

## ВИКОРИСТАННЯ МОЛІКУТАМИ НЕВУГЛЕВОДНИХ СУБСТРАТІВ

Досліджено здатність представників родів *Mycoplasma* та *Acholeplasma* засвоювати різні неуглеводні субстрати. Встановлено, що при рості молікутів на середовищі СМ ІМВ-72 з додаванням одного з досліджуваних субстратів, їх можна умовно розподілити у спадному ряду таким чином: гліцерин —> сукцинат натрію —> ацетат натрію —> ацетат калію. Підкреслено відмінність між молікутами та бактеріями при споживанні ними вищезгаданих субстратів.

Молікути є найменшими організмами серед прокаріотів з обмеженими метаболічними можливостями, які нездатні синтезувати самостійно ряд життєво необхідних для їх існування сполук. Це узалежнює їх від присутності в ростовому середовищі специфічних, у тому числі багатих енергією, сполук.

Одним з таких необхідних елементів, які входять до складу цих сполук, є вуглець, що також використовується для синтезу компонентів клітини. За відсутності готових органічних сполук, які можна було б використати для синтезу клітинних компонентів, потреба у вуглеці задовольняється за рахунок глюконеогенезу в процесі синтезу глюкози. Оскільки під час росту цих факультативних анаеробів лактат є ключовим продуктом у двох процесах – гліколізі та глюконеогенезі (заключним етапом гліколізу є перетворення пірувату в лактат, а в глюконеогенезі з лактату або інших неуглеводних субстратів утворюється глюкоза), кількісне його визначення може свідчити про включення того чи іншого субстрату в метаболізм цих мікроорганізмів.

Метою цієї роботи було дослідження здатності окремих молікутів включати у свій метаболізм неуглеводні субстрати.

### Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були 50 штамів молікутів – представників родів *Mycoplasma* та *Acholeplasma* (табл. 1).

При дослідженні здатності молікутів споживати різні неуглеводні джерела було використано гліцерин, сукцинат натрію, ацетати натрію та калію (4 мг/мл). Для порівняння в тій же концентрації використовували глюкозу, яка є необхідним компонентом живильного середовища СМ ІМВ-72 [2]. Молікути вирощували на рідкому живильному середовищі СМ ІМВ-72 в анаеробних умовах при 37 °С протягом 21 доби. Через 21 добу за

наявності росту досліджувані штами перевіряли щодо кількості утвореного лактату. Кількість лактату виражали в градусах Тернера (один градус Тернера відповідає 0,0075 % лактату) [3].

### Результати та їх обговорення

При використанні ацетату калію як субстрату найбільш активно його засвоювала *Acholeplasma modicum* (0,12 %). Менш інтенсивно використовували цей субстрат *Mycoplasma pneumoniae* (0,0675 %), *A. oculi* (0,06 %) та *A. laidlawii* (0,0525 %) (табл. 1). У решти штамів вихід лактату в середньому коливався від 0,045 %, як наприклад у *M. fermentans*, до 0,003 % (*M. hominis*, *M. mycoides*). Найменша кількість утвореного лактату спостерігалась у представників роду *Acholeplasma* – *A. laidlawii* 101 та *A. laidlawii* 208 (по 0,0225 %). При цьому його сумарна кількість дорівнювала 244 %, а середнє значення утвореного лактату становило 4,9 %.

Ацетат натрію найактивніше включали в метаболічні процеси такі молікути, як *A. modicum* (0,1725 %), *M. pneumoniae* (0,0975 %) та *A. laidlawii* (0,0825 %). Поміркованіше використовували цей субстрат *M. capricolum* та *A. axanthum* (по 0,06 %), *A. granularum* та *A. morum* (по 0,0525 %). Залучення фітопатогенними ахолеплазмами до катаболічних та анаболічних процесів ацетату натрію було найпасивнішим порівняно з референтними штамами і вихід лактату у цих ахолеплазм коливався в межах від 0,0225 до 0,03 %. При цьому загальний вихід лактату становив 266 градусів Тернера, а середнє значення утвореного лактату дорівнювало 5,3 градуса Тернера.

