

РЕАКЦИИ ИНТАКТНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА БЕНЗОАТ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ

Е.В. Емельянова, И.П. Соляникова

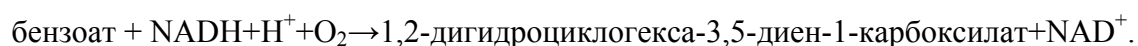
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пущино, Россия, elenvem@ibpm.pushchino.ru, innas@ibpm.pushchino.ru

Аннотация. Проведено сравнение реакций на бензоат и его производные для интактных свежевывращенных и иммобилизованных покоящихся клеток актинобактерий для отработки методики определения активности бензоат 1,2-диоксигеназы (БДО) и оценки транспорта бензоата в клетки бактерий. Показано, что реакция на бензоат у интактных клеток актинобактерий характеризует активность идуцибельной БДО, а у иммобилизованных (при определённых условиях) служит для оценки транспорта бензоата в клетку.

Ключевые слова: *Rhodococcus opacus*, *Gordonia polyisoprenivorans*, интактные и иммобилизованные клетки, бензоат и его аналоги

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-302-306

Чтобы разобраться в особенностях метаболизма микроорганизмов, необходимо иметь представление о ключевых ферментах энзиматического аппарата культуры. В случае стабильных растворимых ферментов несложной структуры их активность можно определить в бесклеточных экстрактах. Однако активность ряда ферментов в бесклеточном экстракте не всегда удаётся определить из-за невозможности сохранить фермент в активном состоянии во время разрушения клеток. Это касается и фермента начальной атаки бензоата – бензоат 1,2-диоксигеназы (БДО), представляющего собой двухкомпонентный ферментный комплекс сложной структуры. Бензоат 1,2-диоксигеназа катализирует реакцию, протекающую с участием кислорода:



Поэтому активность БДО измеряли в целых клетках по изменению потребления кислорода [Farr, 1968].

В настоящем исследовании о скорости ферментативной реакции, катализируемой БДО, судили опосредованно по изменению скорости дыхания свежевывращенных интактных клеток культуры в присутствии соединений – субстратов БДО (реакция свежевывращенных интактных клеток на бензоат (БК) и его производные, полярографическое определение). При этом не следует забывать, что интенсивность (скорость) дыхания – это реакция, которая является комплексным ответом всей клетки, а не только одного конкретного фермента. Для той же культуры оценивали реакцию иммобилизованных покоящихся клеток на бензоат и его производные. Иммобилизованные клетки фиксировали на поверхности кислородного электрода и регистрировали изменение дыхания клеток в ответ на внесение субстрата БДО (сенсорная методика). В этом случае скорость реакции иммобилизованных клеток опосредуется двумя процессами: скоростью реакции фермента с субстратом и скоростью транспорта субстрата в клетку [Тёрнер, 1992]. Целью исследования было сравнить реакции на бензоат и его замещённые производные для интактных и иммобилизованных клеток актинобактерий для отработки методики определения активности БДО и транспорта бензоата.

Чтобы определить реакцию на субстрат, в открытую кювету помещали суспензию свежевывращенных интактных клеток в буферном растворе или в кювету с буферным

раствором помещали кислородный электрод с зафиксированными на нём иммобилизованными покоящимися клетками. После регистрации базового дыхания интактных или иммобилизованных клеток в кювету вносили раствор бензоата (субстратного аналога бензоата) и фиксировали изменение потребления кислорода клетками с помощью кислородного электрода Кларка. Кислородный электрод преобразовывал химический сигнал – концентрация кислорода – в электрический. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (pA/c), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации кислорода (в ответ на внесение субстрата повышается потребление кислорода клетками). Регистрируемый сигнал отражал скорость реакции клеток с бензоатом или его производными. Скорость выражали в pA/c.

