

УДК 620.193.8

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ В ИЗУЧЕНИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЙОДНИТРОТЕТРАЗОЛИЯ ХЛОРИДА В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

А.А. Калинина\*, А.С. Македошин, С.Ю. Радостин, Н.В. Гурский,  
Т.Н. Соколова, **В.Р. Карташов**

(Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева,  
кафедра нанотехнологии и биотехнологии; \*e-mail: 777aleksa777\_87@mail.ru)

Установлено, что восстановление йоднитротетразолия хлорида в присутствии бактерий *Bacillus subtilis*, суспензированных в физиологическом растворе, может быть описано уравнениями химической кинетики. Определены эффективные кинетические параметры и выявлена роль диффузии йоднитротетразолия хлорида при его восстановлении с участием клеточных компонентов бактерий.

**Ключевые слова:** эффективные кинетические параметры, бактерии, йоднитротетразолия хлорид, диффузия.

Соли тетразолия, в частности йоднитротетразолия хлорид (2-(4-йодфенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенил-2Н-тетразолия хлорид, ИНТ), нашли широкое применение в изучении живых объектов благодаря способности одноступенчато восстанавливаться до окрашенных продуктов моноформазапов [1–3]. Известно, что восстановление солей тетразолия протекает внутриклеточно [4–5], при этом большинство исследователей связывают этот процесс с активностью компонентов, обеспечивающих биоэнергетику клетки. По этой причине восстановление солей тетразолия широко используется для определения жизнеспособности клеток в гистохимии, экологии, океанологии, микробиологии, цитологии и биохимии [6–10]. Нами была предпринята попытка выявить симбатность между скоростью восстановления ИНТ при участии ряда бактерий, суспензированных в физиологическом растворе, и их коррозионной активностью по отношению к цинку [11]. Однако на восстановление солей тетразолия могут оказывать влияние не только клеточные компоненты, но и другие факторы, в частности диффузия реагента в клетку, что необходимо учитывать при использовании солей тетразолия в биологических исследованиях.

Цель настоящей работы состояла в определении эффективных кинетических характеристик восстановления ИНТ клеточными компонентами бактерий *Bacillus subtilis*, суспензированных в физиологическом растворе, для выявления в этом процессе роли диффузии.

### Экспериментальная часть

В качестве тест-организмов использовали музейный штамм бактерий *Bacillus subtilis* (Всероссийская коллекция микроорганизмов, г. Пушкино, Московская обл.) как наиболее распространенный в природе и сохраняющий свою идентичность длительное время.

Методика кинетического эксперимента состояла в следующем: проводили смыв суточной бактериальной культуры со скошенного мясопептонного агара (МПА) физиологическим раствором (0,9%-й водный раствор хлорида натрия), довели до получения оптической плотности  $0,45 \pm 0,05$  (670 нм), что обеспечивает в пределах ошибки одинаковое число клеток в единице физиологического раствора. Затем к 32 мл бактериальной суспензии в стерильных условиях добавляли 2 мл 1,0 мМ водного раствора ИНТ и выдерживали в термостате при температуре эксперимента. По истечении определенного времени 5 мл реакционной смеси отбирали в пробирку, содержащую 0,1 мл раствора лизоцима ( $C = 0,2$  мг/л). Проведение обработки реакционной смеси после завершения восстановления вызвано необходимостью разрушить клеточную стенку бактерий для облегчения извлечения продукта йодмоноформаза (ИМФ). Спустя 30 с смесь экстрагировали этилацетатом. К экстракту добавляли 0,1 мл 10%-го раствора гидроксида натрия, чтобы избежать ошибки спектрофотометрического определения концентрации ИМФ вследствие проявления таутомерии. Только после добавления NaOH максимум в спектре

оптического поглощения достигался при характерной длине волны 490 нм. Через 20 с в реакционную смесь добавляли свежепрокаленный хлорид кальция в количестве 2–3 г и выдерживали в течение 1 мин, после фильтрования проводили спектрофотометрический анализ в кюветах толщиной 1 см при длине волны 490 нм, характерной для продукта восстановления – йодмоноформаза. Коэффициент экстинкции определяли экспериментально по линейной зависимости оптической плотности от концентрации ИМФ. Его величина, равная  $1,9 \cdot 10^4$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, согласуется с литературными данными [3].

