

УДК 579.844.91:57.04

## СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

*Т.В. Багаева, А.С. Никифоров, Е.Е. Зинурова*

### Аннотация

Качественный и количественный состав фосфолипидов цитоплазматических мембран сульфатредуцирующих бактерий меняется от условий культивирования микроорганизмов. Установлено, что стрессовые факторы (дефицит сульфатов, действие кислорода), приводящие к снижению роста клеток популяции, вызывают активацию синтеза фосфолипидов мембран. Увеличение общего количества фосфолипидов отражается на изменении их качественного состава. Общей закономерностью изменения фосфолипидного состава мембран клеток при стрессах является снижение содержания фосфатидилглицерина и усиление синтеза фосфатидилэтаноламина. Стресс по дефициту сульфата в среде культивирования сульфатредуцирующих бактерий снижает в 23 раза уровень кардиолипина – фосфолипида, связанного с функционированием окислительно-восстановительных комплексов дыхательной цепи. Окислительный стресс связан в основном с увеличением фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола в составе мембран сульфатредуцирующих бактерий, то есть с транспортными процессами клеток.

**Ключевые слова:** фосфолипиды, сульфатредуцирующие бактерии, стресс.

### Введение

Фосфолипиды бактерий, так же как фосфолипиды животных и растений, являются важнейшими структурными и функциональными компонентами клетки. Функции бактериальных фосфолипидов многообразны. Показано, что они служат матриксом мембранных белков и ферментов; выполняют роль кофакторов и эффекторов; участвуют в биогенезе компонентов клеточной оболочки: липополисахарида, липопротеина, периплазматических олигосахаридов, – как их предшественники; способствуют повышению активности митохондриальных систем, дегидрогеназ и ряда других ферментов [1–3]. В работах последних лет показано, что фосфолипиды участвуют в процессах, как связанных с мембраной, так и не связанных с ней, в частности, отмечается возможность участия фосфолипидов в регуляции экспрессии ряда генов [4, 5]. Установлено, что модификация фосфолипидного состава мембран для одних генов проявляется в активации, а для других – в репрессии их активностей [6]. Однако модификация фосфолипидного состава мембран возможна и при воздействии стрессовых факторов.

Настоящая работа посвящена изучению влияния стрессовых факторов на изменения в структуре фосфолипидного состава цитоплазматических мембран сульфатредуцирующих бактерий.

## 1. Экспериментальная часть

В работе использовали культуры сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio*, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, г. Пущино, Россия): *Desulfovibrio desulfuricans* 1799, *Desulfomicrobium macestii* 1598, *Desulfovibrio gigas* 1382.

Бактерии выращивали на питательной среде Постгейта Б [7]. Культивирование проводили в герметично закрытых флаконах объемом 75 мл, при отношении питательной среды и газовой фазы 1 : 2. Газовая фаза содержала инертный газ – аргон. Заполнение газом проводили через бактериальный фильтр, после предварительной откачки воздуха с помощью вакуумного насоса типа MPW-5. Температура культивирования 37 °С. Повторность опыта трехкратная.

Стрессовые условия создавали значительным снижением концентрации сульфатов в питательной среде до 0.5 г/л или инкубацией сульфатредуцирующих бактерий в течение 24 ч в атмосфере стерильного воздуха.

О способности сульфатредуцирующих бактерий расти в условиях эксперимента судили по приросту белка, используя метод Лоури в модификации Гориной и Яковлевой [8]. Сероводород определяли колориметрическим методом, измеряя интенсивность окраски, образуемой при реакции железосодержащих квасцов с производным сульфида и N,N-диметил-пара-фениламина в кислой среде [9].

Липиды выделяли из клеток экстракцией смесью хлороформ – метанол (2 : 1) [10]. Качественный анализ состава фосфолипидов определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем, предварительно обработанных 1.2%-ным раствором борной кислоты в 50%-ном этаноле [11].

В ходе исследований контролировали чистоту сульфатредуцирующих бактерий с помощью микроскопирования с фазово-контрастным устройством (КФ-4) и посевами на глюкозо-пептонную среду для аэробных и анаэробных гетеротрофных бактерий.

