

У БАКТЕРИЙ ТОЖЕ БЫВАЮТ СТРЕССЫ



Г.В. Смирнова,
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН



О.Н. Октябрьский,
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией
физиологии и генетики
микроорганизмов,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН

Представлены данные авторов статьи и их коллег, касающиеся феномена скачка окислительного потенциала (Eh) в растущих культурах бактерий, подвергнутых различным стрессам (температурному и осмотическому шоку, стрессу голода и т.д.). Показано, что скачок Eh связан с выбросом клетками низкомолекулярных тиолов в окружающую среду и может рассматриваться как неспецифический «сигнал тревоги».

В наше время общеизвестны успехи биотехнологии, приносящие многомиллиардные доходы от производства продуктов питания, лекарств, диагностических средств, ферментов и т.д. Одними из биологических объектов, широко используемых в биотехнологии, являются различные микроорганизмы, среди которых, несомненно, наибольшее значение имеет бактерия, называемая кишечной палочкой (*Escherichia coli*, *E. coli*). Эта непатогенная бактерия – один из постоянных обитателей кишечника человека и животных, хорошо изучена в генетическом и физиолого-биохимическом отношении. Многие жизненно важные структуры и функции, общие для всех видов организмов, такие как строение ДНК, белков и биологических мембран, генетический код, регуляция метаболизма на молекулярном и клеточном уровнях, передача генетической информации и синтез белка, были открыты и изучены с использованием кишечной палочки.

Без всякого преувеличения можно сказать, что ни один живой организм не изучен так глубоко и детально, как кишечная палочка. Именно данное обстоя-

тельство позволило в последние десятилетия широко использовать эти бактерии в самых различных биотехнологиях, что является ярким примером важности фундаментальных исследований для технического прогресса.

Одно из первых направлений научных исследований, проводимых нашей исследовательской группой, было связано с физиологией высокоурожайных (или сверхплотных) культур *E. coli*. В биотехнологии получение таких культур часто является важным этапом в производстве биологически активных соединений. Во многих случаях чем выше концентрация бактериальных клеток в биореакторе (плотность культуры), тем большее количество продукта может быть получено в процессе биосинтеза. Однако не всегда удается получить бактериальные культуры высокой плотности, клетки перестают размножаться уже при низких концентрациях биомассы, несмотря на избыток питательных веществ. Отчасти проблема решается чисто техническими приемами.

Современные биореакторы (ферментеры) представляют собой аппараты, в которых под управлением ЭВМ поддержи-

ваются на оптимальном уровне такие параметры, как температура, массообмен, интенсивная аэрация, pH и т.д. Однако и в этих условиях не всегда удается достичь сверхплотных культур. Было показано, что накопление большого количества собственных метаболитов до токсического уровня может быть одной из основных причин ингибирования роста бактерий в ферментере. Используя газожидкостную хроматографию и современные методы культивирования микроорганизмов, сотрудники нашей исследовательской группы показали, что у кишечной палочки одним из главных факторов, ограничивающих получение сверхплотных культур *E. coli*, растущих на глюкозо-солевой среде, является накопление ацетата, как одного из конечных продуктов утилизации глюкозы (рис. 1). Аккумулируясь в цитоплазме клеток, ацетат может нарушать ионный и pH гомеостаз, ингибируя био-

тах наших работ и исследований других ученых, зарубежными коллегами были получены мутантные бактерии, в которых метаболизм глюкозы не приводит к накоплению высоких уровней ацетата, и это позволяет получать высокоурожайные культуры с меньшими затратами вещества и энергии.

При работе с высокоурожайными культурами нами было обнаружено одно интересное явление. Исходя из сущности таких культур понятно, что для получения больших концентраций биомассы в среду необходимо добавлять большие количества питательных субстратов, в частности глюкозы, которая является одновременно источником углерода для биосинтетических процессов и энергетическим ресурсом. Однако добавлять всю глюкозу в один прием нельзя, поскольку это вызовет резкое повышение осмотического давления, стресс и, как следствие,