При определении концентрации ИНТ реакционную смесь центрифугировали в течение 5 мин (частота вращения 2000 об/мин), жидкую часть после отделения клеток отбирали в кюветы толщиной 0,1 см и анализировали спектрофотометрически при длине волны 249 нм. Коэффициент экстинкции определяли по линейной зависимости оптической плотности от концентрации ИНТ. Величина, равная  $3,6 \cdot 10^4$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, согласуется с данными других исследователей [3].

При изучении влияния воды на кинетику восстановления ИНТ к 27 и 32 мл смеси бактериальной суспензии и ИНТ в стерильных условиях добавляли 7 и 2 мл воды соответственно, число клеток в исходной смеси контролировали по оптической плотности. После чего образцы выдерживали в термостате при температуре эксперимента.

Текущие концентрации ИНТ и ИМФ определяли по результатам 5–6 независимых опытов, используя значения оптической плотности и экспериментально определенные коэффициенты экстинкции, среднеквадратичная ошибка определения составила 10–15%.

**Приборы и материалы.** Спектры регистрировали на спектрофотометре «2802 UV/Vis Unicо». Исследования с применением культуры бактерий проводили в термостате марки «ТС-1/80

СПУ». Йоднитротетразолий (95%, «Aldrich»), йодмоноформазан (crystalline, «Sigma»), лизоцим (препарат «Лизобакт» Bosnalijek) этилацетат марки «ч.д.а.» использовали в виде коммерческих препаратов.

### Результаты и их обсуждение

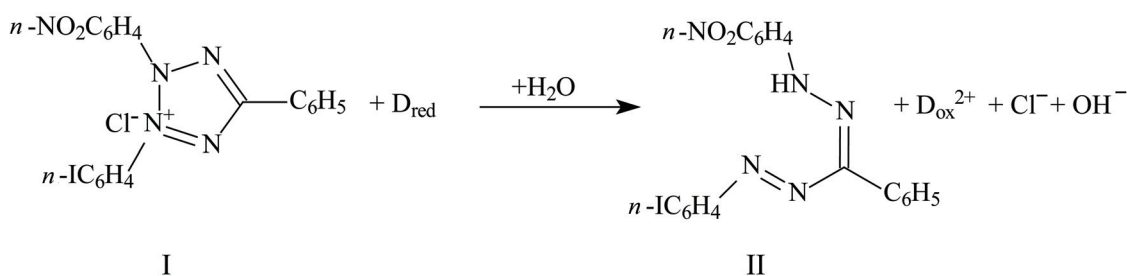
Восстановление ИНТ (I) протекает по известной реакции [3] (схема).

Как установлено к настоящему времени, в качестве восстановителей (D) ИНТ выступают аэробные дегидрогеназные комплексы и вещества хиноновой природы, входящие в состав клеточной мембраны бактерий [12–14].

Скорость восстановления определяли спектрофотометрически по накоплению продукта йодмоноформаза (II). Поскольку ИМФ имеет интенсивную окраску с максимумом поглощения при длине волны 490 нм, то удобнее и проще в экспериментальном плане определять именно оптическую плотность продукта восстановления (лишь в единичных случаях эффективные кинетические параметры независимо определяли по убыли ИНТ). Графически экспериментальные данные зависимости текущей концентрации реагента и продукта от времени реакции, полученные в независимых опытах, представлены на рис. 1, а и 2, а.

При анализе экспериментальных зависимостей мы обращали внимание на то, что кинетика восстановления описывается экспоненциальным законом до степени конверсии 75–80%. При увеличении времени экспонирования бактерий в условиях эксперимента зависимости, представленные на рис. 1, а и 2, а, переходят в плато, что может свидетельствовать об отсутствии 100%-го восстановления ИНТ в изучаемой системе. Основной причиной наблюдаемого явления может быть влияние ИМФ, связанного с мембранными компонентами клетки, на доставку реагента к сайтам восстановления.

