

## ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДНОГО СТРЕССА НА УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИЙ РОДА BEGGIATOА

© 2001 г. И.Ю. Степанова, Н.В. Парфенова, М. Зузу, М.И. Фалалеева, А.Т. Епринцев

*Воронежский государственный университет*

Было показано, что активность МДГ из *Beggiatoa alba*, культивируемых в аэробных условиях, повышается в 2,2 раза по сравнению с активностью МДГ из этих бактерий, культивируемых в оптимальных микроаэробных условиях. С помощью электрофореза установлено появление дополнительной изоформы у *Beggiatoa alba*, возникновение которой, вероятно, связано с интенсификацией работы глиоксилатного цикла. Так, установлено, что активности ключевых ферментов этого цикла (изоцитратлиазы и малатсинтазы) также возрастают. Возможно, это связано с синтезом дополнительных полисахаридных слоев, которые защищают *Beggiatoa alba* от кислородного стресса. У *Beggiatoa leptomitiformis*, обладающих более мобильным типом метаболизма, не происходит возрастания активности ферментов и синтез дополнительной изоформы.

Исследованию биохимических механизмов адаптации к меняющимся условиям окружающей среды уделяется большое внимание. Ранее было показано, что в поддержании гомеостаза у растений и животных важная роль принадлежит ферментным системам и, в частности, малатдегидрогеназному комплексу. Для кукурузы, пшеницы, ячменя, подвергшихся засолению, термическому стрессу установлен синтез новых изоферментов МДГ /1/. Кроме того, пищевая депривация приводит к появлению дополнительной изоформы МДГ в гепатоцитах крыс /2/.

В связи с этим определенным интерес представляет изучение адаптивной реакции на стресс у микроорганизмов, отличающихся несравнимо большей гибкостью метаболизма. Поэтому, ферментные регуляторные механизмы у микробов играют более важную роль и проявляются более отчетливо, чем у других живых существ. Так, например, для бесцветных серобактерий рода *Beggiatoa* губительны большие концентрации кислорода, т.к. это ведет к накоплению перекиси в периплазме /3,4/ из-за отсутствия каталазы. Однако, эти микроорганизмы отличаются по основному типу питания, в частности, способностью использовать неодинаковые доноры электронов. Следовательно, не исключается возможность различной ответной реакции данных организмов на кислородный стресс.

Поэтому целью нашей работы было исследование влияния разных концентраций кислорода при культивировании бактерий рода *Beggiatoa*, являющихся микроаэрофилами.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили нитчатые бесцветные серобактерии *B. alba* штамм DSM 1416 и *B. leptomitiformis* штамм Д-402.

Для культивирования бактерий использовали питательную среду следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$ -0,620;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -0,125;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,030;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -0,500;  $\text{KCl}$ -0,125;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,050;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -2,0; пептон-0,200; лактат-0,200; дистиллированная вода; pH среды-7,6. После стерилизации (1 атм.) к среде добавляли 10% раствор  $\text{NaHCO}_3$ -0,125 г/л. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов –  $1,0 \cdot 10^{-3}$  (г/л) /5/. Суспензию клеток получали путем центрифугирования культур при 8000 г в течение 20 мин. Клетки отмывали 0,05 М трис-НСI-буфером (pH 8,0).

Клеточные экстракты (гомогенат) получали разрушением бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин в ледяной бане. Супернатант получали после центрифугирования клеточных экстрактов при 3000 г в течение 5 мин при 4°C.

Создание микроаэробных условий в среде культивирования. Микроаэробные условия создавали путем продувания аргона через горячую среду культивирования во флаконах, которые закрывались специальными резиновыми прокладками с накручивающимися металлическими крышками, а затем вносили 10% воздуха.

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм по изменению оптической плотности, в среде определенного состава /6/.

За единицу активности (ФЕ) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C.

Определение общего белка проводили по методу Лоури.

Сукцинатдегидрогеназу определяли феназинметасульфатным методом при длине волны 600 нм. Активность фумаратгидратазы определяли по увеличе-

нию оптической плотности при 240 нм /7/. Аконитатгидратазу определяли при длине волны 240 нм. Изоцитратлиазу определяли при 324 нм в среде инкубирования: 100 мМ трис-НСl, рН – 7,5; MgCl<sub>2</sub>·6Н<sub>2</sub>O; ЭДТА 0,08 мМ; изоцитрат К 3мМ; ДТТ 5мМ; фенилгидрозин НСl. Активность малатсинтазы измеряли при 412 нм в среде: 100 мМ трис-НСl, рН – 8,1; DTNB 0,2 мМ; ацетил-СоА 0,1 мМ; глиоксилат 1,5 мМ /8/.