Нами были исследованы реакции на бензоат у двух представителей актинобактерий: *Rhodococcus opacus* 1CP и *Gordonia polyisoprenivorans* 135. Культуры были способны расти на БК в качестве единственного источника углерода и энергии [Solyanikova, 2015]. БДО – индуцибельный фермент, детектируемые количества которого синтезируются в клетках, выросших на средах содержащих субстрат БДО – бензоат. Реакция на бензоат суспензии (2.2 мг влажных клеток/мл) свежевыращенных на бензоате клеток достигала 91.4 pA/c. Была проверена реакция на бензоат интактных клеток, свежевыращенных на богатой пептон-триптонной среде (отсутствие бензоата), или длительно хранившихся после роста на среде с бензоатом [Емельянова, 2017; Соляникова, 2016, 2017; Solyanikova, 2017]. У клеток *R. opacus* 1CP и *G. polyisoprenivorans* 135, выросших в отсутствие бензоата, как и следовало ожидать, отсутствовала реакция на бензоат, при этом эндогенное дыхание было достаточно высоким. После длительного хранения (до 4 месяцев) клетки *R. opacus* 1CP, выросшие на бензоате, сохраняли дыхательную активность, но реакция клеток на бензоат падала до нуля. Клетки *G. polyisoprenivorans* 135 в течение более длительного времени (до 10 месяцев) сохраняли следовую активность БДО (2 pA/c). Индукция бензоатом в не ростовых условиях восстанавливала реакцию на бензоат у клеток, выросших на бензоате и длительно хранившихся, и индуцировала реакцию на БК у клеток, выращенных в отсутствие бензоата. Таким образом, реакция свежевыращенных интактных клеток на бензоат характеризует активность индуцибельной бензоат 1,2-диоксигеназы, содержащейся в клетках исследованных актинобактерий.

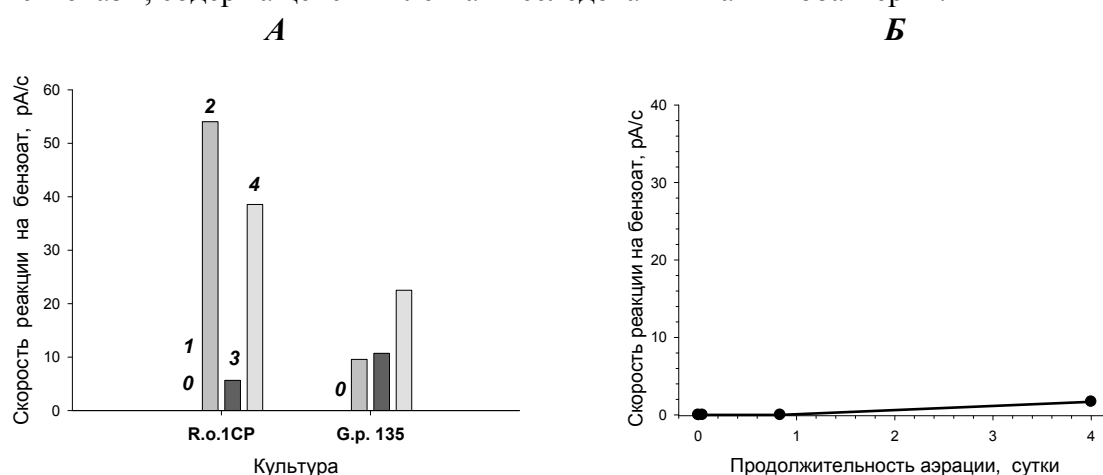


Рис. 1. А – сравнение реакции на бензоат (3.47 мМ) для *R. opacus* 1CP и *G. polyisoprenivorans* 135, выращенных на пептон-триптонной среде: неиндуцированных бензоатом интактных (1) и иммобилизованных (2) клеток и индуцированных бензоатом клеток, (3 и 4), соответственно. Б – появление следовой активности на бензоат у интактных клеток *R. opacus* 1CP после аэрации в неростовых условиях. 0 – нет реакции.

Сравнение реакций на бензоат для иммобилизованных и интактных клеток, выращенных на среде без бензоата, приведено на рис. 1А. Учитывая, что реакция иммобилизованных клеток на бензоат определяется скоростью реакции фермента с субстратом и скоростью транспорта субстрата, логично предположить, что при отсутствии активности фермента в клетках (отсутствие реакции у интактных клеток) реакция иммобилизованных клеток на субстрат зависит, прежде всего, от скорости транспорта субстрата. При аэрации интактных клеток (без БДО активности) в буферном растворе в течение 4-х суток была зарегистрирована следовая реакция на бензоат – около 2 рА/с (рис. 1Б). Это можно было бы объяснить активацией транспорта к 4-м суткам у интактных клеток: истощение основных запасов эндогенных субстратов переводит клетки в разряд покоящихся. Однако у длительно хранившихся интактных клеток аналогичной реакции не было зафиксировано.