### С х е м а



D – донор электронов биогенной природы соответственно в восстановленной ( $\text{D}_{\text{red}}$ ) и окисленной ( $\text{D}_{\text{ox}}$ ) формах

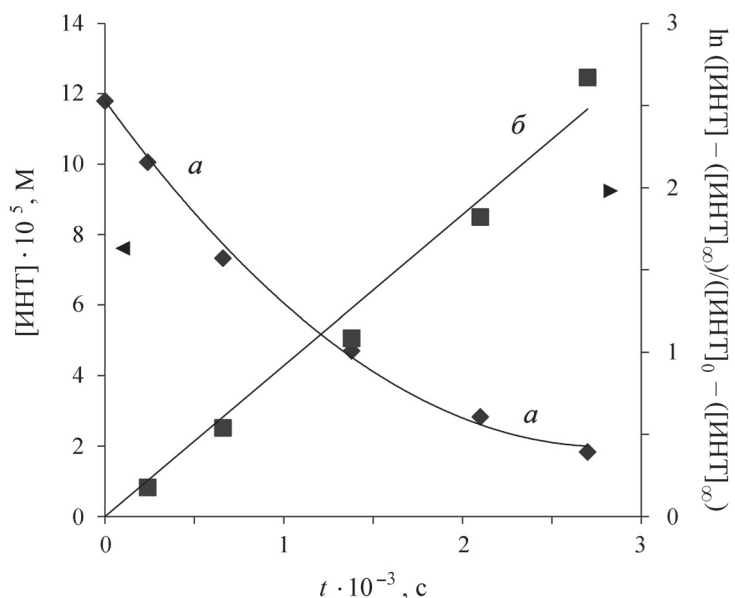


Рис. 1. Кинетическая кривая восстановления соли йоднитротетразолия хлорида в присутствии бактерий *Bacillus subtilis*, суспензированных в физиологическом растворе (а) и ее анаморфоза в координатах  $\ln ([\text{ИНТ}] - ([\text{ИНТ}]_{\infty}) / ([\text{ИНТ}]_0 - ([\text{ИНТ}]_{\infty})) = f(t)$  (б) ( $[\text{ИНТ}]_0 = 1,18 \cdot 10^{-4}$  моль/л;  $[\text{ИНТ}]_{\infty} = 1,7 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  $T = 37$  °С,  $y = 9,18 \cdot 10^{-4}x$ ,  $R^2 = 0,9787$ )

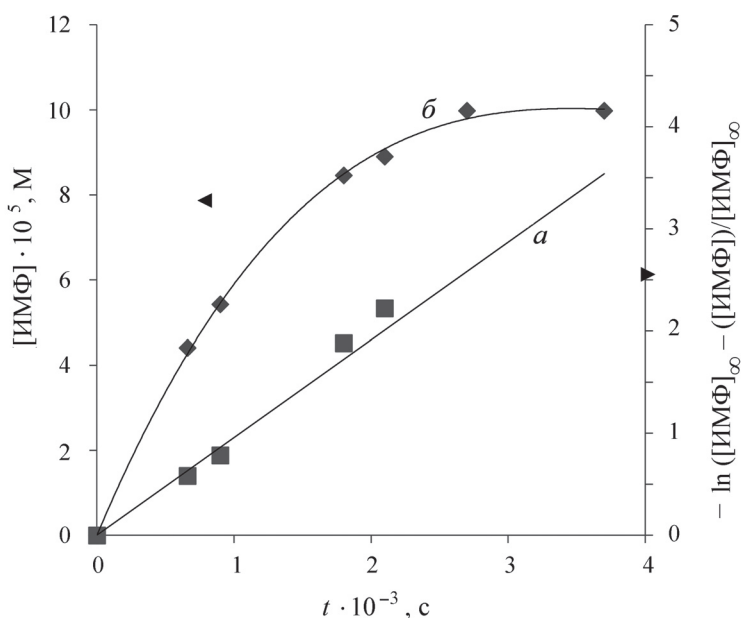


Рис. 2. Кинетическая кривая накопления йодмоноформаза в присутствии клеток бактерий *Bacillus subtilis* (а) и ее анаморфоза в координатах  $\ln ([\text{ИМФ}]_{\infty} - ([\text{ИМФ}]) / [\text{ИМФ}]_{\infty} = f(t)$  (б) ( $[\text{ИНТ}]_0 = 1,18 \cdot 10^{-4}$  моль/л;  $[\text{ИМФ}]_{\infty} = 9,98 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  $T = 37$  °С,  $y = 9,57 \cdot 10^{-4}x$ ,  $R^2 = 0,9751$ )

Эффективную константу скорости восстановления ИНТ определяли с помощью линейной анаморфозы кинетики первого порядка:

$$\ln ([\text{ИНТ}] - ([\text{ИНТ}]_{\infty}) / ([\text{ИНТ}]_0 - ([\text{ИНТ}]_{\infty})) = kt,$$