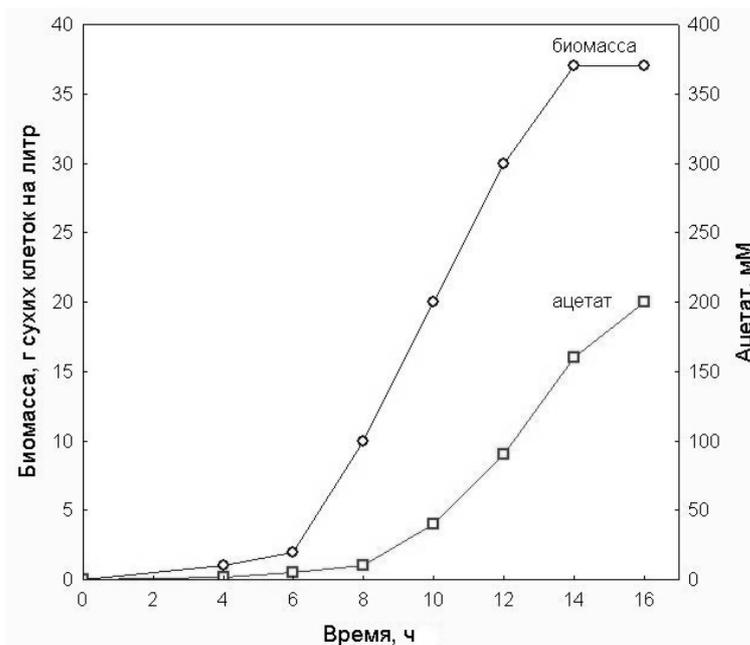


Рис. 1. Рост бактерий *E. coli* в высокоурожайной культуре сопровождается накоплением больших количеств ацетата, образующегося при метаболизме глюкозы. На оси абсцисс показана продолжительность культивирования бактерий, на оси ординат слева – накопление биомассы, справа – аккумуляция ацетата в среде

энергетические и биосинтетические процессы. Наши исследования, касающиеся роли ацетата в физиологии высокоурожайных культур, получили признание коллег в России и за рубежом. Следует отметить, что, основываясь на результа-

ингибирование роста культуры. Исходя из этого глюкоза добавляется в среду культивирования дробно, небольшими порциями, каждая из которых обеспечивает рост бактерий в течение небольшого периода времени и, в то же время, не вы-

зывает существенного изменения осмолярности среды. Причем каждый раз, когда бактерии останавливали свой рост вследствие истощения глюкозы (ситуация, называемая «стрессом голода»), регистрировался характерный скачок редокс-потенциала (Eh) культуры в область отрицательных значений (рис. 2). Амплитуда скачка варьировалась от 40 до 140 мВ. Продолжительность фазы паде-

(измерительного) и хлорсеребряного (вспомогательного). Значение потенциала, регистрируемого такой системой, определяется взаимодействием платинового электрода с редокс-активными веществами в культуре, способными отдавать или принимать электроны. Это могут быть химические компоненты питательной среды, клеточные метаболиты, выделяемые бактериями в среду, а также кисло-

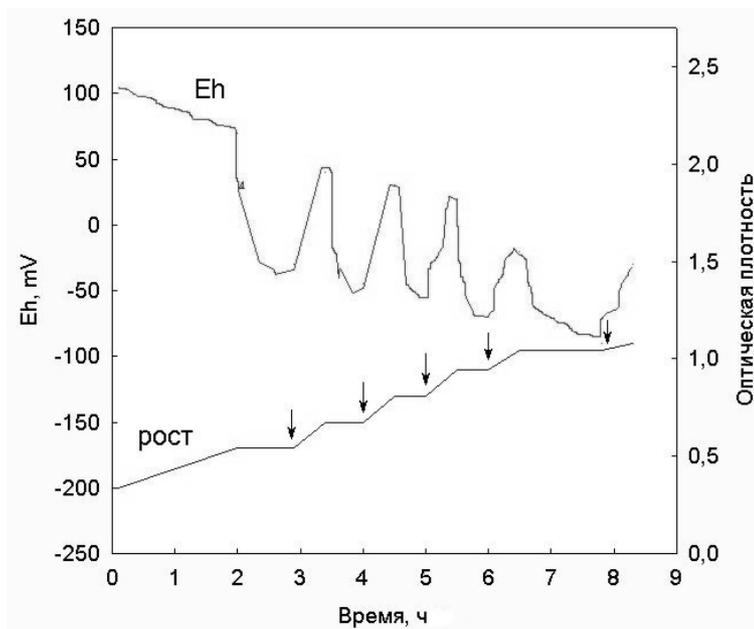


Рис. 2. Скачки редокс-потенциала (Eh) в культурах *E. Coli* с дробным добавлением глюкозы. Каждый раз, когда бактерии «съедали» глюкозу, рост бактерий прекращался и одновременно наблюдался скачок Eh. Стрелки показывают моменты добавления глюкозы

ния зависела от штамма бактерий и составляла от 10 до 12 мин, а фазы повышения — от 40 до 150 мин. Если на любой фазе скачка в культуру добавляли порцию глюкозы, то рост клеток возобновлялся, а значение Eh быстро возвращалось к базовому значению.

