

УДК: 579.24.242

© 1991 г.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАНОТРОПНЫХ АУТОРЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

*Бабусенко Е. С., Эль-Регистан Г. И., Градова Н. Б.,  
Козлова А. Н., Осипов Г. А.*

Установлено, что метанокисляющие бактерии *M. capsulatus* в процессе развития синтезируют и выделяют в культуральную жидкость внеклеточные метаболиты — мембранотропные ауторегуляторные факторы  $d_1$  и  $d_2$ , синтез которых ранее был обнаружен у других групп микроорганизмов. Показано, что физиологическое действие фактора  $d_2$  обусловлено влиянием фракции свободных жирных кислот, содержащей в основном пальмитиновую и пальмитолиновую кислоты. Одним из проявлений действия специфического ауторегуляторного фактора  $d_1$  при повышении его концентрации в культуре является переход вегетативных клеток в гипометаболическое состояние. Активным началом фактора  $d_1$  является лактон 3-дезоксипентоновой кислоты. Высказывается предположение о практическом использовании химических аналогов ауторегуляторных факторов  $d_1$  и  $d_2$ .

Библиография — 24 ссылки.

Возросшие экологические требования к безопасности технологий, применяемых в народном хозяйстве, диктуют необходимость разработки новых или повышение эффективности уже имеющихся технологических решений при обязательном условии их экологической чистоты. Одной из наиболее интенсивно развивающихся отраслей в мировой хозяйственной практике является биотехнология, которая в развитых странах приобрела статус одного из приоритетных направлений. Признание ведущей роли биотехнологии не случайно. С использованием биотехнологических процессов связывается интенсификация сельского хозяйства и производств, обеспечивающих непосредственные потребности человека. Кроме того, восстановление окружающей среды, подвергшейся антропогенным воздействиям, не только должно включать конкретные решения, основанные на биотехнологических процессах, но и базироваться на фундаментальных знаниях превращения и кругооборота веществ, осуществляемых при участии естественных биологических факторов. Особую роль при этом отводят микроорганизмам, с деятельностью которых связаны циклы превращения элементов и использование которых во множественных промышленных процессах может составить основу экологически безопасного получения необходимых продуктов. Поэтому фундаментальное значение имеет выявление закономерностей жизнедеятельности микроорганизмов, общефизиологических основ микробного синтеза, исследование их трофических связей, устойчивости и адаптации к факторам окружающей среды.

В качестве одного из примеров, подчеркивающих необходимость глубокого изучения закономерностей жизнедеятельности микроорганизмов, приводятся исследования регуляции роста и развития метанокисляющих бактерий. Известно широкое распространение метанокисляющих бактерий в природных средах, их большая роль в превращениях углерода в природе [1], участие в образовании сероводорода в пластовых водах нефти-

ных месторождений в результате трофических связей метанокисляющих бактерий с сульфатвосстанавливающими [2]. В практике народного хозяйства метанокисляющие бактерии рассматриваются как перспективный объект для экологически чистого производства биомассы бактерий на природном газе с целью ее использования в качестве кормовых добавок, для выделения биологически активных компонентов из биомассы [3], для использования в забойных шахтовых скважинах с целью снижения концентрации метана в воздухе и уменьшения взрывоопасной ситуации [4], в составе техногенных биоценозов, применяемых в различных биологических методах повышения нефтеотдачи пластом [5]. Однако следует отметить, что, несмотря на достаточно широкое изучение физиологии бактерий данной группы, закономерности развития изучены мало, что создает трудности при их получении в крупнотонажных производствах. Известно, что в неблагоприятных условиях некоторые метанотрофы образуют покоящиеся формы: экаспоры, липидные цисты, зрелые и незрелые цисты типа *Azotobacter* [6], для других метанотрофов покоящиеся формы не известны. Не исследованы причины неконтролируемого изменения метаболической активности в условиях периодического и хемостатного культивирования метанокисляющих бактерий. Достаточно часто при непрерывном культивировании *M. capsulatus* наблюдается нестабильность процесса, что сопровождается либо спонтанным увеличением в популяции клеток со сниженной метаболической активностью, либо процессами лизиса культуры. Однако факторы, определяющие направленность процессов в сторону перехода клеток в гипометаболическое (анабиотическое) состояние или состояние клеточного автолиза, остаются невыясненными.