У результаті проведених експериментів встановлена також роль сукцитату натрію у метаболічних процесах молікутів. Так, серед представників роду *Mycoplasma* найактивніше його використовували *M. fermentans* (0,12 %), *M. hominis* і *M. mycoides* (по 0,105 %) та *M. capricolum* (0,09 %),

Таблиця І. Засвоєння деякими представниками класу Mollicutes неуглеводних субстратів

Рід, штам	Кількість утвореного молікутами лактату (%) в результаті росту на субстратах:				
	Ацетат калію	Ацетат натрію	Сукцинат натрію	Гліцерин	Глюкоза
Рід: <i>Mycoplasma</i>					
M. pneumonia	0,0675	0,0975	0,075	0,075	0,27
M. capricolum	0,0375	0,06	0,09	0,06	0,27
M. hominis	0,003	0,0375	0,105	0,075	0,225
M. mycoides	0,003	0,0375	0,105	0,09	0,182
M. fermentans	0,045	0,045	0,12	0,075	0,2475
M. salivarium	0,0375	0,045	0,06	0,0825	0,165
Рід: <i>Acholeplasma</i>					
A. hippikon	0,0375	0,0375	0,105	0,075	0,204
A. granularum	0,0375	0,0525	0,0675	0,075	0,1275
A. modicum	0,12	0,1725	0,015	0,015	0,24
A. oculi	0,06	0,045	0,045	0,0825	0,2025
A. morum	0,0375	0,0525	0,06	0,075	0,225
A. axanthum	0,0375	0,06	0,09	0,1125	0,2625
A. laidlawii	0,0525	0,0825	0,075	0,06	0,1875
4 <sup>a</sup>	0,003	0,03	0,0825	0,06	0,1875
5 <sup>a</sup>	0,045	0,03	0,0675	0,105	0,24
21	Не виявлено	0,045	0,0975	0,075	0,2625
51	0,003	0,03	0,075	0,0675	0,2625
52	0,0375	0,0375	0,045	0,075	0,2325
57	0,045	0,0225	0,075	0,09	0,2325
63	0,0375	0,0375	0,0975	0,1125	0,24
65	0,0375	0,0375	0,105	0,105	0,182
66	0,0375	0,03	0,675	0,105	0,1875
78	0,003	0,0225	0,09	0,1125	0,182
79	0,045	0,0375	0,075	0,09	0,182
80	0,0075	Не виявлено	0,0825	0,1125	Не виявлено
83	0,0375	0,045	0,015	0,015	0,1875
84	0,0375	0,0375	0,075	0,06	0,21
85	0,045	0,03	0,675	0,075	0,1875
118	0,06	0,045	0,0525	0,09	0,2475
119	0,0375	0,03	0,0525	0,075	0,225
137	0,03	0,0375	0,075	0,075	0,21
144	0,03	0,0225	0,675	0,075	0,182
146	0,0375	0,0375	0,09	0,09	0,21
148	0,045	0,0225	0,075	0,105	0,24
35	0,03	0,0375	0,09	0,09	0,2475
36	0,03	0,0225	0,09	0,105	0,27
96	0,0375	0,03	0,075	0,06	0,24
97	0,0375	0,03	0,675	0,09	0,1875
98	0,0375	0,0225	0,0825	0,09	0,225
99	0,03	0,03	0,0825	0,105	0,21
101	0,0225	0,0375	0,0825	0,1125	0,21
102	0,0375	0,03	0,075	0,105	0,225
178	0,0375	0,03	0,045	0,09	0,2025
195	0,03	0,0375	0,09	0,075	0,21
208	0,0225	0,03	0,045	0,9075	0,1875
210	0,0375	0,045	0,0525	0,0675	0,2025
273	0,0375	0,03	0,06	0,9075	0,21
275	0,0375	0,03	0,0525	0,09	0,21
192	0,03	0,0525	0,0525	0,0675	0,1875
100	0,0075	0,0075	0,015	0,075	0,0075

а роду *Acholeplasma* – *A. hippikon* (0, 105 %) та *A. axanthum* (0,09 %). Набагато активнішим порівняно з раніше описаними субстратами було відзначено споживання сукцинату натрію й штамами фітопатогенних ахолеплазм. До них належать такі штами роду *Acholeplasma*, як *A. laidlawii* 65 (0,105 %), 63 та 21 (по 0,0975 %), а також *A. laidlawii* 35, 36, 78, 146 та 195, в яких були однаково високі показники виходу лактату, що становили 0,09 % у кожного з них.

Результати порівняльного аналізу здатності МОлікутів засвоювати неуглеводні субстрати виявилися цікавими і досить несподіваними. Так, встановлено, що при використанні ацетату натрію та ацетату калію як субстратів молікути віддають перевагу ацетату натрію (5,3 %), а не ацетату калію (4,9 %). При засвоєнні сукцинату натрію середнє значення виходу лактату у всіх досліджуваних штамів виявилось майже вдвічі більшим (9,6 %) порівняно з відповідними значеннями при засвоєнні ацетату натрію (5,3 %) та ацетату калію (4,9 %).