Скачок наблюдался на средах, в состав которых входили только минеральные компоненты и глюкоза. Добавление в среду аминокислот и пептидов устраняло скачок Eh. Специальные опыты показали, что в генерации скачка принимают участие как поверхность клеток, так и редокс-активные вещества в среде. Изменение свойств поверхности клеток существенно влияло на параметры скачка.

В наших условиях Eh измерялся и регистрировался непрерывно с помощью пары электродов: гладкого платинового

род и другие газы. Свой вклад в значение Eh могут вносить и сами бактериальные клетки, поверхность которых может обладать редокс-активностью. Следует отметить, что в такой сложной системе, как культура микроорганизмов (среда + клетки), значение Eh культуры не может быть выведено из значений редокс-потенциалов отдельных компонентов, поскольку при их взаимодействии с электродом возможна аддитивность, конкуренция и т.д. Например, в аэрированных (аэробных) культурах, несмотря на наличие в среде высоких концентраций редуцтантов, Eh, как правило, имеет высокое положительное значение (до +0,8 мВ), определяемое концентрацией растворенного кислорода. По мере истощения кислорода бактериями в процессе дыхания значение Eh падает в область отрицательных значений.

Почему мы обратили внимание на скачок потенциала и занялись его изучением? Исходя из того, что было известно ранее об изменениях Eh в культурах микроорганизмов, в наших условиях при остановке роста следовало ожидать не падения редокс-потенциала, а его повышения, поскольку остановка роста сопровождалась быстрым снижением дыхательной активности клеток и, как следствие, повышением содержания кислорода в среде. Как отмечено выше, это должно было приводить к повышению Eh, а не к снижению, как это наблюдалось в нашей ситуации. Следовательно, в момент остановки роста в культуре появлялся новый фактор, конкурирующий с кислородом при взаимодействии с платиновым электродом.

Проведенные затем детальные исследования, расширившие круг ситуаций, в которых бактерии генерируют характерные изменения Eh, показали, что скачки редокс-потенциала наблюдаются в культурах грамположительных и грамотрицательных бактерий при самых различных стрессах: температурном и осмотическом шоке (рис. 3), при действии антибиотиков (рис. 4) и т.д. Особый интерес представляло поведение Eh в смешанных культурах, когда кишечная палочка культивиру-

валась вместе с бактерией *Serratia marcescens* (чудесная палочка). *S. marcescens*, как и *E. coli*, при росте в чистой культуре генерирует скачок редокс-потенциала при стрессе голода. Однако при совместном культивировании этих бактерий при каждой остановке роста, связанной с исчерпанием глюкозы, происходило не понижение Eh, как в чистых культурах, а повышение. Это явление, которое мы условно назвали инверсией скачка Eh, наблюдалось даже в том случае, когда доля клеток *S. marcescens* составляла менее 1 %.

На основе обнаруженного явления нами был предложен способ раннего обнаружения загрязнения производственных культур. Попутно следует отметить существенную разницу в поведении бактерий, культивируемых отдельно и в смешанных культурах. Большая часть данных о физиолого-биохимических свойствах бактерий получена в опытах с чистыми культурами, однако в естественной среде обитания микроорганизмы, как правило, живут в многокомпонентных сообществах, проявляя самые различные типы взаимодействия: конкуренцию, симбиоз и т.д. В настоящее время изучение жизнедеятельности сообществ микроорганизмов – бурно развивающаяся область биологии.