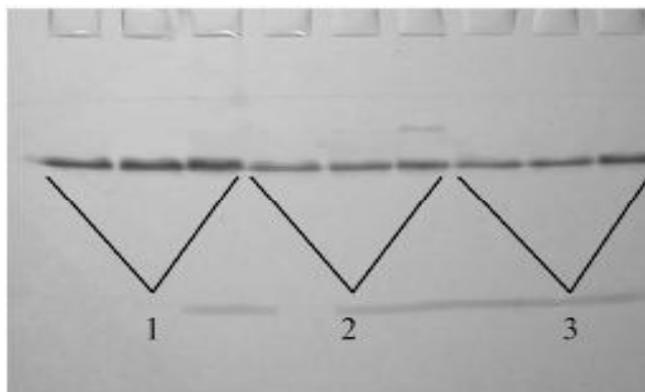
Электрофорез проводили по модифицированной методике Дэвиса /9/. Для специфического проявления МДГ применяли тетразолиевый метод /10/.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе нашего исследования было показано, что активность МДГ из бактерий *V.alba*, выращенных в аэробных условиях, возрастает в 2,2 раза по сравнению с активностью МДГ из этих бактерий, культивируемых в оптимальных микроаэробных условиях. Тогда как возрастание активности малатдегидрогеназы из *V. leptomitiformis*, выращенных при различных концентрациях кислорода, не наблюдалось (табл. 1).

Интересно было установить, с чем связано увеличение активности?

С помощью электрофореза установлено появление дополнительной изоформы у *V.alba* (рис. 1), возникновение которой, вероятно, связано с интенсификацией работы глиоксилатного цикла. Так, нами установлено, что активности ключевых ферментов глиоксилатного цикла из *V.alba*, выращенных в аэробных условиях, возрастают (табл. 2).



**Рис. 1.** Электрофореграмма МДГ на специфическое проявление из бактерий *V.alba* и *V.leptomitiformis*, выращенных в разных условиях: 1. *V.alba* (микроаэробные); 2. *V.alba* (аэробные); 3. *V.leptomitiformis* (аэробные)

Мы предполагаем, что в стрессовых условиях, ускоряется процесс утилизации поли-β-гидроксимасляной кислоты за счет β-окисления и, далее, превращение ацетил-СоА через глиоксилатный цикл с образованием сукцината. Затем сукцинат превращается в отрезке цикла трикарбоновых кислот в оксалоацетат и, далее, через обращенный гликолиз синтезируются полисахариды (рис. 2).

В аэробных условиях возрастание количества полисахаридов, формирующих слизистые слои вокруг клетки, служит защитой от проникновения кислорода внутрь бактериальной клетки, как было показано

Таблица 1

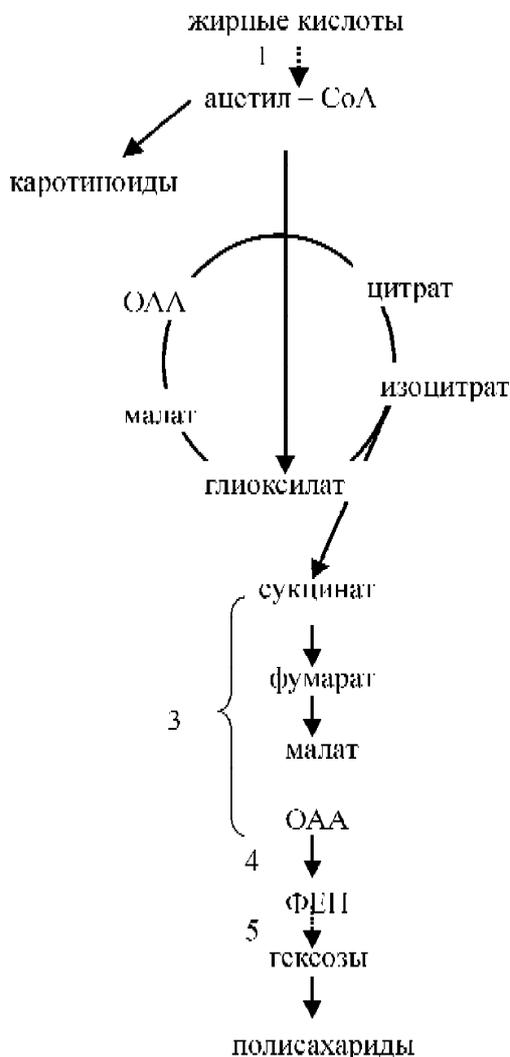
#### Влияние различных концентраций кислорода на активность МДГ из изучаемых объектов

Условия культивирования	Общая активность, ФЕ	Белок, мг/мл	Удельная активность, ФЕ/мг
<i>V.alba</i> (микроаэробные условия)	10,593±0,21	123,5±2,5	0,086±0,002
<i>V.alba</i> (аэробные условия)	13,145±0,26	69,3±1,3	0,189±0,003
<i>V.leptomitiformis</i> (микроаэробные условия)	1,061±0,02	17,4±0,3	0,061±0,001
<i>V.leptomitiformis</i> (аэробные условия)	0,923±0,01	13,1±0,2	0,070±0,0014