## 2. Результаты и обсуждение

В работе изучали действие двух стрессовых факторов: лимит концентрации сульфатов в питательной среде и окислительный стресс, на рост, метаболизм и фосфолипидный состав мембран сульфатредуцирующих бактерий. Контролем служили результаты, полученные при росте и метаболизме штаммов бактерий, растущих в оптимальных условиях культивирования популяции.

Результаты исследований показали, что в оптимальных условиях все изучаемые штаммы сульфатредуцирующих бактерий нормально росли и продуцировали сероводород (табл. 1). Активный рост и накопление биомассы были отмечены у штамма *D. desulfuricans* 1799. Удельная скорость роста составляла  $0.13 \text{ ч}^{-1}$ , количество биомассы по белку  $170.5 \pm 1.9 \text{ мг/л}$ . Параллельно с ростом биомассы продуцируется сероводород, количество которого на конец экспоненциальной фазы роста составляло  $400.0 \pm 2.5 \text{ мг/л}$ . Определение общего содержания фосфолипидов штамма показало, что оно соответствует  $0.34 \pm 0.05 \text{ мг/л}$ .

Табл. 1

Рост и образование фосфолипидов сульфатредуцирующими бактериями в норме и в стрессовых условиях культивирования

Вид микроорганизмов	Нормальные условия культивирования				Лимит сульфатов				Действие кислорода			
	μ	Белок мг/л	H <sub>2</sub> S	ФЛ	μ	Белок мг/л	H <sub>2</sub> S	ФЛ	μ	Белок мг/л	H <sub>2</sub> S	ФЛ
<i>D. desulfuricans</i> 1799	0.13	170.5 ± 1.9	400.0 ± 2.5	0.34 ± 0.05	0.11	145.2 ± 1.8	50.0 ± 0.4	0.39 ± 0.02	0.12	157.6 ± 1.9	230.2 ± 1.4	0.37 ± 0.03
<i>D. macesitii</i> 1598	0.07	140.0 ± 1.8	340.0 ± 1.8	0.56 ± 0.04	0.06	132.6 ± 1.7	23.2 ± 0.2	0.77 ± 0.04	0.06	135.5 ± 1.8	190.0 ± 1.2	0.66 ± 0.04
<i>D. gigas</i> 1382	0.15	176.0 ± 2.5	420.0 ± 2.8	0.40 ± 0.02	0.13	158.4 ± 2.0	41.0 ± 0.2	0.51 ± 0.02	0.13	162.8 ± 2.0	320.0 ± 1.6	0.43 ± 0.02

Табл. 2

Влияние стрессового фактора на изменение состава фосфолипидов мембран сульфатредуцирующих бактерий (% различных липидов от общего их количества)

Фосфолипиды	<i>D. desulfuricans</i> 1799				<i>D. macesitii</i> 1598				<i>D. gigas</i> 1382			
	Нормальные условия культивирования	Лимит сульфатов	Действие кислорода	Нормальные условия культивирования	Лимит сульфатов	Действие кислорода	Нормальные условия культивирования	Лимит сульфатов	Действие кислорода			
Фосфатидил-глицерин	43.7 ± 1.67	35.0 ± 0.98	40.6 ± 2.20	35.4 ± 2.44	30.6 ± 1.07	29.0 ± 2.32	42.2 ± 1.89	38.4 ± 1.23	34.4 ± 1.24			
Фосфатидная кислота	0	8.6 ± 1.01	0	0	13.2 ± 0.78	0	0	9.8 ± 0.43	0			
Кардиолипин	11.0 ± 1.32	4.8 ± 0.02	10.4 ± 0.90	12.0 ± 0.98	4.0 ± 0.02	15.6 ± 0.95	14.0 ± 1.02	5.2	7.0 ± 0.40			
Фосфатидил-этаноламин	45.3 ± 1.90	49.4 ± 0.33	44.4 ± 1.02	47.6 ± 2.0	50.7 ± 1.28	55.4 ± 0.98	43.8 ± 1.90	45.4 ± 1.23	51.8 ± 1.45			
Фосфатидилинозитол	0	2.2 ± 0.02	4.6 ± 0.98	5.0 ± 1.34	1.5 ± 0.09	0	0	1.2 ± 0.40	6.8 ± 1.27			