В современной теоретической микробиологии существует концепция, согласно которой развивающаяся микробная культура представляет собой саморегулирующуюся систему, ее поведение определяется как воздействием внешних факторов, так и влиянием ауторегуляторных метаболитов, которые контролируют скорость и этапность развития культуры [7].

В последние годы выяснение роли ауторегуляторных метаболитов в контроле физиологического состояния клеток микроорганизмов и развития их культур является областью активных исследований. В наиболее общем определении под ауторегуляторными факторами понимаются физиологически активные соединения различной химической природы, выделяемые микробной популяцией или ее частью в окружающую среду, не используемые в целях конструктивного и энергетического метаболизма и играющие в клеточном сообществе сигнальную роль к изменению количественного (скорость роста) или качественного (цитодифференцировка) состояния микробной культуры [8]. Основной биологической функцией внеклеточных ауторегуляторных метаболитов является обеспечение межклеточных взаимодействий, а также взаимодействий микроорганизмов со средой, которые направлены на активный рост популяции и самосохранение вида.

Обширный материал, накопленный при изучении низкомолекулярных ауторегуляторных метаболитов, синтезируемых организмами разных уровней развития (про- и эвкариотами одно- и многоклеточными) позволил выделить эту область знаний в отдельную науку — химическую экологию.

Нами [8, 9] обнаружены мембранотропные ауторегуляторные факторы, принимающие участие в контроле структурного состояния и физиологической активности мембран и, таким образом, регулирующие метаболическую активность клетки, что выражается в изменении интенсивности процессов клеточной пролиферации и/или дифференциации микробной клетки. В соответствии с последней из перечисленных активностей они были названы факторами d [8]. Показано, что микроорганизмы различных таксономических групп в процессе развития их периодических или непре-

Таблица 1

**Изменение интенсивности эндогенного дыхания клеток под действием  
фракций экстрацеллюлярных липидов *M. capsulatus***

| №<br>фрак-<br>ции | Фракция 50 мкл/мл    | ТСХ,<br>$R_f^*$ | Скорость потребления<br>кислорода                     |  |                 | ОП клеточ-<br>ной сусpen-<br>зии (% к<br>контро-<br>лю) *** |  |
|-------------------|----------------------|-----------------|---|--|-----------------|---|--|
|                   |                      |                 | опыт **   |  |                 |   |  |
|                   |                      |                 | контроль,<br>м <sup>3</sup> М О <sub>2</sub> /<br>мин | м <sup>3</sup> М О <sub>2</sub> /<br>мин | % к<br>контролю |   |  |
| 1                 | Диглицериды          | 0,12            | 0,93  | 0,86                                     | 92,5            | 88  |  |
| 2                 | Неидентифицированная | 0,16            | 0,90  | 1,08                                     | 120,0           | 92  |  |
| 3                 | Жирные кислоты       | 0,37            | 0,96  | 0,42                                     | 43,8            | 55  |  |
| 4                 | Неидентифицированная | 0,49            | 0,97  | 0,81                                     | 83,5            | 97  |  |
| 5                 | Триглицериды         | 0,47            | 0,92  | 1,03                                     | 112,0           | 88  |  |

\* Идентификацию пятен на хроматограмме проводили по аналогии с моно-, ди-, триглицеридолеатами.

\*\* Данные получены полярографическим методом; измерения проводили через 3 мин после внесения препарата в измерительную ячейку.

\*\*\* ОП — оптическая плотность клеточной супензии, которую определяли через 3 ч после внесения препаратов фракций в культуру.

рывных культур синтезируют и выделяют в окружающую (инкубационную) среду ауторегуляторные метаболиты — факторы  $d_1$  и  $d_2$ , различающиеся химической природой и физиологическим действием [9].