Для интактных клеток 1СР зависимость скорости реакции на бензоат от концентрации БК отклонялась от классической гиперболической зависимости Михаэлиса-Ментен [Emelyanova, 2017]. Зависимости "реакция-концентрация", полученные для иммобилизованных клеток *R. opacus* 1СР и *G. polyisoprenivorans* 135 [Емельянова, 2017], с большей достоверностью можно было описать уравнением Хилла. Чтобы оценить природу реакции, перед иммобилизацией клетки культур были индуцированы бензоатом. В работе [Тёрнер, 1992] показано, что, если определяющей является скорость ферментативного процесса, то насыщение наблюдается при концентрации субстрата, лишь немного большей $S_{0.5}$ ($S_{0.5}$ – концентрация субстрата, при которой скорость процесса составляет половину максимальной скорости). Однако если процесс лимитируется скоростью транспорта субстрата, то насыщение может быть достигнуто и при концентрациях субстрата ($S_{нас}$), значительно превышающих $S_{0.5}$. Для *G. polyisoprenivorans* 135 проводимая перед иммобилизацией индукция бензоатом клеток, выращенных без БК, приводила к увеличению V_{max} (V_{max} – это предельное значение скорости реакции при $S \rightarrow \infty$) при небольшом увеличении соотношения $S_{нас}/S_{0.5}$ и практически неизменном значении $S_{0.5}$. А для *R. opacus* 1СР в результате индукции аналогичных клеток было зафиксировано снижение V_{max} при сохранении значения $S_{0.5}$ и значительном снижении $S_{нас}/S_{0.5}$. Данный факт может свидетельствовать о различной интенсивности процессов, задействованных в формировании ответа иммобилизованных клеток у двух исследованных культур.

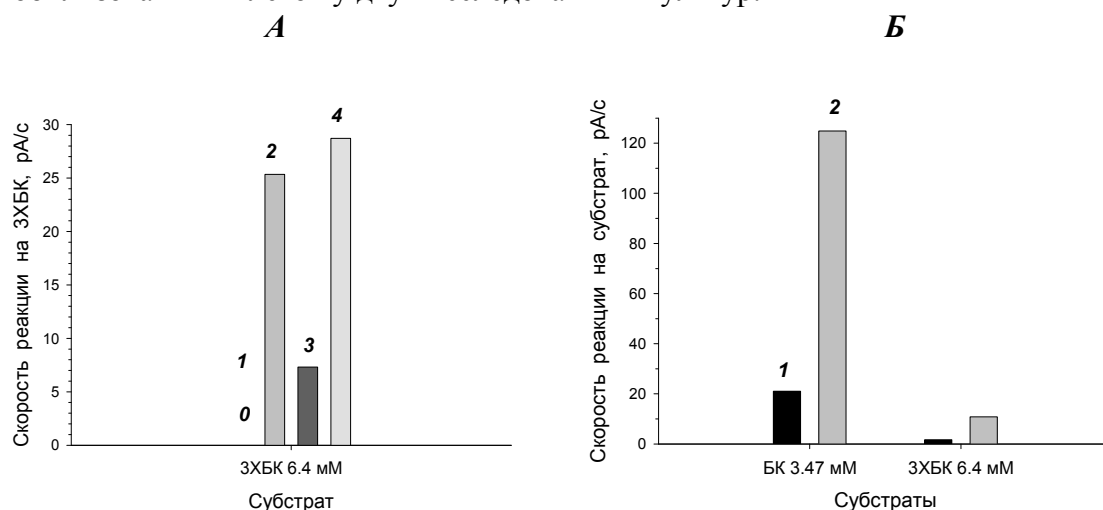


Рис. 2. Сравнение реакции на бензоат и 3ХБК для клеток *R. opacus* 1СР, выращенных на разных средах. А – рост на пептон-триптонной среде: 1, 3 – реакция интактных и 2, 4 – иммобилизованных клеток до (1, 2) и после индукции (3, 4) 3-хлорбензоатом. Б - рост на бензоате и хранение (14 месяцев): 1 – реакция интактных клеток и 2 – иммобилизованных. 0 – нет реакции.

Ранее нами было показано наличие конкуренции за БДО клеток *R. opacus* 1CP между бензоатом и моно-хлорбензоатами [Solyanikova, 2016, 2017]. Тип ингибирования для 2-хлорбензоата был определён как двухпараметрически рассогласованное ингибирование. Расчёт K_i с помощью метода векторного анализа привел к значению 337.5 мкМ, а для иммобилизованных клеток константа составила 140 мкМ (тип ингибирования – переходное от активации к ингибированию).