У дослідях було також встановлено, що серед референтних штамів молікутів активно засвоювали гліцерин *A. axanthum* (0,1125 %), *M. mycoides* (0,09 %), *M. salivarium* TAA. *oculi* (по 0,0825 %). Значно активніше порівняно з іншими неуглеводними джерелами використовувати цей субстрат і фітопатогенні штами роду *Acholeplasma*. Так, найбільшу кількість накопиченого лактату виявили у таких штамів роду *Acholeplasma*, як 63, 78, 101, 80 (по 0,1125 %), а також у штамів 65, 66, 36, 5<sup>a</sup>, 148, 99 та 102 (по 0,105 %).

Слід відзначити, що засвоєння гліцерину як референтними штамами родів *Mycoplasma* та *Acholeplasma* (9,76 %), так і фітопатогенними штамами роду *Acholeplasma* (*A. laidlawii* 10, *A. laidlawii* 89) було майже однаково активне. При цьому середні значення виходу лактату (10,7 %) вдвічі перевищують відповідні значення для ацетату натрію (5,3 %) та ацетату калію (4,9 %), а також трохи перевищують ці значення для сукцинату натрію (9,6 %). Отже, гліцерин споживався молікутами найкраще. Решту досліджених субстратів можна умовно розподілити у спадному ряду таким чином: гліцерин –> сукцинат натрію –> ацетат натрію –> ацетат калію.

Встановлено, що глюкозу дуже інтенсивно використовували для своїх метаболічних потреб усі безвинятку молікути. Середнє значення кількості утвореного лактату для кожного з досліджуваних штамів становило 27,76 %.

З досліджуваних субстратів найгірше засвоювалися молікутами ацетат натрію та калію. Таку низьку їх потребу в ацетаті можна пояснити здатністю синтезувати ці сполуки самостійно

або отримувати їх шляхом розщеплення більш складних сполук (наприклад глюкози). Слід відзначити, що в ахолеплазм ацетату синтезується майже вдвічі більше, ніж у мікоплазм, про що свідчить менша кількість утвореного ними лактату. Якщо поповнення ацетату відбувається внаслідок розщеплення глюкози, то кількість утвореного лактату також зменшується за рахунок більш інтенсивного використання молікутами глюкози. Це свідчить також і про більшу залежність ахолеплазм від наявності глюкози в живильному середовищі, що підтверджено нашими експериментальними даними. Важливе значення гліколізу для ахолеплазм як енергетичного джерела було доведено Дж. Кастріжон-Дієзом і Т. Фішером [4]. Одержані нами дані про низьку потребу молікутів в ацетаті не зовсім узгоджуються з гіпотезою П. Сміта [6], відповідно до якої такі компоненти мембран цих мікроорганізмів, як каротиноїди і холестерол, крім своєї структурної функції, також є переносниками глюкози та ацетату крізь їх мембрани. Але тоді кількість засвоєного ацетату молікутами мала б бути значно вищою, однак ми це не спостерігали. Ймовірно, що ця гіпотеза справедлива лише щодо глюкози.

Розглянемо більш детально почерговість можливого включення субстратів у цикли гліколізу (шлях Ембдена – Мейєргофа – Парнаса) та глюконеогенезу у молікутів. Так, ацетат і сукцинат можуть залучатися лише в ході гліколізу, причому ацетат залучається у цикл раніше сукцинату. Гліцерин же через ряд реакцій перетворюється на гліцеральдегід фосфат. У гліколізі це четверта реакція, а в глюконеогенезі – шоста, тобто залучення гліцерину до гліколізу відбувається дещо раніше, ніж при глюконеогенезі, але необхідний він в обох процесах. Тому й потреба у цьому субстраті буде значно більшою, що і підтверджується одержаними нами результатами.

