальной клетки: с одной стороны, эти липиды стабилизируют клеточные мембраны в стрессовых условиях, а с другой – регулируют текучесть/проницаемость мембран [20]. У *E. coli* O157:H7 и *Salmonella* Typhimurium циклизация ацильных цепей ЖК в условиях кислотного стресса снижала проницаемость мембраны, препятствуя проникновению протонов в клетку, а также повышала способность экструдировать протоны из цитозоля, помогая бактериям сохранять внутриклеточный гомеостаз pH [21]. Интересно, что для патогенных бактерий также продемонстрирована роль циклопропановых ЖК в реализации вирулентных свойств и устойчивости к противомикробным препаратам [22].

В ответ на сублетальный и умеренный кислотный стресс (pH 4,0 и 6,0) у штаммов *V. cholerae* O1 №№ 13603, P-20000, 18332 и nonO1/nonO139 №P-20453 детектирован синтез

4-аминобутановой кислоты (ГАМК) на 5-й минуте от начала анализа. ГАМК представляет собой четырехуглеродную небелковую аминокислоту, которая обладает широким спектром физиологической активности и синтезируется в клетках растений, грибов, бактерий и эукариотов. ГАМК образуется из глутамата при участии фермента глутаматдекарбоксилазы (ГДК). У микроорганизмов ГАМК функционально участвует в прорастании спор, а также обуславливает устойчивость к экологическим стрессам [23]. Система ГДК обнаружена и у холерного вибриона. Существуют данные, что ГАМК наряду с другими продуцируемыми прокариотами низкомолекулярными веществами (ацетилхолином, серотином, норадреналином, гистамином и другими аминами, летучими ЖК) осуществляют взаимодействие с организмом хозяина. Секретируемые бактериями нейротрансмиттеры могут непосредственно воздействовать на нервные окончания в желудочно-кишечном тракте, а также стимулировать эпителиальные клетки кишечника, которые в ответ высвобождают молекулы, модулирующие нейротрансдукцию по энтеральной нервной системе, оказывая влияние на ось «кишечник–мозг» [24, 25]. У штаммов №№ P-20000, 18332 и P-20453 ГАМК продуцировалась и в условиях щелочного стресса. Помимо ГАМК, у штаммов O1 серогруппы №№ 13603, 18332 и P-20000 при pH 4,0 отмечено накопление фумаровой и азелаиновой кислот, которые известны своими антиоксидантными свойствами.

Влияние щелочного стресса на спектр жирных кислот штаммов *V. cholerae*

Ощелачивание среды также является стрессом для бактерий, о чем свидетельствует активация системы SOS и индукция генов теплового шока в ответ на высокие значения pH среды [26]. Экстремально высокие значения pH среды могут приводить к омылению мембранных липидов и дестабилизации белковых молекул, что, в свою очередь, приводит к растяжению мембраны и ее разрушению.

Повышение pH среды до 9,0–11,5 активировало несколько защитных механизмов в клетках возбудителя холеры: процесс *cis/trans*-изомеризации ННЖК (С16:1, С18:1 и С18:2), синтез разветвленных (а15:0, а17:0) и циклопропановых ЖК (сус17:0, сус19:0). У штаммов №№ P-20000 и 18332 биовара El Tor отмечено увеличение синтеза длинноцепочечных ЖК (С22:1Δ13). Инкубация в условиях щелочного стресса приводила к образованию жирных спиртов: додеканола (через 2 ч инкубации), тетрадеканола (через 24 ч инкубации). У штамма nonO1/nonO139 №P-20453, помимо тетрадеканола, детектировали появление тетрадеценанола, пентадеценанола, пентадекананола. У штаммов O1 серогруппы, помимо жирных спиртов, отмечено увеличение многоатомных спиртов (диолов). Показана роль диолов в обезвреживании гидроксил-радикалов, образующихся в процессе перекисного окисления липидов, который часто сопровождает pH-стресс [27]. У всех штаммов, взятых в исследование, отмечено увеличение гидроксиЖК до 3% при pH 9,0 и до 6% при pH 11,5. Помимо гидроксидодекановой, гидрокситетрадекановой кислот, входящих в состав липополисахарида холерного вибриона, детектирован синтез *iso/anteiso*-гидрокситридекановой кислот, не встречающихся при стандартных условиях культивирования. Через 2 ч инкубации у

всех штаммов при щелочных значениях pH выявлено образование β -гидроксibuтирата. У бактерий β -гидроксibuтират служит субстратом для синтеза полигидроксibuтирата, а также участвует в антиоксидантной защите в ответ на экологические стрессы. Штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы продуцировали гидроксibuтират и в условиях ацетатного стресса (рис. 3).