Для 3-хлорбензоата (3ХБК) тип ингибирования был определен как двухпараметрически согласованное и рассчитаны константы ингибирования. K_s бензоата (21.2 мкМ) для клеток, выращенных на бензоате, была на порядок меньше константы ингибирования БДО 3-хлорбензоатом (565 мкМ). На рис. 2 приведены реакции на 3ХБК для интактных и иммобилизованных клеток *R. opacus* 1CP, выращенных на пептон-триптонной среде и среде с БК. Для интактных клеток, которые выращивали на бензоате, была зафиксирована реакция и на 3ХБК. Однако она отсутствовала у клеток, свежевыращенных в отсутствие БК. У иммобилизованных клеток реакцию на 3ХБК, как и на бензоат, наблюдали независимо от присутствия БК или 3ХБК в среде культивирования или в буфере для индукции.

Таким образом, в клетках актинобактерий, содержащих индуцибельную бензоат 1,2-диоксигеназу, реакция на бензоат у свежевыращенных интактных клеток характеризует активность БДО. Реакция иммобилизованных покоящихся клеток при определённых условиях может служить для оценки транспорта бензоата в клетку.

Литература

Емельянова Е.В., Соляникова И.П. Оценка *Rhodococcus opacus* 1CP как потенциальной культуры-рецептора биосенсора для детекции бензоата // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Киров, 13–14 апреля 2017). Книга 2. – Киров: ВятГУ, 2017. – С. 327–332.

Емельянова Е.В., Сузина Н.Е., Поливцева В.Н., Решетилов А.Н., Соляникова И.П. Выживаемость и биodeградативная активность *Gordonia polyisoprenivorans* 135 – основы рецепторного элемента биосенсора // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 5. – С. 510–518.

Соляникова И.П., Емельянова Е.В., Егозарьян Н.С., Борзова О.В., Поливцева В.Н., Сузина Н.Е., Головлева Л.А. Выживаемость актинобактерий и сохранение ими биodeградативного потенциала в стрессовых условиях. // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Киров, 5-8 декабря 2016). Книга 2. – Киров: ООО «Издательство «Радуга-ПРЕСС», 2016. – С. 338–343.

Соляникова И. П., Сузина Н. Е., Емельянова Е. В., Поливцева В. Н., Пшеничникова А. Б., Лобанок А. Г., Головлёва Л. А. Морфо-физиологические и биохимические характеристики штамма *Rhodococcus opacus* 1CP – деструктора бензоата – в стрессовых условиях // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 2. – С. 188–200.

Тёрнер Э., Карубе И., Уилсон Дж. Биосенсоры: основы и приложения. – М: Мир, 1992. – 614 с.

Emelyanova E.V., Solyanikova I.P. Benzoate concentration and cooperativity by a substrate for benzoate 1,2-dioxygenase from benzoate-degrading *Rhodococcus opacus* 1CP // Journal of Biotechnology and Biomedical Science. – 2017. – V. 1, No. 1. – P. 38–46.

Farr D.R., Cain R.B. Catechol oxygenase induction in *Pseudomonas aeruginosa* // Biochem. J. – 1968. – V. 106. – P. 879–885.

Solyanikova I.P., Borzova O.V., Emelyanova E.V. Kinetics of interaction between substrates/substrate analogs and benzoate 1,2-dioxygenase from benzoate-degrading

Rhodococcus opacus 1CP // Folia Microbiol. – 2017. – V. 62, Is. 4. – P. 355–362.

Solyanikova I.P., Emelyanova E.V., Borzova O.V., Golovleva L.A. Benzoate degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP after a dormancy: characterization of dioxygenases involved in the process // J. Environm. Sci. Health. – 2016. – Part B. – V. 51, No. 3. – P. 182–191.

Solyanikova I.P., Emelyanova E.V., Shumkova E.S., Egorova D.O., Korsakova E.S., Plotnikova E.G., Golovleva L.A. 2015. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria // Intern. Biodeterioration and Biodegradation. – 2015. – V. 100. – P. 155–164.

RESPONSES OF INTACT AND IMMOBILIZED BACTERIAL CELLS TO BENZOATE AND ITS ANALOGS

E.V. Emelyanova, I.P. Solyanikova

G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, elenvem@ibpm.pushchino.ru, innas@ibpm.pushchino.ru

Abstract. Comparison of responses of intact freshlyharvested and immobilized resting cells of actinobacteria to benzoate and its analogs was undertaken in order to develop further the method of detection of the benzoate 1,2-dioxygenase (BDO) activity and evaluation of benzoate transport into bacterial cells. It has been shown that the response of intact actinobacterial cells to benzoate characterizes the activity of inducible BDO and the response of immobilized cells (under specified conditions) serves as an estimation of benzoate transport into the cell.

Keywords: *Rhodococcus opacus*, *Gordonia polyisoprenivorans*, intact and immobilized cells, benzoate and its analogs