Культура *D. macestii* 1598 росла менее активно. Удельная скорость роста составляла  $0.07 \text{ ч}^{-1}$ , однако количество биомассы было в пределах  $140.0 \pm 1.8 \text{ мг/л}$ . Показателем нормального роста штамма являлось и накопление сероводорода, количество которого составляло  $340.0 \pm 1.8 \text{ мг/л}$ . Интересно отметить, что общее содержание фосфолипидов у данного штамма было 1.5–1.6 раз выше, чем у штамма *D. desulfuricans* 1799.

Наиболее активный рост наблюдался у штамма *D. gigas* 1643. Удельная скорость роста –  $0.15 \text{ ч}^{-1}$ , количество биомассы  $176.0 \pm 2.5 \text{ мг/л}$ . Количество сероводорода –  $420.0 \pm 2.8 \text{ мг/л}$ . Несмотря на активный рост, общее содержание фосфолипидов имело среднее значение ( $0.40 \pm 0.02 \text{ мг/л}$ ).

Расчет продуктивности фосфолипидов на белок клеток показал, что если штаммы *D. desulfuricans* 1799 и *D. gigas* 1382 имеют равнозначные значения содержания фосфолипидов на клетку, то у штамма *D. macestii* 1598 эти показатели были в 2 раза выше.

Таким образом, можно сказать, что общее количество синтезируемых фосфолипидов зависит от видового разнообразия сульфатредуцирующих бактерий.

Сульфаты являются основными акцепторами электронов при анаэробном дыхании сульфатредуцирующих бактерий и снижение их концентрации в питательной среде можно рассматривать как стрессовое действие на микроорганизм.

Результаты исследований показали, что при минимальном содержании сульфатов в питательной среде наблюдалось снижение показателей удельной скорости роста и накопления биомассы для всех изучаемых штаммов сульфатредуцирующих бактерий относительно контрольных вариантов (табл. 1). Однако параллельно со снижением прироста биомассы, у всех штаммов, было отмечено значительное (15–38%) повышение содержания фосфолипидов в клетках (рис. 1).

Таким образом, можно сказать, что стресс, вызываемый у сульфатредуцирующих бактерий с помощью минимального содержания сульфатов в питательной среде, приводит к снижению прироста биомассы клеток и усилению синтеза фосфолипидов.

Известно, что сульфатредуцирующие бактерии относятся к анаэробным микроорганизмам, и несмотря на то что они способны выдерживать до 6% кислорода в среде культивирования [12], длительное действие кислорода воздуха на клетки можно рассматривать как окислительный, стрессовый фактор.

Окислительные, стрессовые условия создавали за счет культивирования клеток сульфатредуцирующих бактерий в атмосфере стерильного воздуха в течение 24 ч, с дальнейшим ростом культур при оптимальных условиях. Результаты исследований показали, что окислительный стресс вызывал снижение удельной скорости роста сульфатредуцирующих бактерий. Однако прирост биомассы был выше, чем при дефиците сульфатов (табл. 1). Снижение прироста биомассы в условиях окислительного стресса, как и в случае с минимальным содержанием сульфатов в среде, сопровождалось увеличением количества фосфолипидов на (8–17%) (рис. 1).

