

УДК 577.152:277:577.1:577.125.252.5

А. З. Пепоян, Г. Г. Бадалян, Ж. А. Кцоян,
чл.-корреспондент АН Армении К. Г. Карагезян

Влияние R-плазмиды на формирование клеточных контактов и процесс
перекисного окисления липидов плазмидных и бесплазмидных клеток
Salmonella derby

(Представлено 15/XI 1990)

Присутствие в клетках внехромосомных генетических элементов может оказывать существенное влияние на рост, размножение и сохранение бактериальных клеток (1, 2). Нами было показано (3, 4), что отсутствие R-плазмиды в клетках *S. derby* приводит к физико-химическим сдвигам компонентов мембран, их дестабилизации, с последующим морфо-физиологическим изменением клетки. Обнаружено отставание роста бесплазмидных клеток в 2—3 раза по сравнению с плазмидными клетками.

Известно, что в суспензионной культуре микроорганизмов межклеточные взаимодействия способны инициировать структурную перестройку цитоплазматических мембран, способствуя переходу культуры из лог фазы в стационарную фазу роста (5). С другой стороны, интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах также может влиять на деление клеток (6). Поскольку клетки *S. derby* отличаются по форме и характеру клеточной стенки (7), представляло интерес изучение роли межмембранных взаимодействий, ПОЛ и природных антиоксидантов, а именно α -токоферола, в процессах роста и размножения бактериальных клеток *S. derby*.

В работе использованы условно-патогенный штамм *S. derby* К 89, несущий R-плазмиду, и его бесплазмидный вариант *S. derby* К 82.

Выделение мембран из клеток *S. derby* проводили по методу Айноэ (8). Основным экспериментальным методом при изучении межмембранных взаимодействий в мембранных суспензиях служил метод дифракции рентгеновских лучей под малыми углами. Образцы были изготовлены и исследованы по методу, описанному в работе А. А. Шагиняна (9).

Об активности ПОЛ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА), образующего с тиобарбитуровой кислотой окрашивание, интенсивность которого регистрировали спектрофотометрически (СФ—

4А), при длине волны 535 нм ⁽¹⁰⁾, количество перекисей пересчитывали на мг белка данной суспензии. Белок определяли по методу Лоурн ⁽¹¹⁾ и Яковлева ⁽¹²⁾ в экстрактах бактерии и в бактериальной суспензии в зависимости от концентрации клеток (расчет концентрации проводили по плотности клеток в 1 мл среды, определяемой по ФЭК) и продолжительности времени (время инкубации).

Свободный α -токоферол в клетках *S. derby* определяли по методу Дагана ⁽¹³⁾.

