

УДК 620.193.8

ИНГИБИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* КАК КРИТЕРИЙ УЧАСТИЯ ФЕРМЕНТА В ВОССТАНОВЛЕНИИ ЙОДНИТРОТЕТРАЗОЛИЯ ХЛОРИДА – ИНДИКАТОРА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

А.А. Калинина*, Н.В. Гурский, С.С. Сычев, Т.Н. Соколова

(Нижегородский государственный технический университет им. П.Е. Алексеева, кафедра «Нанотехнологии и биотехнологии»; *e-mail: himkalinina@mail.ru)

Показано, что после диффузии соли тетразолия к мембранным восстановителям клеток бактерии *Bacillus subtilis*, на скорость восстановления оказывает влияние состояние фермента сукцинатдегидрогеназы. По зависимости начальной скорости восстановления йоднитротетразолия хлорида клеточными компонентами *Bacillus subtilis* от концентрации малоновой кислоты определена количественно константа конкурентного ингибирования внутриклеточного фермента сукцинатдегидрогеназы.

Ключевые слова: бактерии, йоднитротетразолия хлорид, кинетика, ингибирование, малоновая кислота, фермент сукцинатдегидрогеназа.

Многолетний опыт использования солей тетразолия в качестве индикаторов жизнеспособности клеток основан на образовании за счет их неселективного восстановления клеточными компонентами интенсивно окрашенных продуктов – формазанов [1, 2]. Вследствие простоты и доступности методы с использованием тетразолиевых индикаторов получили широкое распространение, однако они дают погрешность, часто высокую, поскольку отдельные микроорганизмы, например из числа бактерий, могут не проявлять к тетразолиям восстановительной способности [3–5].

В работах [6–8] при использовании йоднитротетразолия хлорида (ИНТ) показано, что одной из главных причин низкой скорости восстановления ИНТ может быть затрудненная диффузия реагента в клетку, обусловленная строением клеточной стенки бактерий. Так, было установлено, что удельная скорость восстановления ИНТ клеточными компонентами грамположительных бактерий более чем на порядок превышает $k_{эф}$ в экспериментах с грамотрицательными бактериями [7, 8].

Вместе с тем восстановление солей тетразолия большинство исследователей связывают исключительно с активностью мембранных доноров электронов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах, обеспе-

чивающих жизненную активность аэробных микроорганизмов [9, 10]. Важное значение имеет работа [11], в которой при использовании неповрежденных клеток и обратных мембранных везикул штамма бактерии *E. coli* K-12 было установлено, что донорами электронов восстановления солей тетразолия служат дегидрогеназные комплексы электронно-транспортной системы клетки, промежуточные переносчики электронов хиноновой природы, а в некоторых случаях продукт биотрансформации кислорода – супероксидный анион. Химическая природа мембранных сайтов восстановления ИНТ установлена путем их ингибирования. Именно благодаря этому приему однозначно доказано участие в восстановительном процессе фермента сукцинатдегидрогеназы. Более того, в работе [11] сделано уточнение, что клеточными восстановителями являются флавиновые коферменты дегидрогеназ. Все исследования в работе проведены на качественном уровне по наличию или отсутствию отклика на введение различных ингибиторов, в том числе и малоновой кислоты (МК).

Как показали результаты [6, 7], только при отсутствии диффузионных затруднений, когда реагент достигает клеточной мембраны, определенную роль в восстановлении солей тетразолия начинают играть мембранные компоненты.

Особенно наглядны в этом отношении результаты восстановления ИНТ суспензией грамотрицательных бактерий *E. coli*. Почвенная бактерия не проявляла восстановительной способности на протяжении предельно допустимого времени экспозиции в физиологическом растворе (7–8 ч), в то время как лиофилизованная бактерия *E. coli*, выделенная из препарата производства «ИмБио», восстанавливала ИНТ с эффективной константой скорости, равной $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Для вычленения ферментативного фактора в восстановительной способности бактерий по отношению к ИНТ в настоящей работе использованы грамположительные бактерии *Bacillus subtilis*, клеточная стенка которых не оказывает диффузионных затруднений ИНТ к сайтам восстановления. С учетом результатов работы [11] по участию в восстановлении ИНТ клеточной сукцинатдегидрогеназы вызывали эффект изменения скорости восстановления соли тетразолия добавлением в реакционную систему конкурентного ингибитора – малоновой кислоты.