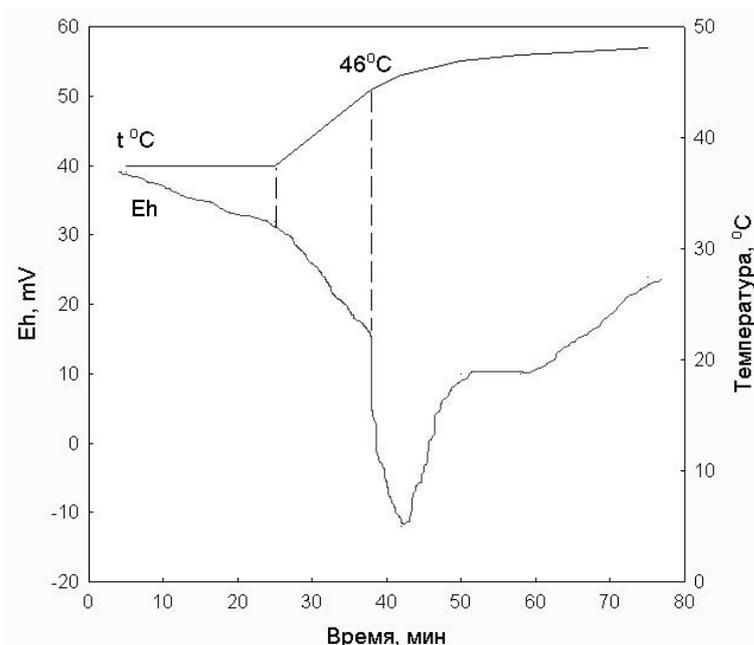


Рис. 3. Скачок Eh при тепловом шоке бактерий *E. coli*. Оптимальная температура роста для этой бактерии около 37°C. Если быстро повышать температуру, то при достижении 46°C рост бактерий резко замедляется и наблюдается скачок Eh

По существу, скачок Eh можно рассматривать как сигнал тревоги, свидетельствующий о возникновении критической для жизнедеятельности клеток ситуации. Мы подробно исследовали кинетику процесса и его зависимость от пара-

ческого действия. Можно предположить, что в критические моменты для клеток, когда вследствие стресса ингибируются конструктивные и энергетические реакции, необходимые не только для роста и развития, но и детоксикации токсических

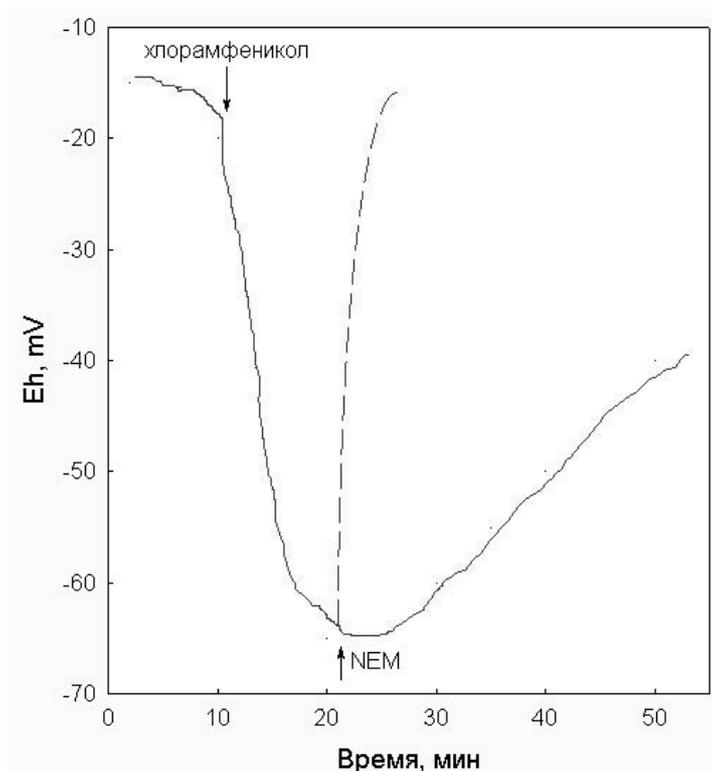


Рис. 4. Скачок E_h при воздействии на растущие бактерии антибиотиком хлорамфениколом (левомицетином). На рисунке показано, что если в момент скачка в культуру бактерий ввести SH-реагент N-этилмалеимид, то значение E_h (пунктирная линия) быстро возвращается к базовому значению. Это доказывает, что скачок E_h связан с увеличением тиоловых (SH) групп с внешней стороны бактериальной клетки

метров среды и клетки. Наиболее важным результатом явилось обнаружение физико-химической природы скачка Eh. Было убедительно показано, что наблюдаемые при стрессах изменения редокс-потенциала связаны с изменениями концентрации экстраклеточных низкомолекулярных тиолов (рис. 4, 5).