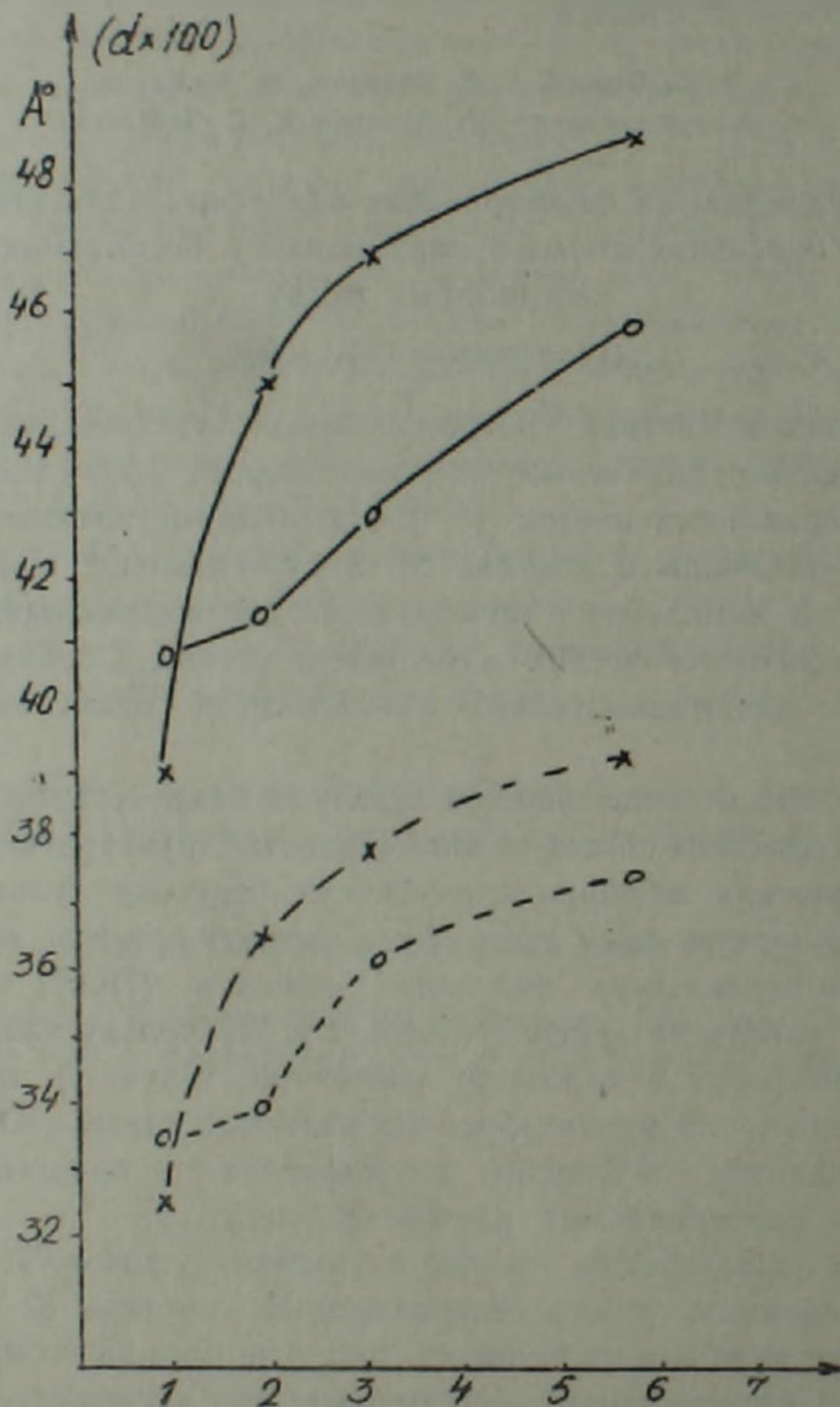


Рис. 1. Зависимость суммарной толщины мембраны и межмембранного расстояния от соотношения концентрации вода-мембрана в системе.
 x-x — *S. derby* К 81; o-o — *S. derby* К 82

Для изучения влияния pH среды культивирования на рост и размножение плазмидосодержащих и бесплазмидных клеток *S. derby* культуры выращивали в питательном бульоне при аэробных условиях и

разных pH среды. Рост клеток определяли в разных моментах инкубационного времени с помощью ФЭК.

Ранее проведенными исследованиями было установлено что бесплазмидные клетки *S. derby* не только отличаются по форме, но имеют также извилистую поверхность клеточной стенки с фимбриями (?), однако биофизическое поведение клеточных мембран в их суспензиях оставалось неизвестным.

Исследование клеточных мембран проводили рентгенографическим методом при разных концентрациях мембран в водной суспензии (pH=7). Как видно из рис. 1, межмембранное расстояние d как у плазмидного, так и у бесплазмидного штамма меняется в зависимости от концентрации мембран. С увеличением концентрации воды в мембранных суспензиях имеет место ее проникновение в межмембранное пространство, приводящее в конечном итоге к изменению месторасположения соответствующего рефлекса на рентгенограмме.

При малых концентрациях у бесплазмидных клеток *S. derby* межмембранное d всегда больше, чем в плазмидосодержащих клетках *S. derby*, т. е. роль межклеточных контактов в биофизических процессах бесплазмидных клеток более очевидна, чем в плазмидных клетках.

Рентгенограммы, полученные при дифракции рентгеновских лучей под малыми углами мембран клеток *S. derby*, позволяют сделать вывод о жидкокристаллической структуре обеих мембран, в то время как дифракция под большими углами показывает большую степень упорядоченности внутримембранной организации клеточных стенок плазмидных клеток (рис. 2).