Цель настоящей работы – опосредованное выявление активности внутриклеточной сукцинатдегидрогеназы бактерий *Bacillus subtilis*, суспензированных в физиологическом растворе, в процессе восстановления ИНТ через обратимое конкурентное ингибирование фермента. Ранее подобного рода кинетические исследования системы «соль тетразолия – бактерия *Bacillus subtilis*» не проводились.

Экспериментальная часть

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

Методика кинетического эксперимента описана в работах [6, 7]. В качестве ингибитора внутриклеточной сукцинатдегидрогеназы использовали малоновую кислоту («х.ч.»).

Смыв суточной бактериальной культуры с питательной среды физиологическим раствором (0,9%-й водный раствор хлорида натрия) доводили до оптической плотности $1 \pm 0,5$ (670 нм), после чего к смеси бактериальной суспензии *Bacillus subtilis* и малоновой кислоты с концентрацией 0,01 М в стерильных условиях добавляли 3,4 мл 1,0 мМ водного раствора соли тетразолия и выдерживали в термостате. По истечении определенного времени отбирали 5 мл

реакционной смеси в пробирку, содержащую 0,2 мл раствора лизоцима, который имел концентрацию 0,2 мг/л. Спустя 30 с смесь экстрагировали этилацетатом. Полученный раствор сушили хлоридом кальция, после фильтрования анализировали спектрофотометрическим методом в кюветах толщиной 1 см при длине волны 490 нм, характерной для продукта восстановления – йодформаза. Коэффициент экстинкции определяли по экспериментальной зависимости оптической плотности в спектре поглощения от концентрации ИМФ. Его величина, равная $1,9 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, согласуется с литературными данными [12].

Текущую концентрацию продукта восстановления ИНТ йодмоноформаза (ИМФ) определяли по результатам 5–6 независимых экспериментов, среднеквадратичная ошибка определения составила 10–15%.

Приборы и материалы. Спектры регистрировали на спектрофотометре «2802 UV/Vis Unico». Исследования с применением культуры бактерий проводили в термостате марки «ТС-1/80 СПУ». Йоднитротетразолия хлорид (95%, «Aldrich»), малоновую кислоту («х.ч.»), йодмоноформаза (crystalline, «Sigma»), лизоцим (препарат «Лизобакт», «Bosnalijek»), этилацетат («ч.д.а.») использовали в виде коммерческих препаратов.

Результаты и их обсуждение

Ранее было установлено, что восстановление ИНТ мембранными клеточными компонентами бактерий *Bacillus subtilis* может быть описано линейной анаморфозой реакции первого порядка [7]. При этом на основании принципов гомеостаза делалось допущение, что концентрация клеточного восстановителя D_{red} на протяжении всего кинетического эксперимента остается постоянной (схема 1).

Известно, что одним из доноров электронов при восстановлении солей тетразолия служит флавинадениндинуклеотид (ФАД), представляющий собой кофермент сукцинатдегидрогеназы – ключевого мембранного фермента, окисляющего янтарную кислоту (сукцинат), последняя является промежуточным метаболитом на пути расщепления питательных веществ (углеводов, жирных кислот, некоторых аминокислот) в фумаровую кислоту (фумарат) [11] (схема 2). Вместе с тем фермент может обратимо и конкурентно ингибироваться малоновой кислотой (малонатом), структура кото-