Таблица 2

#### Активность некоторых ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла из *V.alba*, культивируемых при различных концентрациях кислорода

Фермент	Микроаэробные условия (мкмоль/л)	Аэробные условия (мкмоль/л)
малатдегидрогеназа	19,81 ± 0,396	43,58 ± 0,801
сукцинатдегидрогеназа	0,10 ± 0,002	0,39 ± 0,007
фумаратгидратаза	0,06 ± 0,0015	1,90 ± 0,038
аконитатгидратаза	1,08 ± 0,002	0,51 ± 0,011
изоцитратлиаза	1,02 ± 0,001	3,11 ± 0,061
малатсинтаза	2,13 ± 0,041	4,14 ± 0,084



**Рис. 2.** Схема синтеза полисахаридов: 1)  $\beta$ -окисление; 2) глиоксилатный цикл; 3) отрезок ЦТК; 4) ФЕП-карбоксикиназа; 5) обращенный гликолиз

для цианобактерий [11] и *Spirillum winogradskii* [12]. И это, возможно, позволяет микроорганизмам *B. alba* адаптироваться к кислородному стрессу.

*B. leptomitiformis* имеют более мобильный тип метаболизма. Эти бактерии могут использовать неорганические доноры электронов, что позволяет им существовать в нижних слоях данного биотопа [13]. И, вероятно, с этим связана более низкая активность МДГ и отсутствие дополнительной изоформы в условиях кислородного стресса.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клетка, как известно, располагает различными системами защиты от повреждающего действия кислорода, предполагающими ферментативную и неферментативную формы [14, 15]. В нашей работе удалось выявить один из путей адаптивной реакции, проявля-

ющийся в синтезе дополнительной изоформы, которая принимает участие в глюконеогенезе. Мы предполагаем, что интенсификация глюконеогенеза обеспечивает возникновение полисахаридных слоев, которые защищают организм от кислородного стресса.

Т. о., полученные результаты показывают, что бесцветные серобактерии *B. alba* и *B. leptomitiformis*, отличающиеся по основному типу метаболизма, имеют разную адаптивную реакцию на кислородный стресс.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пине́йру де Корвалью М.А.А., Землянухин А.А., Епринцев А.Т. Малатдегидрогеназа высших растений.- Воронеж. Изд-во ВГУ 1991 г.- 216 с.
2. Попов В.Н., Волвенкин С.В., Косматых Т.А., Суад А., Шнарренбергер К., Епринцев А.Т. // Биохимия.- 2001. Т.66, вып. 5.- С.617-623.
3. Чеканова Ю.А. Связь процесса окисления восстановленных соединений серы с особенностями функционирования дыхательной цепи *Mastomys bipunctata* и *Beggiatoa leptomitiformis* штамм Д-405: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. М., 1991. 25 с.
4. Кондратьева Е.Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. –М.: Изд-во МГУ, 1983.-172с.
5. Грабович М.Ю., Дубинина Г.А., Чурикова В.В., Чуриков С.Н., Коровина Т.И., Глушков А.Ф. // Микробиология – 1993. Т. 62, вып.3.- С. 430-435.
6. Kitto G.B., Everse J., Murphey W.H., Kaplan N. // Biochemistry. – 1967. Vol. 6, № 2. – P. 15-19.
7. Романова А.К. Биохимические методы автотрофии у микроорганизмов. М. Наука, 1980. 160 с.
8. Грабович М.Ю., Дубинина Г.А., Чурикова В.В., Глушков А.Ф., Чуриков С.Н. // Микробиология – 1993. Т. 62, вып.3.- С. 421-430.
9. Гааль Э., Медьешин Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.:”Мир”. 1982. 446с.
10. Епринцев А.Т., Игамбердиев А.У., Ашнин Л. // Физиология растений. 1996, Т.43, С.36-42.
11. Jorgensen B., Revsbech P. // Applied and Environmental Microbiology.- 1983. Vol.45, № 4.- P. 1261-1270.
12. Подкопаева Д.А., Родионова Е.Ю., Грабович М.Ю., Дубинина Г.А.// Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. Вып. 2.-Воронеж, 2000. 160 с.
13. Грабович М.Ю., Дубинина Г.А., Лебедева В.Ю., Чурикова В.В. // Микробиология – 1998. Т. 67, № 4 .- С. 467-470.
14. Кулинский В.И. // Соросовский образовательный журнал. – 1999, №1.-С. 2-7.
15. Скулачев В.П. // Соросовский образовательный журнал. – 1996, №3.- С. 4-10.