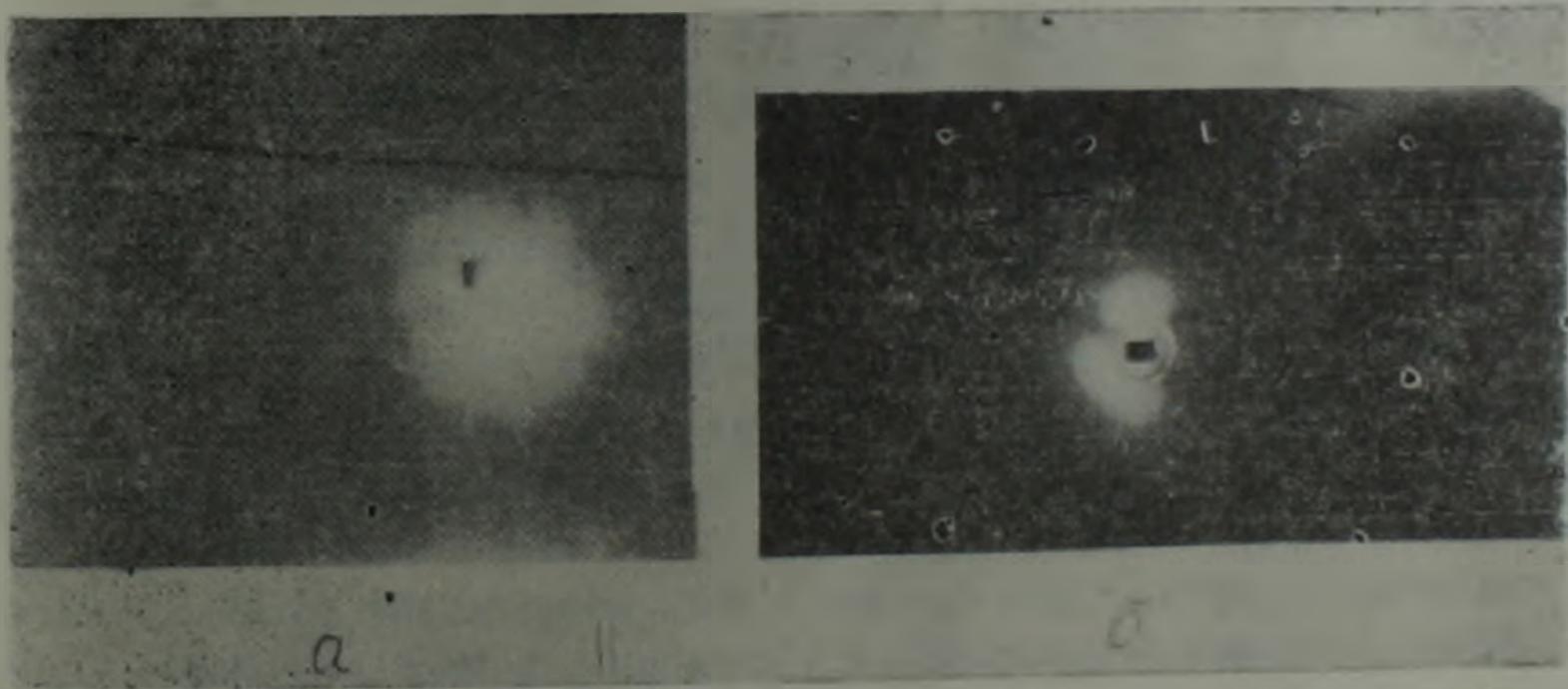


Рис. 2. Рентгенограмма 15%-ных мембранных суспензий плазмидосодержащих (а) и бесплазмидных (б) клеток *S. derby*

С другой стороны, результаты по исследованию ПОЛ показали, что межклеточные и межмембранные контакты могут существенно влиять также на процессы переноса конечного продукта ПОЛ—МДА из мембраны в межклеточное пространство (табл. 1), что затрудняет определение его точного количества. Исходя из табл. 1, можно предположить,

что скорость выделения МДА в основном зависит не только от концентрации клеток в бактериальной суспензии, но в первую очередь и от площади свободной поверхности клеток. Несмотря на это ПОЛ имеет одинаковую кинетическую направленность в плазмидосодержащих и бесплазмидных клетках *S. derby*. Из табл. 1 явствует также зависимость ПОЛ от физиологического состояния бактериальных клеток ($K=0,2$), что особенно ярко выражается у плазмидосодержащего штамма.