Схема 1

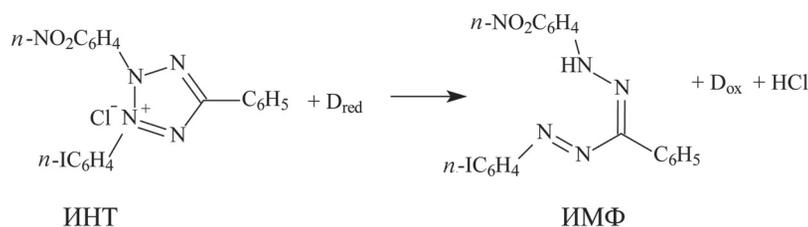


Схема 2



рой ($\text{COO}^- - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$) очень близка к структуре сукцината.

Вышеприведенные общие сведения мы использовали в настоящей работе при изучении воздействия малоната на внутриклеточную сукцинатдегидрогеназу *Bacillus subtilis*. Ингибирование внутриклеточной сукцинатдегидрогеназы, как и следовало ожидать, привело к снижению скорости восстановления ИНТ.

Опыты ограничивались определением начальной скорости v_0 . Начальную скорость накопления продукта определяли по тангенсу угла наклона линейного участка кинетической кривой, построенной в координатах $[\text{ИМФ}]_t = f(t)$ при конверсии 4,5–7,5%. В таблице представлены кинетические данные по влиянию ингибитора на начальную скорость восстановления ИНТ.

Полученные кинетические данные были рассмотрены с использованием схемы Михаэлиса–Ментен в предположении, что в реакциях участвует ИНТ, который диффундировал к сукцинатдегидрогеназе (E). При этом предполагается,

что фермент образует активный промежуточный фермент – субстратный комплекс (ES, субстрат – сукцинат), превращающийся в продукт, а с ингибитором обратимо образует (константа ингибирования K_i) неактивный комплекс EI (I – ингибитор малонат), при этом часть фермента через взаимодействие кофермента в восстановленной форме с ИНТ переводится в нефункциональную форму E' вследствие влияния на пространственную структуру фермента не растворимого в воде ИМФ. Следует отметить, что с субстратом и ингибитором взаимодействует фермент, содержащий окисленную форму кофермента. Однако в результате биохимических процессов активный центр фермента возвращается в исходное состояние за счет окисления кофермента клеточными окислителями. В результате период полураспада фермента согласуется с жизненным циклом бактерий. Используемый в реакции ИНТ является конкурентом с клеточными метаболитами за окисление кофермента. Поскольку в рамках настоящей работы невозможно оценить вклад различных окислителей в

Влияние концентрации малоновой кислоты на начальную скорость восстановления ИНТ ($T = 37^\circ\text{C}$)

[ИНТ] ₀ = 1,0 · 10 ⁻⁴ М								
[МК] · 10 ⁵	0	1,47	2,90	5,00	5,86	7,33	8,8	10,2
$v_0 \cdot 10^8, \text{M} \cdot \text{c}^{-1}$	3,93±0,41	2,99±0,31	1,88±0,24	1,76±0,14	1,61±0,08	1,85±0,26	1,49±0,22	1,15±0,11
[ИНТ] ₀ = 5,88 · 10 ⁻⁵ М								
[МК] · 10 ⁵	0	1,40	2,90	5,00	5,88	8,80	10,00	
$v_0 \cdot 10^8, \text{M} \cdot \text{c}^{-1}$	2,38±0,26	1,77±0,11	1,18±0,15	0,95±0,08	1,07±0,13	0,74±0,08	0,68±0,08	

функционирование сукцинатдегидрогеназы, то в представленной кинетической схеме фермент, участвующий в образовании комплексов ES, EI и взаимодействующий с ИНТ, обозначен как E (схема 3).

Таким образом,

$$v_0 = k_4[\text{ИНТ}]_0[E],$$

где [E] – концентрация фермента, не связанного ни в один из комплексов.