Таким образом, установлена закономерность, показывающая, что при действии стрессовых условий происходит снижение прироста биомассы всех изучаемых культур и на этом фоне отмечается увеличение содержания фосфолипидов клеток. Можно сказать, что стрессовые условия, приводящие к снижению

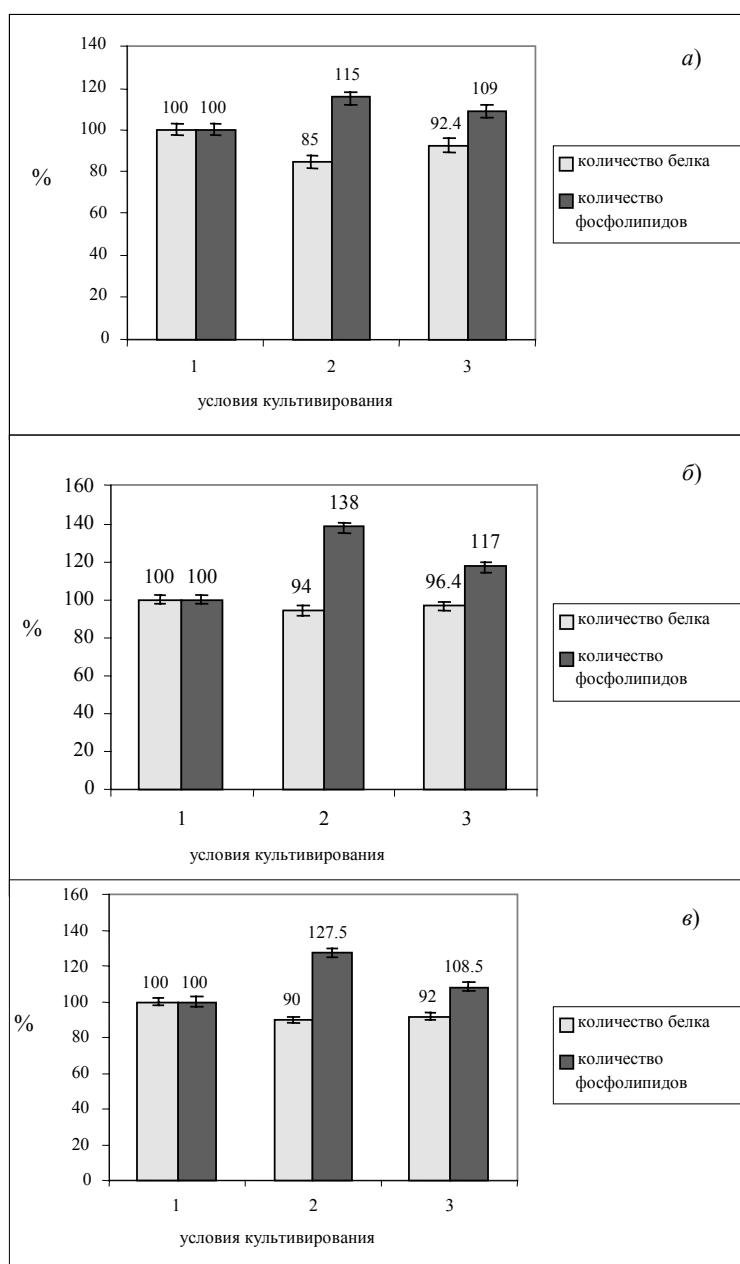


Рис. 1. Изменение концентрации белка и мембранных фосфолипидов сульфатредуцирующих бактерии в зависимости от стрессовых условий: 1 – нормальные условия; 2 – при дефиците сульфатов; 3 – при действии кислорода. а – *D. desulfuricans* 1799; б – *D. macestii* 1598; в – *D. gigas* 1382

удельной скорости роста бактерий, индуцируют активный синтез мембранных фосфолипидов, которые, вероятно, способствуют стабилизации структуры мембран в стрессовых условиях, тем самым адаптируя клетки к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Изучение качественного состава мембранных фосфолипидов сульфатредуцирующих бактерий показало, что при оптимальном росте бактерий основными фосфолипидами мембран всех изучаемых штаммов бактерий являлись фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин, причем первый из них преобладал (табл. 2). Кроме того, в составе мембран определялся кардиолипин, но в меньшем количестве. Для штамма *D. macestii* 1598, содержащего большее количество фосфолипидов по сравнению с другими штаммами, было отмечено дополнительное присутствие фосфатидилинозитола.