Отже, при рості молікутів на середовищах з різними субстратами у разі гліколізу спочатку буде метаболізуватися глюкоза, яка в результаті розкладається на більш прості сполуки. Потім у катаболічні процеси клітини включиться гліцерин і лише після цього – неуглеводні субстрати (сукцинат натрію, ацетати натрію та калію), які будуть задіяні до початку анаболічних процесів. Таким чином, проаналізувавши одержані нами результати та розглянувши почерговість можливого включення субстратів у метаболічні процеси молікутів, всі процеси, що при цьому відбуваються, можна пояснити так:

- по-перше, процес гліколізу взагалі починається з включення глюкози та гліцерину (шлях Ембдена – Мейєргофа – Парнаса); за

глюкозою через кілька послідовних реакцій включається і гліцерин, який у результаті низки реакцій перетворюється на піруват, з якого в анаеробних умовах утворюються дві молекули лактату, тоді як такі субстрати, як ацетат і сукцинат включаються пізніше, вже після утворення лактату, за яким фіксується вихід цього кінцевого продукту гідролізу і визначається міра його включення у цей процес; по-друге, необхідно враховувати, що ацетат і сукцинат включаються в метаболізм на різних етапах циклу декарбоксилювання, окремі продукти якого (за умови достатнього енергозабезпечення клітин) включаються в біосинтетичні шляхи, зокрема - в глюко-неогенез. Таким чином, досліджувані субстрати - ацетат і сукцинат - використовуються молекулами у процесі росту для синтезу своїх структурних елементів, внаслідок чого менша частина засвоєного вуглецю виділяється у вигляді лактату, тоді як такий субстрат, як гліцерин включається безпосередньо у процес гліколізу, кінцевим накопичувальним продуктом якого є лактат. І, відповідно, кількість його буде значно більшою порівняно з утвореним лактатом внаслідок використання цими мікроорганізмами ацетату та сукцинату;

- по-третє, процес гідролізу відбувається в анаеробних умовах, тобто лише до утворення лактату, чим можна пояснити затримку та залучення у біохімічні перетворення таких субстратів, як ацетат та сукцинат. За такий умов потреба у цих субстратах зменшується, порівняно з глюкозою та гліцерином, ще збігається з одержаними нами результатами.

І насамкінець, порівнюючи дані щодо здатності молюкутів і бактерій, які вважаються філогенетичними предками мікоплазм та ахолеплазм, використовувати вищезгадані субстрати слід відзначити розбіжності між цими двома групами мікроорганізмів у засвоєнні ними ацетату та сукцинату. Раніше була встановлена здатність *Bacillus subtilis* та *fdp* -мутанта рости на таких неуглеводних джерелах, як гліцерол та малат, причому приблизно такою ж швидкістю, як і на гліколітичних джерелах вуглецевого живлення [5]. Відомої також [1], що всі 110 досліджених штамів *Bacillus subtilis* засвоюють сукцинат, але жоден із них не засвоює ацетат. Вірогідно, це пояснюється певними фізіологічними особливостями цієї групи мікроорганізмів. Але цей один факт, звичайно, не може свідчити про відсутність між цими двома групами мікроорганізмів філогенетичних зв'язків.

1. Осадчая А. И., Кудрявцев В. А., Сафронова Л. А., Козачко И. А., Смирнов В. В. Стимуляция роста и спорообразования *Bacillus subtilis* с оптимизацией углеводного питания при глубинном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. - 1997 - Т. 33 - № 3. - С. 321-324.
2. Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П. Среда СМ ИМВ - 72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. - 1984 - Т. 46 - № 2. - С. 71-75.
3. Barker S. B., Summerson W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological materials // J. Biol. Chem. - 1941. - Т. 38. - № 2. - P. 535-554.
4. Castrejon-Diez J., Fisher T. N., Fisher E. Glucose metabolism of two strains of *Mycoplasma laidlawii* II J. Bacteriol. - 1963. - Т. 86. - P. 627-636.
5. FuJua Y., Freese E. Isolation and properties of a *Bacillus subtilis* mutant unable to produce fructose-bisphosphatase // J. Bacteriol. - 1981. - Т. 145. - № 2. - P. 760-767.
6. Smith P. F. The role of sterols in the growth and physiology of pleuropneumonia-like organisms / Ed. by N. E. Gibbons. Recent progress in microbiology, VIII. - Toronto: Univ. of Toronto Press, 1963. - P. 518-525.

/ . Tokovenko, L. Malinovskaya

## INVESTIGATION OF THE NONCARBOHYDRATE SUBSTRATES ASSIMILATION BY THE MOLLICUTES

*An ability of Mycoplasma and Acholeplasma genuses to assimilate different noncarbohydrate substrates had been investigated. Cultivation of the mollicutes on the SMIMV-72 medium with the addition of the one of the tested substrates allowed to arrange the substrates in the following descending order: glycerin —> sodium succinate -> —> sodium acetate ---> potassium acetate. Sodium acetate, potassium acetate and sodium succinate affinities were shown to be different between mollicutes and bacteria.*