Применяя к активному комплексу ES метод квазистационарных концентраций, имеем:

$$d[\text{ES}]/dt = k_1[\text{S}][\text{E}] - k_{-1}[\text{ES}] - k_2[\text{ES}] \approx 0,$$

откуда

$$[\text{EI}] = K_i^{-1}[\text{I}][\text{E}].$$

Из выражения для константы ингибирования

$$K_i = ([\text{I}][\text{E}]) / [\text{EI}]$$

имеем

$$[\text{EI}] = K_i^{-1}[\text{I}][\text{E}].$$

По условию материального баланса внутриклеточная концентрация сукцинатдегидрогеназы будет равна:

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}]$$

или

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + K_M^{-1}[\text{S}][\text{E}] + K_i^{-1}[\text{I}][\text{E}],$$

откуда

$$[\text{E}] = \frac{[\text{E}]_0}{1 + K_M^{-1}[\text{S}] + K_i^{-1}[\text{I}]}.$$

Тогда начальная скорость будет равна

$$v_0 = \frac{k_4[\text{ИНТ}]_0[\text{E}]_0}{1 + K_M^{-1}[\text{S}]_0 + K_i^{-1}[\text{I}]} \quad (1)$$

Поскольку концентрацию клеточного метаболита сукцината ($[\text{S}]_0$) в рамках поставленной кинетической задачи определить не представля-

ется возможным, то для анализа уравнения (1) используем координаты Диксона [13]:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1 + K_M^{-1}[\text{S}]_0}{k_4[\text{ИНТ}]_0[\text{E}]_0} + \frac{K_i^{-1}}{k_4[\text{ИНТ}]_0[\text{E}]_0}[\text{I}]$$

или

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [\text{S}]_0}{K_M k_4[\text{ИНТ}]_0[\text{E}]_0} + \frac{K_i^{-1}}{k_4[\text{ИНТ}]_0[\text{E}]_0}[\text{I}] \quad (2)$$

Так как клетки функционируют в условиях их суспензирования в физиологическом растворе, то можно сделать допущение, что сукцинат образуется только за счет резервов клетки, поэтому $[\text{S}]_0 \ll K_M$. Тогда, пренебрегая $[\text{S}]_0$ в числителе первого слагаемого уравнения (2), имеем:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{k_4[\text{ИНТ}]_0[\text{E}]_0} + \frac{K_i^{-1}}{k_4[\text{ИНТ}]_0[\text{E}]_0}[\text{I}] \quad (3)$$

В соответствии с уравнением (3) в координатах Диксона $1/v_0 = f([\text{I}])$ должна выполняться линейная зависимость. Как видно из рисунка, линейные зависимости выполняются удовлетворительно.

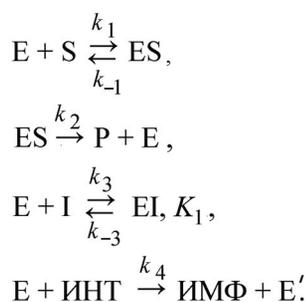
Отрезок, отсекаемый от оси абсцисс продолжениями линейных зависимостей, представляет собой константу ингибирования (K_i) фермента сукцинатдегидрогеназы ингибитором – малонатом. В соответствии с данными, представленными на рисунке, $K_i = 3,9 \cdot 10^{-5}$ М.