или

$$\ln ([\text{ИМФ}]_{\infty} - ([\text{ИМФ}]) / [\text{ИМФ}]_{\infty} = -kt.$$

Как видно из зависимостей, представленных на рис. 1, б и 2, б, линейные анаморфозы кинетики первого порядка выполняются удовлетворительно. Эффективные константы скорости, рассчитанные по угловому коэффициенту, равны  $9,18 \cdot 10^{-4}$  и  $9,57 \cdot 10^{-4} \cdot \text{с}^{-1}$  соответственно. Среднее значение  $k_{\text{эф}}$  по результа-

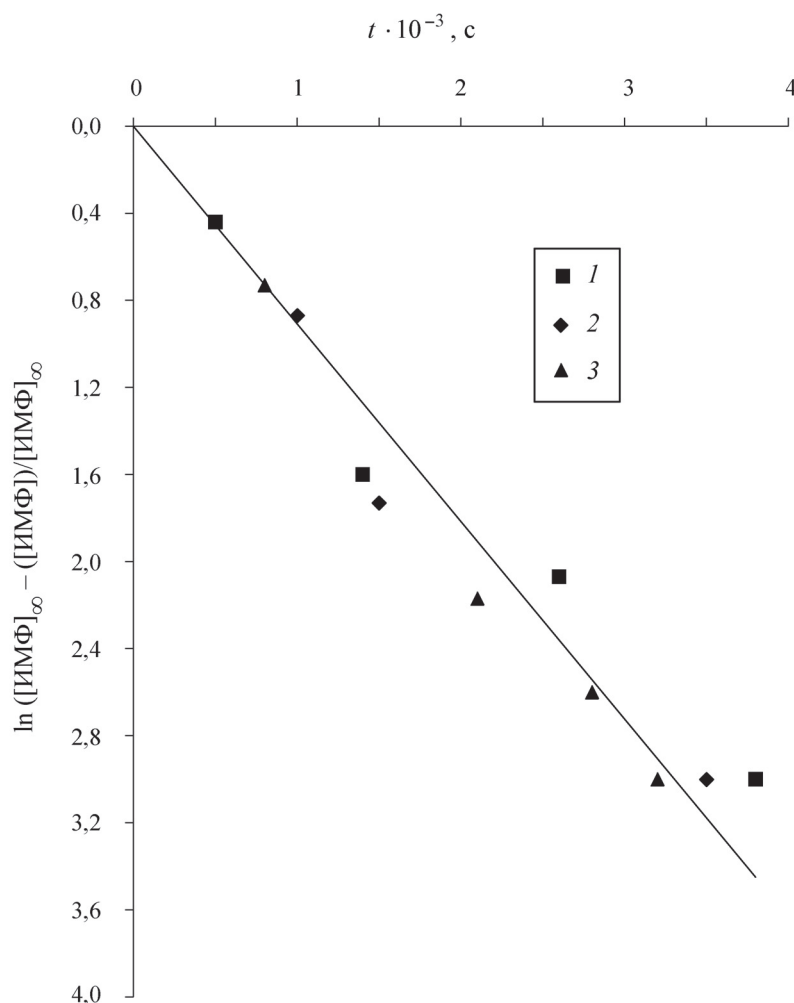


Рис. 3. Анаморфозы кинетики первого порядка реакции образования йодмонофлуоридана при участии бактерий *Bacillus subtilis* ( $[ИНТ]_0 = 8,49 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  $[ИМФ]_{\infty} = 7,90 \cdot 10^{-5}$  моль/л; при температуре, °С: 1 – 31, 2 – 34, 3 – 37;  $y = -9,08 \cdot 10^{-4}x$ ,  $R^2 = 0,9812$ )

там шести экспериментов при 37 °С составило  $(9,31 \pm 0,75) \cdot 10^{-4} c^{-1}$ .

В области температур, оптимальных для жизнедеятельности *Bacillus subtilis*, обнаружено отсутствие зависимости  $k_{эф.}$  от температуры (таблица, рис. 3). Малые значения  $k_{эф.}$ , не согласующиеся с механизмом химического восстановления ИНТ компонентами мембраны клетки, однозначно свидетельствуют о том, что простые уравнения химической кинетики лишь формально описывают сложный процесс с участием живых объектов. Исходя из полученных кинетических данных, можно сделать предположение о диффузионном контроле восстановления ИНТ. Для выяснения роли диффузии ИНТ из внеклеточного пространства в клетку определяли зависимость начальной скорости восстановления ИНТ от его начальной концентрации, используя

дифференциальный метод. При условии, что в начальный момент времени выполняется первый закон Фика, можно считать, что начальная скорость восстановления ИНТ должна линейно зависеть от концентрации реагента и отражать скорость диффузии реагента в клетку. В частности, линейная зависимость в координатах  $V_0 = f(C_0)$  широко используется в биологических экспериментах как признак пассивной диффузии [15]. Из рис. 4, а видно, что в координатах  $V_0 = f(ИНТ_0)$ , действительно, выполняется линейная зависимость.