Таблица 1

Процесс перекисного окисления липидов в клетках *S. derby* в зависимости от фазы роста и концентрации клеток, количество МДА на 1 мг белка

Штамм	Логарифмическая фаза роста		Стационарная фаза роста		
	Концентрация клеток				
	0,1	0,2	0,2	0,4	0,7
К 89 дикий плазмидосодержащий, клеточная суспензия	140,1 ± 0,021	54,32 ± 0,102	36,216 ± 0,341	118,54 ± 0,141	54,02 ± 0,01
К 89 дикий плазмидосодержащий, клеточный экстракт	20,05 ± 0,41	30,9 ± 0,2	9,9 ± 1,21	26,3 ± 0,231	71 ± 3,06
К 82 бесплазмидный, клеточная суспензия	32,011 ± 0,21	32,79 ± 0,913	34,66 ± 0,11	36,95 ± 0,81	26,005 ± 1,23
К 82 бесплазмидный, клеточный экстракт	27 ± 0,038	27 ± 0,244	13,1 ± 2,003	34,8 ± 1,133	77,2 ± 2,11

Количество МДА, определяемое при концентрации клеток $K=0,4$, при которой для обоих типов клеток *S. derby* межклеточные контакты существенно не влияют на выделение МДА в межклеточное пространство, поскольку основную часть мембранных липидов у бактерии составляют фосфолипиды, пересчитано на 1 мкг фосфора данной суспензии. Количество фосфора определялось при изучении фосфолипидного состава клеток *S. derby*.

Таким образом, установлено, что количество МДА у клеток *S. derby*, лишенных R-плазмиды, примерно в 18 раз больше, чем в плазмидосодержащих клетках, а количество α -токоферола в плазмидных клетках значительно меньше, чем в клетках, лишенных R-плазмиды.

Изменение скорости течения реакции ПОЛ в зависимости от физиологического состояния клеток *S. derby* может быть фактором контроля перехода культуры из логарифмической фазы в стационарную, значительно ярче представленную в плазмидосодержащих клетках, нежели в клетках, лишенных R-плазмиды.

Результаты экспериментов свидетельствуют, что усиление межклеточных контактов и интенсивности течения реакции ПОЛ, как и повышенные степени внутримембранной неупорядоченности бесплазмидных клеток *S. derby*, по всей вероятности, способствуют замедлению роста и размножения, в то время как высокие концентрации α -токоферола играют существенную роль в регуляции клеточного метаболизма бесплазмидных клеток *S. derby*.

В ходе работы представляло интерес изучить влияние pH среды культивирования на рост и размножение плазмидосодержащих и бесплазмидных клеток *S. derby*.

Таблица 2

Влияние pH среды культивирования на рост и размножение клеток *S. derby*
(плотность клеточной суспензии по ФЭК)

Время инкубации ч	pH среды					
	5,02	5,5	6,5	7,0	7,5	8,0
	Б е с п л а з м и д н ы е					
2	0,015	0,038	0,046	0,048	0,058	0,065
3,5	0,17	0,06	0,07	0,073	0,088	0,072
5,0	0,078	0,14	0,158	0,173	0,177	0,124
6,5	0,12	0,245	0,258	0,273	0,235	0,164
Ночная культура	0,42	0,54	0,548	0,52	0,408	0,279
	П л а з м и д н ы е					
2	0,002	0,025	0,037	0,043	0,053	0,047
3,5	0,08	0,163	0,182	0,209	0,252	0,228
5,0	0,246	0,269	0,3	0,33	0,333	0,26
6,5	0,36	0,371	0,372	0,405	0,41	0,304
Ночная культура	1,5	0,93	0,918	0,891	0,829	0,6

Примечание: при равных концентрациях клеток количество жизнеспособных бесплазмидных клеток в 10 раз меньше, чем плазмидных.