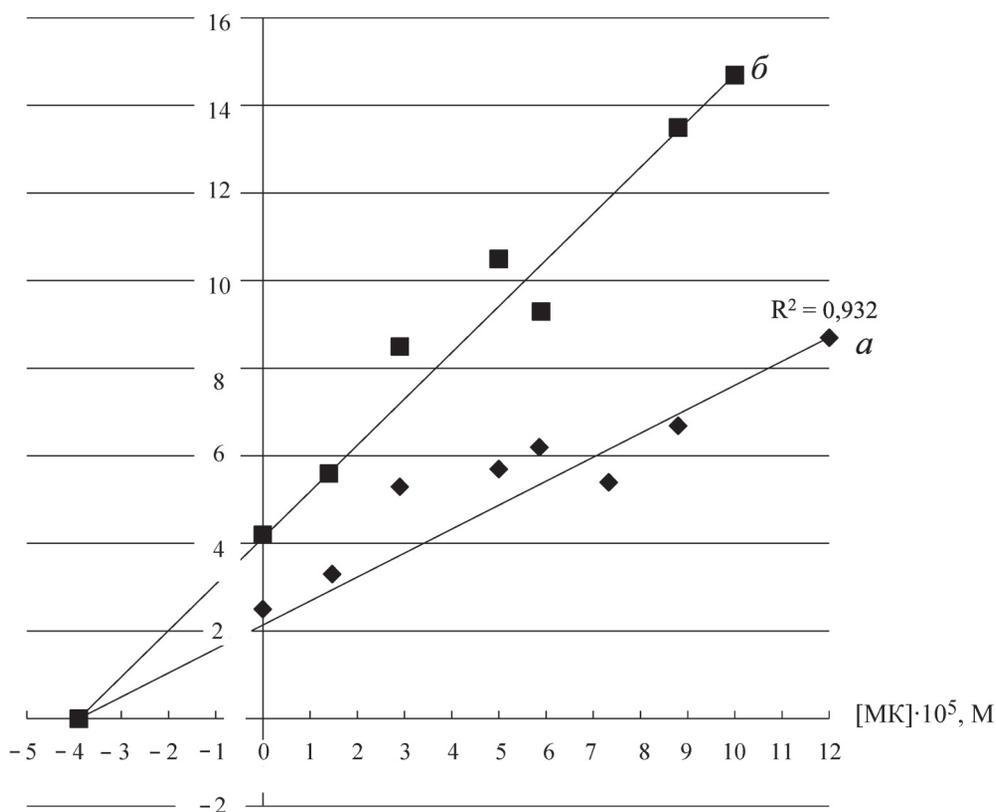
Отрезок, отсекаемый по оси ординат, как и тангенс угла наклона линейной зависимости в координатах Диксона, зависит от начальной концентрации ИНТ.

Следует отметить удовлетворительное соответствие значения $k_4[\text{E}]$, определенного в независимых экспериментах (рисунок), равного $4,00 \cdot 10^{-4}$ М·с⁻¹ при концентрации ИНТ, равной $1,0 \cdot 10^{-4}$ М и $4,04 \cdot 10^{-4}$ М·с⁻¹ при $[\text{ИНТ}] = 5,88 \cdot 10^{-5}$ М.

Таким образом, полученные данные показывают, что после диффузии соли тетразолия к мембранным восстановителям, на скорость восстановления оказывает влияние состояние клеточного фермента сукцинатдегидрогеназы. Впервые показано, что кинетика восстановления ИНТ позволяет количественно определить константу обратимого конкурентного ингибирования малоновой кислотой внутриклеточной сукцинатдегидрогеназы бактерий. Следует отметить, что значение константы ингибирования внутриклеточной сукцинатдегидрогеназы бактерий *Bacillus subtilis* соизмерима со значени-

С х е м а 3





Зависимость $1/v_0 = f([\text{МК}])$, $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$: а – $[\text{ИНТ}]_0 = 1,0 \times 10^{-4}\text{ М}$;
 б – $[\text{ИНТ}]_0 = 5,88 \times 10^{-5}\text{ М}$

ями чистых сукцинатдегидрогеназ, определенных для различных организмов. Так, константы ингибирования равны $3,4 \cdot 10^{-5}$ и $4,3 \cdot 10^{-5}$ М соответственно для митохондриальных сукцинатдегидрогеназ мышечной ткани крыс [14] и бычьей печени [15]. Этот фактор свидетельствует о том, что сукцинатдегидрогеназы разного происхож-

дения имеют общность в строении и механизме действия.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования ФГБОУ ВО НГТУ им. Р.Е. Алексеева, институт физико-химических технологий и материаловедения.