Для обнаружения этой зависимости использовали максимально возможный концентрационный диапазон ИНТ ( $1,47 \cdot 10^{-5} - 20 \cdot 10^{-5}$  моль/л). Эксперимент лимитировался концентрацией ИНТ, равной  $20 \cdot 10^{-5}$  моль/л. При более высоких концентрациях затруднялась десорбция продук-

Т а б л и ц а 1

**Кинетика накопления продукта ИМФ в области температур, оптимальных для жизнедеятельности бактерий *Bacillus subtilis* ( $[ИНТ]_0 = 8,49 \cdot 10^{-5}$  моль/л)**

[ИМФ] = f(t)	T, °C											[ИМФ] ∞ (M)
	31			34				37				
t · 10 <sup>-3</sup> , с	1,0	1,5	3,5	0,8	2,1	2,8	3,2	0,5	1,4	2,4	3,7	∞
[ИМФ] · 10 <sup>5</sup> , M	4,6	6,5	7,5	4,1	7,0	7,3	7,5	2,8	6,3	7,1	7,5	7,9

та с клеточной стенки бактерий, что приводило к искажению экспериментальных данных.

Косвенным подтверждением диффузионного контроля восстановления ИНТ могут быть, на наш взгляд, результаты исследования влияния добавок воды к физиологическому раствору на начальную скорость. В работе использовали соотношения воды и физиологического раствора, равные 2:32 и 7:27. Увеличение соотношения могло привести к нарушению изотоничности внеклеточной и клеточной среды.

Как видно из структуры I (схема), ИНТ высокополярная молекула, которая в водной среде хорошо сольватируется, в том числе и до сво-

бодносольватированного катиона. Известно, что биомембраны клеток имеют липидную природу, затрудняющую диффузию в клетку ионов. Гидратация ИНТ приводит к экранированию заряда, вследствие чего при добавлении воды происходит увеличение начальной скорости, практически не зависящее от соотношения воды и физиологического раствора (рис. 4, б). Данные, представленные на рис. 5, подтверждают низкую чувствительность реакции к температуре.

При анализе кинетических данных сделаем приближение, что сложный процесс транспорта ИНТ к клеточным сайтам восстановления, включающий физическую адсорбцию реагента

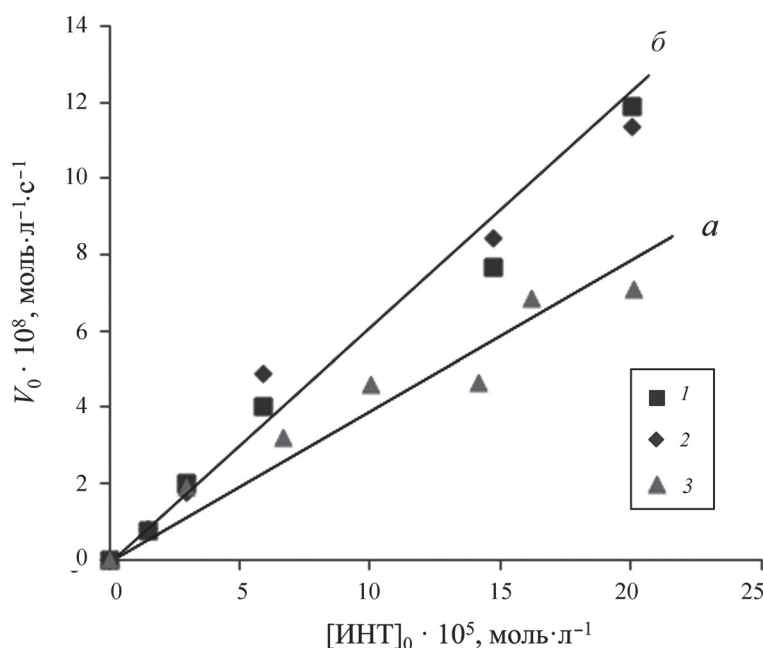


Рис. 4. Зависимость начальной скорости восстановления ИНТ от его начальной концентрации: а – восстановление ИНТ в присутствии бактерий, суспензированных в физиологическом растворе; б – восстановление ИНТ с добавлением воды (мл): 1 – 7; 2 – 2; 3 – без добавления воды