В настоящем обзоре приводится материал по выявлению специфического ауторегуляторного механизма развития метанокисляющих бактерий *M. capsulatus*, осуществляемого с помощью мембранотропных факторов  $d_1$  и  $d_2$ , изучению их химической природы и биологического действия, что имеет значение как для характеристики процессов роста и развития метанокисляющих бактерий в природных популяциях, так и для обеспечения стабильности и повышения продуктивности процессов их непрерывного культивирования.

В качестве биологических тестов при выделении и очистке факторов  $d$  были приняты следующие: 1) изменение интенсивности дыхания интактных клеток и изолированных мембран (показатель мембранотропного действия); 2) изменение скорости роста пролиферирующей культуры продуцента (интегральный показатель метаболической активности клеток); 3) стимуляция прорастания покоящихся форм продуцента; 4) индукция автолиза клеток (биологическая активность фактора  $d_2$ ); 5) индукция перехода вегетативных клеток в гипометаболическое или анаэробическое состояние (биологическая активность фактора  $d_1$ ).

Выделение, очистка и идентификация факторов  $d_1$  и  $d_2$  основаны на методах современной липидологии [10]: экстракции ауторегуляторов из культуральной жидкости липофильными растворителями, распределении их в системе растворителей в зависимости от степени полярности молекул, фракционном разделении на колонках и пластинах с адсорбентами при использовании подобранных элюентов и систем растворителей, рехроматографии для препаративного выделения хроматографически гомогенных фракций, газохроматографическом разделении для определения компонентного состава и возможной идентификации [8, 11–13].

Мембранотропные ауторегуляторные факторы выделяли из отделенной от клеток культуральной жидкости экстракцией *n*-бутанолом (2:1), остаток, после отгонки растворителя, разделяли на две фракции с преимущественной активностью фактора  $d_1$  или фактора  $d_2$ . После разделения на колонке с силикагелем «сырого» препарата фактора  $d_2$  (хлороформно-спиртовая фракция в бифазной системе хлороформ — метанол — вода в

соотношении 2 : 2 : 1) элюируемые хлороформом нейтральные липиды обладали активностью фактора  $d_2$ . При разделении активной фракции методом препаративной ТСХ преимущественная активность была обнаружена во фракции свободных жирных кислот (СЖК) (табл. 1), о чём судили по способности препарата как ингибиовать дыхание мембран и клеток, так и индуцировать автолиз последних. Фракция СЖК фактора  $d_2$ , так же как и «сырой» препарат этого ауторегулятора, в низких кон-

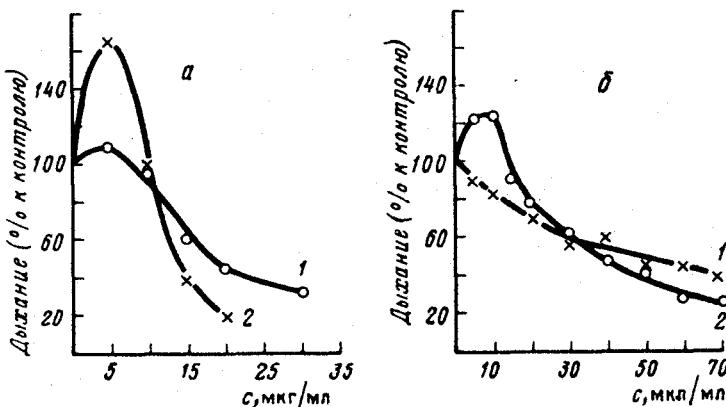
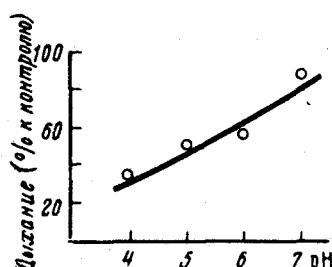


Рис. 1. Влияние фактора  $d_1$  (а) и  $d_2$  (б) культуры *M. capsulatus* на эндогенное дыхание клеток продуцента в зависимости от концентрации (с) ауторегулятора и физиологического состояния клеток экспоненциальной (1) и линейной (2) фаз роста [13]

центрациях стимулировала, а в высоких ингибировала дыхание клеток продуцента. Степень ингибирования дыхания клеток и оксидазных активностей изолированных мембран возрастала при увеличении концентрации вносимых СЖК, снижении рН инкубационной среды, уменьшении количества биологического материала в измерительной ячейке, развиваилась во времени, а также зависела от физиологического возраста культуры (рис. 1, 2).