Под влиянием щелочного стресса отмечено появление нового класса соединений – амидов ННЖК (олеамид, эрукамид), составляющих до 2–3% от всех детектированных соединений. Амиды ЖК синтезируются в реакциях, катализируемых синтазой жирных кислот II типа, путем амидирования длинноцепочечных НЖК и ННЖК. Известно, что они могут проявлять цитотоксический эффект в отношении посторонней микрофлоры, играть роль в межвидовых взаимоотношениях, осуществлять регуляторную функцию [28].

У штаммов *V. cholerae* №№ 17682 и 16064 O139 серогруппы при pH 9,0 отмечено накопление холестерина, составляющего >30% от всех детектированных в клетке соединений, вероятно, поглощенного и аккумулированного из питательной среды. Патогены человека, включая холерные вибрионы, обладают уникальной способностью ассимилировать и утилизировать экзогенные липиды, в т.ч. липиды хозяина (жирные кислоты и холестерин). Экзогенные липиды являются важными источниками углерода для бактериальных патогенов, которые задействуют их в центральных метаболических путях, способствующих персистенции в организме хозяина и опосредуя патогенез [29].

Помимо ремоделирования ЖК состава липидов под действием щелочного стресса, штаммы возбудителя холеры синтезировали и другие соединения: сахара (α -глюкопиранозид), некоторые вторичные метаболиты, для которых описаны биологически активные свойства (в коммуникации, защите): терпены (гераниол, изоборнеол, борнеол), бензофураны (бензофурануксусная кислота).

Заключение

Получены новые данные о закономерностях изменения ЖК состава липидов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп разной эпидемической значимости в условиях кислотного/щелочного стрессов. Показано, что краткосрочная инкубация при кислых значениях pH среды вызывала у штаммов *V. cholerae* разные реакции: клинические штаммы реагировали синтезом стерических изомеров ННЖК, тогда как штаммы, выделенные из воды, – синтезом прямых и разветвленных НЖК. Изменения состава ЖК в ответ на длительный умеренный кислотный и щелочной стрессы у штаммов *V. cholerae* независимо от набора детерминант патогенности и источника выделения носили аналогичный характер. Добавление кислоты/щелочи в питательную среду, помимо модификации липидома, стимулировало накопление в клетках специфических веществ, возможно, играющих протективную роль.

Изменения в ЖК-профилях и метаболоме клетки в ответ на изменения pH среды могут увеличивать адаптационный/персистентный потенциал холерного вибриона, способствуя сохранению возбудителя в объектах окружающей среды и в организме хозяина.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Funding information