Какова биологическая целесообразность выброса низкомолекулярных тиолов в среду при стрессах? Эти соединения являются эффективными донорами электронов и, соответственно, восстанавливая электрофильные соединения, к числу которых относится большое число чужеродных соединений, играют важную роль в защите живых клеток от их токсич-

агентов, выброс тиолов в среду будет способствовать обезвреживанию этих агентов на «дальних рубежах». К настоящему времени у бактерий открыто и подробно описано несколько систем, которые активируются при стрессах и способствуют выживанию бактерий в экстремальных условиях.

Изучению поведения редокс-потенциала в культурах микроорганизмов посвящено большое количество работ, но, как правило, вследствие большого числа факторов, влияющих на величину Eh в живых системах, молекулярная основа описываемых изменений Eh остается невыясненной. Результаты данных исследований являются одним из немногих при-

меров, когда была показана молекулярная природа изменений Eh. Следует отметить, что современные биореакторы, применяемые в биотехнологии, снабжаются аппаратурой для измерения редокс-потенциала. Полученные нами результаты

характерными для окислительного стресса. Окислительный стресс возникает тогда, когда скорость образования активных форм кислорода, таких как супероксидный анион ($O_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) и

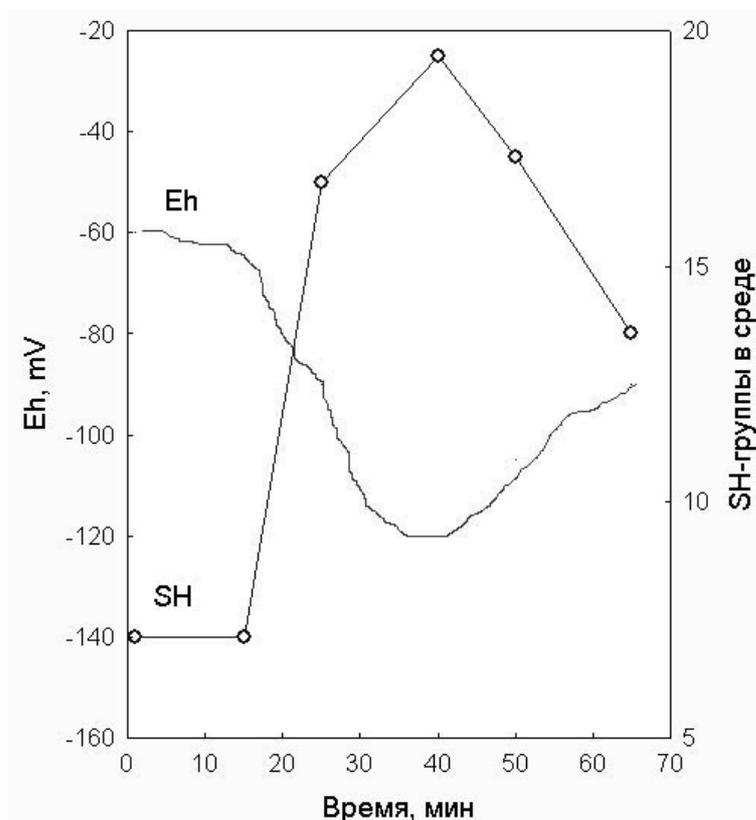


Рис. 5. Еще одно доказательство связи между скачком Eh и концентрацией тиолов. Генерация скачка Eh при стрессе голода сопровождалась одновременным изменением концентрации низкомолекулярных тиолов в среде

дают более глубокую теоретическую основу для применения Eh при разработке оптимальных режимов культивирования.

Другое направление наших исследований связано с изучением молекулярных механизмов адаптации бактерий к стрессам. В своем жизненном цикле как *E. coli*, так и другие бактерии многократно встречаются с резкими изменениями параметров окружающей среды, например, в желудке человека – с экстремально низким рН, а после выхода из кишечника – с резкими изменениями температуры, осмотического давления, солнечной радиацией и т.д. Подробно исследуя ответ бактерий на различные стрессы, мы показали, что в ряде случаев экстремальные воздействия сопровождаются не только реакциями, специфичными для данного стресса, но и

гидроперекиси (ROOH), превышает скорость их детоксикации. Благодаря высокой реакционной способности АФК могут повреждать все биологические макромолекулы и представляют потенциальную опасность для клетки.