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sabnis R. W. Handbook of Biological Dyes and Stains Synthesis and Industrial applications / R.W. Sabnis – ISBN: 978-0-470-40753-0. John Wiley & Sons Inc. 2010.
2. H. Şenöz // J. Biol. & Chem. 2012. Vol. 40. N 3. P. 293.
3. Круглов Ю.В. // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 1. С. 46.
4. Горленко М.В., Кожевин П.А. Мультисубстратное тестирование природных микробных сообществ. М., 2005.
5. Виноградова Ю.А. // Изв. Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16. № 5. С. 74.
6. Калинина А.А., Македошин А.С., Радостин С.Ю., Соколова Т.Н., Комова Е.П., Карташов В.П. // Изв. вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. № 3 (26). С. 61.
7. Калинина А.А., Македошин А.С., Радостин С.Ю., Гурский Н.Ю., Соколова Т.Н., Карташов В.П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2019. Т. 60. № 1. С. 27.
8. Калинина А.А., Македошин А.С., Гурский Н.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф. // Теоретическая и прикладная экология. 2018. № 1. С. 25.
9. Relexans J.C. // Marine Ecology Progress Series. 1996. Vol. 136. P. 289.
10. Hatzinger P.B., Palmer P., Smith R.L., Peñarrieta C.T., Yoshinari T. // J. Microbiol. Meth. 2003. Vol. 52. N 1. P. 47.
11. Smith J.J., McFeters G.A. // J. Microbiol. Meth. 1997. Vol. 29. P. 161.

12. *Altman F.P.* Tetrazolium salts and formazans / ISBN 3-437-10453-5. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. 1976.
13. *Березин И.В.* Практический курс химической и ферментативной кинетики / И.В. Березин, А.А. Клесов. М., 1976.
14. *Nakae Y., Shono M.* // The Histochemical Journal. 1986. Vol. 18. P. 169.
15. *Zeylemaker W.P., Slater E.C.* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology. 1967. Vol. 132. Is. 1. P. 210.

Поступила в редакцию 10.01.2020
Получена после доработки 12.01.2020
Принята к публикации 20.01.2020

INHIBITION OF INTRACELLULAR SUCCINATE DEHYDROGENASE OF BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS* AS A CRITERION FOR THE PARTICIPATION OF AN ENZYME IN THE REDUCTION OF CHLORIDE IODONITROTETRAZOLIUM - INDICATOR OF CELL VIABILITY

A.A. Kalinina*, S.S. Sychev, N.V. Gursky, T.N. Sokolova

(Nizhny Novgorod State Technical University n.a. R.E. Alekseev; *e-mail: himkalinina@mail.ru)

It is shown in the work that after diffusion of tetrazolium salt to membrane reducing agents of cells of bacteria *Bacillus subtilis*, the state of the enzyme succinate dehydrogenase affects the rate of recovery. Based on the dependence of the initial rate of reduction of iodonitrotetrazolium chloride by the cellular components of *Bacillus subtilis* on the concentration of malonic acid, the constant of competitive inhibition of the intracellular enzyme succinate dehydrogenase was quantitatively determined.

Key words: bacteria, iodonitrotetrazolium chloride, kinetics, inhibition, malonic acid, succinate dehydrogenase enzyme.

Сведения об авторах: *Калинина Александра Александровна* – доцент кафедры «Нанотехнологии и биотехнологии» Института физико-химических технологий и материаловедения НГТУ им. Р.Е. Алексеева, канд. хим. наук (kalinina@nntu.ru); *Сычев Сергей Сергеевич* – аспирант НГТУ им. Р.Е. Алексеева (train16@mail.ru); *Гурский Николай Васильевич* – аспирант НГТУ им. Р.Е. Алексеева (lpark-94@mail.ru); *Соколова Татьяна Николаевна* – профессор кафедры «Нанотехнологии и биотехнологии» Института физико-химических технологий и материаловедения НГТУ им. Р.Е. Алексеева, докт. хим. наук (biotechno@nntu.ru).