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Cohen ML, Mashanova EV, Jagannathan SV, Soto W. Adaptation to pH stress by *Vibrio fischeri* can affect its symbiosis with the Hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*). *Microbiology (Reading)*. 2020 Mar;166(3):262-277. DOI: 10.1099/mic.0.000884
2. Angelichio MJ, Merrell DS, Camilli A. Spatiotemporal analysis of acid adaptation-mediated *Vibrio cholerae* hyperinfectivity. *Infect Immun*. 2004 Apr 1;72(4):2405-07. DOI: 10.1128/IAI.72.4.2405-2407.2004
3. Pradhan A, Ma Q, de Assis LJ, Leaves I, Larcombe DE, Rodriguez Rondon AV, et al. Anticipatory Stress Responses and Immune Evasion in Fungal Pathogens. *Trends Microbiol*. 2021 May;29(5):416-427. DOI: 10.1016/j.tim.2020.09.010
4. Mueller EA, Egan AJ, Breukink E, Vollmer W, Levin PA. Plasticity of *Escherichia coli* cell wall metabolism promotes fitness and antibiotic resistance across environmental conditions. *Elife*. 2019 Apr 9;8:e40754. DOI: 10.7554/eLife.40754
5. Lund PA, De Biase D, Liran O, Scheler O, Mira NP, Cetecioglu Z, et al. Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Front Microbiol*. 2020 Sep 24;11:556140. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556140
6. Fozo EM, Quivey RJ. Shifts in the Membrane Fatty Acid Profile of *Streptococcus mutans* Enhance Survival in Acidic Environments. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Feb;70(2):929-36. DOI: 10.1128/AEM.70.2.929-936.2004
7. Giotis ES, McDowell DA, Blair IS, Wilkinson BJ. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Feb;73(3):997-1001. DOI: 10.1128/AEM.00865-06
8. Li Z, Jiang B, Zhang X, Yang Y, Hardwidge PR, Ren W, et al. The role of bacterial cell envelope structures in acid stress resistance in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Apr;104(7):2911-2921. DOI: 10.1007/s00253-020-10453-x
9. Mitchell SL, Kearns DB, Carlson EE. Penicillin-binding protein redundancy in *Bacillus subtilis* enables growth alkaline shock. *Appl Environ Microbiol*. 2023 Jan 24;90(1):e0054823. DOI: 10.1128/aem.00548-23
10. Шипко ЕС, Дуванова ОВ. Влияние температурного стресса на спектр жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*. Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2022;2:143-54. / Shipko ES, Duvanova OV. Influence of temperature stress on the spectrum of fatty acids of *Vibrio cholerae* strains. *Bulletin of Perm University. Biology*. 2022;2:143-54. DOI: 10.17072/1994-9952-2022-2-143-154 (In Russian).
11. Shohlenkamp C. Membrane Homeostasis in Bacteria upon pH Challenge In: Geiger O (eds). *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. 2019 Jan 9. DOI: 10.1007/978-3-319-50430-8_57
12. Willdigg JR, Helmann D. Mini Review: Bacterial Membrane Composition and Its Modulation in Response to Stress. *Front Mol Biosci*. 2021 May 11;8:634438. DOI: 10.3389/fmolb.2021.634438
13. Heuston S, Begley M, Gahan CGM, Hill C. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology (Reading)*. 2012 Jun;158(Pt 6):1389-1401. DOI: 10.1099/mic.0.051599-0