Стрессовое действие, связанное со снижением содержания сульфатов в питательной среде, приводило к изменению качественного состава фосфолипидов мембран. В этих условиях в мембранах сульфатредуцирующих бактерий наблюдалось снижение относительного содержания фосфатидилглицерина и усиление синтеза фосфатидилэтаноламина. Содержание кардиолипина резко снижалось, однако у всех изученных штаммов сульфатредуцирующих бактерий отмечалось появление фосфатидной кислоты и фосфатидилинозитола.

В условиях окислительного стресса наблюдалось еще большее снижение относительного содержания фосфатидилглицерина и увеличение концентрации фосфатидилэтаноламина в мембранах клеток. Содержание кардиолипина у штаммов *D. desulfuricans* 1799 и *D. gigas* 1382 было ниже значений контрольного варианта, но наблюдалось усиление синтеза фосфатидилинозитола. В отличие от вышеуказанных штаммов, в структуре мембран *D. macestii* 1598 при окислительном стрессе наблюдалось усиление синтеза кардиолипина и отсутствие фосфатидилинозитола.

### Заключение

Установлено, что стрессовые условия влияют на количественный и качественный состав мембранных фосфолипидов сульфатредуцирующих бактерий. Общей закономерностью изменения фосфолипидного состава мембран клеток при стрессах являлось снижение содержания фосфоглицерина и усиление синтеза фосфатидилэтаноламина.

Интересным является факт снижения в 2–3 раза концентрации кардиолипина в составе фосфолипидов мембран при недостатке сульфатов в среде. Установлено, что этот фосфолипид важен для поддержания и функционирования многих белковых комплексов в энергозапасующих мембранах, особенно сформированных из окислительно-восстановительных комплексов [13]. В нашем варианте, когда в среде культивирования снижено количество сульфатов, являющихся конечным акцептором электронов анаэробного дыхания сульфатредуцирующих бактерий, то есть нарушен процесс функционирования данных комплексов, клетки сульфатредуцирующих бактерий резко снижают его синтез. С другой стороны, при дефиците источника серы, когда отмечено наиболее существенное снижение скорости роста бактерий и прироста биомассы, наблюдается появление фосфатидной кислоты. Эта кислота является основой для биосинтеза большинства фосфолипидов и обладает сигнальной функцией [14, 15]. Стрессовые условия (дефицит сульфатов), приводящие к значительному снижению роста клеток популяции, вызывают активацию синтеза фосфолипидов мембран, что, по-видимому, и отражается на появлении фосфатидной кислоты.

При окислительном стрессе изменение качественного состава фосфолипидов обусловлено в основном увеличением фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола. Изменение их концентрации, по-видимому, больше связано с избирательной проницаемостью клеток. Участие фосфатидилэтаноламина в транспортных процессах клеток отмечалось в ранее проведенных работах [16, 17].

Изменение содержания в мембранах фосфотидилинозитола, как и кардиолипина, при действии стресса носит видовой характер. Усиление синтеза фосфатидилинозитола, особенно при окислительном стрессе у штаммов *D. desulfuricans* 1799 и *D. gigas* 1382, по-видимому, связано с защитными реакциями сульфатредуцирующих бактерий. У штамма *D. macedonii* 1598 эту функцию, по-видимому, выполняет кардиолипин. В ряде работ отмечается, что кардиолипин, в отличие от других фосфолипидов, обладает иммунными свойствами [18].

Таким образом, действие стрессовых факторов на клетки сульфатредуцирующих бактерий вызывают существенные изменения в качественном и количественном составе цитоплазматических мембран клеток.

### Summary

*T.V. Bagaeva, A.S. Nikiforov, E.E. Zinurova.* Stress-Inducible Changes in Phospholipid Composition of Cytoplasmic Membranes of Sulfate-Reducing Bacteria.