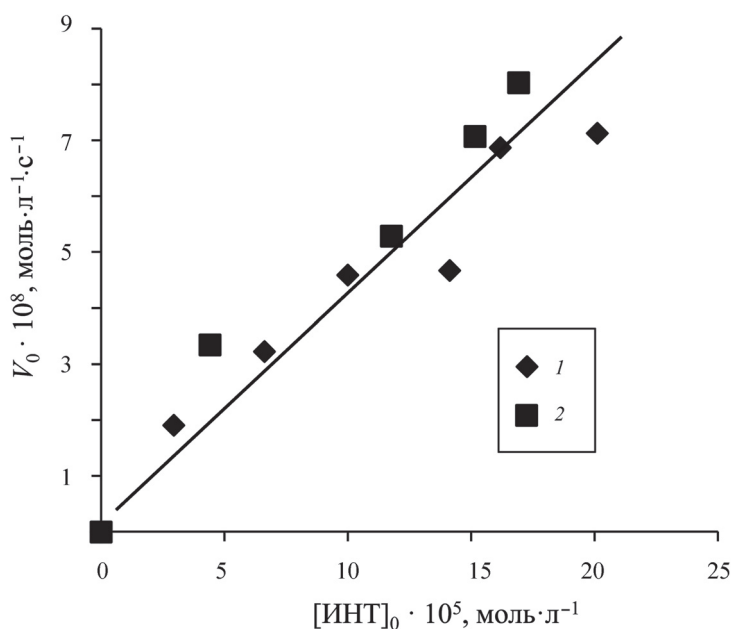
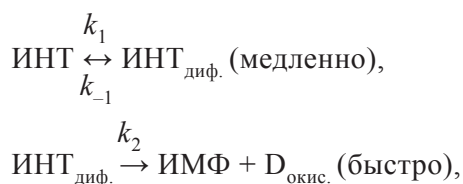


Рис. 5. Зависимость начальной скорости восстановления ИНТ от его начальной концентрации при температуре эксперимента 37 °С (1) и 41 °С (2)

на клеточной стенке, диффузию через муреиновую клеточную стенку, периплазматическое пространство, плазмалемму, можно охарактеризовать некоторыми условными константами  $k_1$  и  $k_{-1}$ . При достижении реагентом сайтов восстановления быстро протекает непосредственно химическая реакция. Тогда можно предложить следующую схему:



где  $\text{ИНТ}_{\text{диф.}}$  – количество реагента, которое протифундировало из внеклеточной среды к цитозольной стороне биомембраны, на которой локализованы восстановители  $[\text{D}]_{\text{вос.}}$ ,  $k_2$  – константа скорости быстрой стадии, равная  $k'_2 \cdot [\text{D}]_{\text{вос.}}$  (считая, что  $[\text{D}]_{\text{вос.}}$  поддерживается на постоянном уровне в функционирующей клетке).

При условии, что  $k_2 \gg k_{-1}$ , применяем метод квазистационарных концентраций к  $\text{ИНТ}_{\text{диф.}}$ :

$$\begin{aligned} d[\text{ИНТ}]_{\text{диф., кваз.}}/dt &= k_1[\text{ИНТ}] - \\ &- k_{-1}[\text{ИНТ}]_{\text{диф., кваз.}} - k_2[\text{ИНТ}]_{\text{диф., кваз.}} \approx 0, \end{aligned}$$

откуда

$$[\text{ИНТ}]_{\text{диф., кваз.}} = k_1[\text{ИНТ}]/(k_{-1} + k_2),$$

тогда

$$V = k_2[\text{ИНТ}]_{\text{диф., кваз.}} = k_1 \cdot k_2[\text{ИНТ}]/(k_{-1} + k_2).$$

Введя обозначение  $k_{\text{эф.}} = k_1 \cdot k_2/(k_{-1} + k_2)$ , получим в терминах начальной скорости

$$V_0 = k_{\text{эф.}}[\text{ИНТ}]_0.$$

Полученное соотношение согласуется с линейными зависимостями, представленными на рис. 4, 5, и подтверждает возможность описания экспериментальных данных по линейной анаморфозе кинетики первого порядка, рис. 1, б и 2, б.