14. Bushell FML, Tonner PD, Jabbari S, Schmid AK, Lund PA. Synergistic Impacts of Organic Acids and pH on Growth of *Pseudomonas aeruginosa*: A Comparison of Parametric and Bayesian Non-parametric Methods to Model Growth. *Front Microbiol*. 2019 Jan 8;9:3196. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03196
15. Шендеров БА. Мишени и эффекты короткоцепочечных жирных кислот. Современная медицинская наука. 2013;1-2:21-50. / Shenderov BA. Short-chain fatty acids targets and affects. *Sovremennaya meditsinskaya nauka*. 2013;1-2:21-50. (In Russian).
16. Bernal V, Castaño-Cerezo S, Cánovas M. Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Sep 20;100:8985-9001. DOI: 10.1007/s00253-016-7832-x
17. Sun Y. F1F0-ATPase Functions Under Markedly Acidic Conditions in Bacteria. In: Chakraborti S, Dhalla N (eds). *Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases. Advances in Biochemistry in Health and Disease*. 2016 Dec;14. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-24780-9_22
18. Xu Y, Zhao Z, Tong W, Ding Y, Liu B, Shi Y, et al. An acid-tolerance response system protecting exponentially growing *Escherichia coli*. *Nat Commun*. 2020 Mar 20;11(1):1496. DOI: 10.1038/s41467-020-15350-5
19. Kumar S, Tiwari V, Doerrler WT. Cpx-dependent expression of YqjA requires cations at elevated pH. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Jun 7;364(12). DOI: 10.1093/femsle/fnx115
20. Cronan JE, Luk T. Advances in the Structural Biology, Mechanism, and Physiology of Cyclopropane Fatty Acid Modifications of Bacterial Membranes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2022 Jun 15;86(2):e0001322. DOI: 10.1128/mmbr.00013-22
21. Karlinsey JE, Fung AM, Johnston N, Goldfine H, Libby SJ, Fang FC. Cyclopropane Fatty Acids Are Important for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence. *Infect Immun*. 2022 Jan 25;90(1):e0047921. DOI: 10.1128/IAI.00479-21
22. Jiang X, Duan Y, Zhou B, Guo Q, Wang H, Hang X, et al. The Cyclopropane Fatty Acid Synthase Mediates Antibiotic Resistance and Gastric Colonization of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2019 Sep 20;201(20):e00374-19. DOI: 10.1128/JB.00374-19
23. Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. Production of GABA (γ -Aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Braz J Microbiol*. 2012 Jun 1;43(4):1230-1241. DOI: 10.1590/S1517-83822012000400001
24. Тлюстангелова РК, Долинный СВ, Пшеничная НЮ. Роль короткоцепочечных жирных кислот в патогенезе острых кишечных инфекций и постинфекционных синдромов. *PMЖ*. 2019;10:31-35. / Tlyustangelova RK, Dolinny SV, Pshenichnaya NYu. The role of short-chain fatty acids in the pathogenesis of acute intestinal infections and post-infectious syndromes. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2019;10:31-35. (In Russian).
25. Олескин АВ, Сорокина ЕВ, Шиловский ГА. Взаимодействие катехоламинов с микроорганизмами, нейронами и с клетками иммунной системы. Успехи современной биологии. 2021;141(1):3-13. / Oleskin AV, Sorokina EV, Shilovsky GA. Interaction of catecholamines with microorganisms, neurons and with the cells of the immune system. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2021;141(1):3-13. DOI: 10.31857/S004213242101021X (In Russian).
26. Saito H, Kobayashi H. Bacterial responses to alkaline stress. *Sci Prog*. 2003 Feb 27;86(4):271-82. DOI: 10.3184/003685003783238635
27. Husain A, Sato D, Jeelani G, Soga T, Nozaki T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1831. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001831
28. Dembitsky VM. Microbiological Aspects of Unique, Rare, and Unusual Fatty Acids Derived from Natural Amides and Their Pharmacological Profile. *Microbiol. Res*. 2022 May 26;13(3):377-417. DOI: 10.3390/microbiolres13030030
29. Wilburn K, Fieweger R, VanderVen B. Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathogens and Disease*. 2018 Mar 1;76(2):fty021. DOI: 10.1093/femspd/fty021

Информация о соавторах:

Дуванова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Кругликов Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, и. о. начальника отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Olga V. Duvanova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

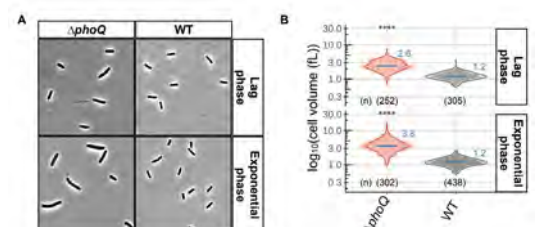
Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Head. Laboratory of Molecular Biology of Natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Vladimir D. Kruglikov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, Acting Head of the Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Небольшие белки *E. coli* открывают новые возможности для понимания бактерий

Бактериальные малые белки регулируют различные клеточные процессы и реакции на стимулы окружающей среды. Авторы идентифицировали малые белки, индуцируемые дефицитом Mg^{2+} в *Escherichia coli*, и исследовали механизмы их индукции, субклеточную локализацию и влияние на рост клеток. Один из них, Yoal, опосредовал взаимодействие между двухкомпонентными сигнальными системами PhoR-PhoB и EnvZ-OmpR, которые контролируют клеточные реакции на дефицит фосфата и осмотический стресс соответственно. Эти результаты расширяют известный репертуар стресс-индуцированных малых белков, регулирующих адаптивную сигнализацию бактерий.



Vellappan S, Sun J, Favate J, Jagadeesan P, Cerda D, Shah P, Yadavalli SS. Analysis of stress-induced small proteins in *Escherichia coli* reveals that Yoal mediates cross-talk between distinct signaling systems. *Sci Signal*. 2025 Aug 26;18(901):eadu7253. DOI: 10.1126/scisignal.adu7253