Qualitative and quantitative composition of phospholipids in cytoplasmic membranes of sulfate-reducing bacteria depends on the conditions of microorganisms cultivation. Stress factors like lack of sulfates and effect of oxygen lead to a decrease in cell growth and cause activation of synthesis of phospholipids in membranes. The increase in the total number of phospholipids has an effect on changes in their qualitative composition. The changes in phospholipid composition of cell membranes under stress commonly consist in the reduction of phosphatidyl glycerol and activation of synthesis of phosphatidyl ethanolamine. The lack of sulfates in the medium of sulfate-reducing bacteria cultivation decreases by 23 times the content of cardiolipin – a phospholipid associated with the functioning of oxidation-reduction complexes of respiratory chain. Oxidative stress mainly deals with the increase in phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl inositol in membranes of sulfate-reducing bacteria, i.e. with transport processes in cells.

**Key words:** phospholipids, sulfate-reducing bacteria, stress.

### Литература

1. *Fernandez Murga M.L., Font de Valdez G., Disalvo E.A.* Effect of lipid composition on the stability of cellular membranes during freeze-thawing of *Lactobacillus acidophilus* growth at different temperatures // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – V. 388, No 2. – P. 179–184.
2. *Crogan J.E.* Bacterial membrane lipids: where do we stand? // Annu. Rev. Microbiol. – 2003. – V. 57. – P. 203–224.
3. *Пиневиц А.В.* Микробиология. Биология прокариотов. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2007. – Т. 1. – 352 с.
4. *Voorst F., Kruijff B.* Role of lipids in the translocation of proteins across membrane // Biochem. J. – 2000. – V. 267, No 2. – P. 601–612.
5. *Golovastov V.V., Nesmeyanova M.A.* Effect of membrane phospholipid composition and charge of the signal peptide of *Escherichia coli* alkaline phosphatase on efficiency of its secretion // Biochemistry. – 2003. – V. 68, No 10. – P. 1089–1096.

6. *Badyakina A.O., Koryakina Y.A., Suzina N.E., Nesmeyanova M.A.* Membrane phospholipid composition of *Escherichia coli* affects secretion of periplasmic alkaline phosphatase into the medium // *Biochemistry*. – 2003. – V. 68, No 7. – P. 752–759.
7. *Postgate J.R.* The sulfate-reducing bacteria. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984. – 208 p.
8. *Горина М.А., Яковлева В.И.* Быстрый метод определения содержания белка в клетках микроорганизмов // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 1980. – Т. 16, № 6. – С. 936–939.
9. *Widdel F.* Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierten Arten Sulfat-reduzierender Bakterien: Dissertation. – Universität Göttingen, 1980. – 390 S.
10. *Шмаль Э.* Хроматография в тонких слоях. – М.: Мир, 1965. – 508 с.
11. *Новицкая Г.В.* Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов. – М.: Наука, 1972. – 64 с.
12. *Dilling W., Cypionka H.* Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1990. – V. 71, No 1–2. – P. 123–127.
13. *Милейковская Е., Жанг М., Доухан В.* Роль кардиолипина в энергозапасующих мембранах // *Биохимия*. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 191–196.
14. *Vance D.E., Vance J.E.* Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. – Edmonton Alberta. Univ. Alberta, 2004. – 608 p.
15. *Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R.* Signaling functions of phosphatidic acid // *Prog. Lipid Res.* – 2006. – V. 45, No 3. – P. 250–278.
16. *Громов Б.В.* Строение бактерий. – Л.: Ленингр. гос. ун-т, 1985. – 236 с.
17. *Corcelii A.* The cardiolipin analogues of Archaea // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1788, No 16. – P. 2101–2106.
18. *Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.* Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – 703 с.

Поступила в редакцию  
12.10.10

---

**Багаева Татьяна Вадимовна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Tatiana.Bagaeva@ksu.ru](mailto:Tatiana.Bagaeva@ksu.ru)

**Никифоров Алексей Сергеевич** – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [lexa122a@mail.ru](mailto:lexa122a@mail.ru)

**Зинурова Елена Евгеньевна** – кандидат биологических наук, инженер 1 категории лаборатории роста и регуляции физиологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Elena.Zinurova@ksu.ru](mailto:Elena.Zinurova@ksu.ru)