Из табл. 2 видно, что клеток обоих типов в log фазе роста $pH_{opt} = 7,0-7,5$. Переход плазмидных клеток из log в стационарную фазу роста завершается через 2,5—3,0 ч. после инкубации, а бесплазмидных клеток в 2 раза позже. После перехода клеток в стационарную фазу роста наблюдается изменение интенсивности роста в зависимости от pH среды со сдвигом в кислую сторону (максимум роста для ночной бесплазмидной культуры наблюдается при $pH = 6,5$, а для плазмидных клеток—при $pH = 5,027$).

В табл. 3 представлены относительные скорости роста клеток *S. derby* при исследуемых pH и времени инкубации. Показано, что до

перехода бесплазмидных клеток в стационарную фазу роста наблюдается максимум роста при $pH = 7,0$ в стационарной фазе роста во всех исследованных временах инкубации максимальная скорость наблюдается при $pH = 5,02$.

Таблица 3

Определение относительной скорости роста клеток *Salmonella derby* при разных pH окружающей среды

Инкубационный период ч	pH среды					
	5,02	5,5	6,5	7,0	7,5	8,1
Бесплазмидные						
2-3,5	0,1	0,58	0,52	0,52	0,517	0,1
3,5-5,0	4,2	1,26	1,257	1,34	1,04	0,72
5-6,5	0,94	0,75	0,63	0,596	0,326	0,323
Плазмидные						
2-3,5	3,9	5,52	3,919	3,895	3,9	3,89
3,5-5	2,675	0,65	0,648	0,579	0,321	0,124
5-6,5	0,46	0,379	0,24	0,23	0,231	0,18

Таблица 4

Изменение pH среды культивирования при росте плазмидных и бесплазмидных клеток *Salmonella derby*

Штамм	pH среды до инкубации	pH среды после 12 ч инкубации
К 82, бесплазмидный	7,1	7,09
К 89, плазмидный	7,1	8,31
К 82, бесплазмидный	4,9	5,1
К 89, плазмидный	4,9	5,85

Примечание: количество живых плазмидных и бесплазмидных клеток в начале инкубации отличается.

Как показывают данные по табл. 4, при росте клеток имеет место изменение pH среды, что, в свою очередь, влияет на определение pH_{opt} среды клеток, находящихся в стационарной фазе роста. Наблюдается четкий сдвиг pH среды в процессе роста у плазмидных клеток, а у бесплазмидных клеток сдвиг этот весьма незначителен. Более медленный переход при росте бактерий pH кислой среды в нейтральную, наблюдаемый в бесплазмидных клетках в сравнении с плазмидными,

ЛИТЕРАТУРА — ЧԻՌՈՒՄԻՆՈՒՄ

- ¹ R. W. Lacey, E. L. Lewis, *J. Med. Microbiol.*, v. 7, № 1, p. 117—125 (1974).
² P. M. Bennett, A. Linton, *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 18, p. 123—126 (1986).
³ А. З. Пелоян, III конференция молодых ученых института экспериментальной биологии АН Арм. ССР, Ереван, 1988. ⁴ А. З. Пелоян, Ж. А. Кцоян, К. Г. Карагезян, Механизмы регуляции клеточной активности. М., 1989. ⁵ С. В. Конев, В. М. Мажуль, Межклеточные контакты. М., «Наука и техника», 1977. ⁶ А. А. Болдырев, Введение в биохимию. М., Высшая школа, 1986. ⁷ Ж. А. Кцоян, Н. Д. Константинова, Н. Н. Саркисян и др., ДАН АрмССР, т. 89, № 5, с. 216—219 (1989). ⁸ О. М. Лоуи, *J. Biol. Chem.*, v. 245, p. 5813 (1973). ⁹ А. А. Шагинян, Г. Г. Бадалян, М. Х. Минасянц, Изв. АН АрмССР, т. 23, с. 72—77 (1989). ¹⁰ Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, Наука, М., 1972. ¹¹ О. М. Lowry, *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 26—275 (1951). ¹² В. И. Яковлева, И. В. Малофеева, И. Н. Зуева и др., Прикл. биохимия и микроб., т. 15, № 23, с. 328—335 (1979). ¹³ D. E. Duggan, *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 181, p. 116—120 (1979).