Таким образом, показано, что методы химической кинетики могут быть использованы в решении отдельных задач в биологических системах. Несмотря на сложность объекта исследования, были получены простые уравнения химической кинетики, описывающие скорость восстановления ИНТ. На основе эффективных кинетических параметров, полученных методом начальных скоростей, показано, что определяющую роль в процессе играет диффузия реагента в клетку, что необходимо иметь в виду при использовании этого реагента для качественной и/или количественной оценки жизнеспособности клеток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nineham A. W.* // *Chern. Rev.* 1955. Vol. 55. P. 355.
2. *Schiele C., Halfar K., Arnold G.* // *Tetrahedron.* 1967. Vol. 23. P. 2693.
3. *Seidler E.* *The Tetrazolium-Fonnazan System: Design and Histochemistry* N.Y., Stuttgart, 1991.
4. *Van Noorden C.J.F.* // *Histochem. J.* 1988. Vol. 20. N 10. P. 587.
5. *Thom S. M., Horobin R.W., Seidler E. et al.* // *J. Appl. Bacteriol.* 1993. Vol. 74. P. 433
6. *Chung Y.-C., Neethling J. B.* // *J. Water Pollut. Control Fed.* 1989. Vol. 61. N 3. P. 343.
7. *Hernandez M. T., Miller S. L., Landfear D. W. et al.* // *Aerosol Sci. Technol.* 1999. Vol. 30. P. 145.
8. *Rodriguez G. G., Phipps D., Ishiguro K. et al.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. Vol. 58. N 6. P. 1801.
9. *Servais P., Billen G., Bouillot P. et al.* // *Aqua.* 1992. Vol. 41. N 3. P. 163.
10. *Yu W., Dodds W. K. et al.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61. N 9. P. 3367.
11. *Радостин С.Ю., Калинина А.А., Македошин А.С. и др.* // *Коррозия: материалы, защита.* 2015. № 11. С. 45.
12. *Smith J.J., McFeters G.A.* // *J. Microbiol. Meth.* 1997. Vol. 29. P. 161.
13. *Imlay J.A.* // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. N 34. P. 19767.
14. *Mattson A.M., Jensen C.O., Dutcher R.A.* // *Science.* 1947. Vol. 106. P. 294.
15. *Ленгелер Й., Древис Г., Шлегель У.* *Современная микробиология: Прокариоты.* М., 2005.

Поступила в редакцию 15.03.18

После доработки 01.04.18

Принята к публикации 05.09.18

## APPLICATION OF THE METHODS OF CHEMICAL KINETICS IN THE STUDY OF THE RESTORATION OF IODONITROTETRAZOLIUM CHLORIDE BY BACTERUS BACTERIA CELLS *BACILLUS SUBTILIS*

A.A. Kalinina\*, A.S. Makedoshin, S.Yu. Radostin, N.V. Gursky, T.N. Sokolova,

V.R. Kartashov

(*Nizhny Novgorod State Technical University n.a. R.E. Alekseev;*

\*e-mail: 777aleksa777\_87@mail.ru)

**It was found that the reduction of iodonitrotetrazolium chloride by suspension in a physiological solution of *Bacillus subtilis* bacteria can be described by the equations of chemical kinetics. The activation parameters were determined and the role of diffusion of iodonitrotetrazolium chloride upon its reduction by bacteria was revealed.**

**Key words:** kinetics, bacteria, iodonitrotetrazolium chloride, activation parameters, diffusion.

**Сведения об авторах:** *Калинина Александра Александровна* – доцент кафедры нанотехнологии и биотехнологии Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексева, канд. хим. наук (777aleksa777\_87@mail.ru); *Македошин Александр Сергеевич* – аспирант кафедры нанотехнологии и биотехнологии Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексева (biotechno@nntu.ru); *Радостин Станислав Юрьевич* – доцент кафедры нанотехнологии и биотехнологии Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексева, канд. хим. наук (biotechno@nntu.ru); *Гурский Николай Васильевич* – магистрант кафедры нанотехнологии и биотехнологии Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексева (biotechno@nntu.ru). *Соколова Татьяна Николаевна* – профессор кафедры нанотехнологии и биотехнологии Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексева, докт. хим. наук (biotechno@nntu.ru).