В качестве примера можно привести данные, полученные при исследовании реакции *E. coli* на осмотический шок. На рис. 6 показано, как в ответ на повышение осмотического давления в среде наблюдалась активация экспрессии гена *sodA*, кодирующего супероксиддисмутазу. Этот фермент участвует в детоксикации супероксидного аниона и является важным компонентом антиоксидантной защиты клеток самых разных типов. В настоящее время накоплены многочисленные данные об индукции окислительного

стресса при различных стрессах у организмов самых разных типов, включая человека, растения и бактерии. Предполагается, что это может быть одним из факторов, ведущих к различным патологиям.

Бактерии *E. coli* содержат большие ко-

личества глутатиона в дышащих клетках *E. coli*. Предполагается, что такая циркуляция может выступать как элемент сенсорного и регуляторного механизма, осуществляющего координацию между потоками ионов и уровнем АТФ при стрессах.

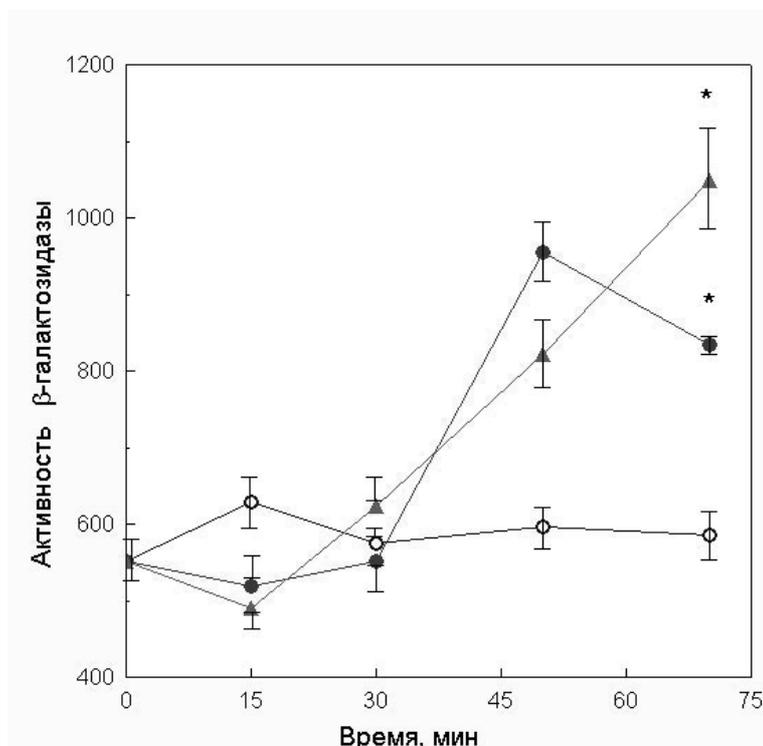


Рис. 6. Экспрессия антиоксидантного гена *sodA* при осмотическом шоке *E. coli*. На оси ординат показана активность β-галактозидазы, отражающая экспрессию гена *sodA*. Умеренный (●) или сильный (▲) осмотический шок, (○) – контроль

личества глутатиона, трипептида, обладающего антиоксидантными свойствами. Нами было показано, что в ответ на различные стрессы (окислительный, температурный, осмотический, рН-сдвиг, УФ-облучение, действие антибиотиков и др.) существенно изменяется статус глутатиона (уровень и редокс-состояние) внутри и снаружи клеток, и это может оказывать заметное влияние на успешную адаптацию бактерий к стрессам. В качестве примера можно привести температурную адаптацию клеток *E. coli*. Мутанты бактерий, лишенные антиоксиданта глутатиона, хуже адаптировались к росту при разных температурах. Добавление глутатиона заметно стимулировало скорость роста в этих ситуациях.

Другое важное наблюдение касается обнаружения трансмембранной циркуля-

Накопленный опыт в области фундаментальных исследований позволил нам заняться решением ряда прикладных задач. В качестве примера можно привести использование микробных тест-систем для оценки загрязнения окружающей среды, а также для поиска растений, обладающих повышенной антиоксидантной активностью. При тесном сотрудничестве с учеными из Сибирского отделения РАН выявлен ряд растений, произрастающих в Западной Сибири, экстракты из которых обладают высокой антиоксидантной активностью, и исследованы молекулярные механизмы, ответственные за эту активность.

Наши исследования были поддержаны 6 грантами РФФИ и 4 грантами РФФИ-Урал, а также целевыми программами Президиума РАН и УрО РАН.