Газохроматографический анализ состава фракции СЖК (фактора  $d_2$ ), выделенной из культуральной жидкости при стабильном процессе куль-

Рис. 2. Влияние фактора  $d_2$  культуры *M. capsulatus* (20 мкг/мл) на эндогенное дыхание клеток линейной фазы роста, супспендированных в 0,15 М фосфатно-цитратном буфере, в зависимости от рН



тивирования *M. capsulatus* в режиме хемостата, позволил определить наличие широкого спектра жирных кислот: с четным и нечетным числом атомов углерода от  $C_{12}$  до  $C_{18}$ , насыщенными, моно-, ди-, три- и полиненасыщенными кислотами (табл. 2) [14]. Основными являлись пальмитиновая и пальмитолеиновая кислоты, содержание которых достигало 36 и 25% соответственно, количество стеариновой кислоты – 6, олеиновой – 8, линолевой – 6,5%. При биологическом тестировании коммерческих препаратов индивидуальных жирных кислот, входящих в состав

Таблица 2

**Жирнокислотный состав внеклеточных липидов культуры  
*M. capsulatus* [14]**

| Кислоты                        | Содержание (%) липидов в условиях хемостата<br>$D = 0,21 \text{ ч}^{-1}$ , $t = 41^\circ \text{C}$ | Содержание (%) липидов в условиях лизиса |
|--------------------------------|--|--|
| 12 : 0                         | 0,63   | 0,22                                     |
| 13 : 0                         | 1,07   | 0,75                                     |
| 14 : 0                         | 1,45   | 1,59                                     |
| 14 : 1                         | 2,32   | 2,97                                     |
| 15 : 0                         | 2,70   | 4,18                                     |
| 15 : 1                         | Сл. **   | См. ***                                  |
| 16 : 0                         | 36,75  | 29,21                                    |
| 16 : 1                         | 24,37  | 15,71                                    |
| 17 : 0                         | 0,38   | См. ***                                  |
| 16 : 2                         | 3,19   | 6,86                                     |
| 17 : 1                         | 0,39   | См. ***                                  |
| 18 : 0                         | 6,59   | 4,54                                     |
| 18 : 1                         | 8,12   | 6,73                                     |
| 18 : 2                         | 6,51   | 8,87                                     |
| 18 : 3                         | 1,77   | 15,51                                    |
| 18 : 4                         | 3,76   | 2,82                                     |
| $\Sigma_{\text{неис}} = 50,43$ |  | $\Sigma_{\text{неис}} = 59,47$           |

\*  $D$  — скорость протока,  $\text{ч}^{-1}$ .

\*\* Кислота обнаружена в следовых количествах (менее 0,01%).

\*\*\* Кислота не обнаружена.

Таблица 3

**Влияние жирных кислот на эндогенное дыхание клеток культуры  
*M. capsulatus***

| Концентрация кислоты, нМ/мл | Дыхание клеток (% к 100% в контроле через 3 мин после внесения кислоты) |                  |             |           |
|-----------------------------|---|------------------|-------------|-----------|
|                             | пальмитиновая   | пальмитолеиновая | стеариновая | олеиновая |
| 20                          | 140   | 150              | 120         | 160       |
| 200                         | 110   | 5                | 115         | 5         |
| 400                         | 85  | 5                | 120         | 5         |

фактора  $d_2$  в доминирующих количествах, было установлено, что за физиологическое действие этого ауторегулятора ответственны ненасыщенные жирные кислоты (табл. 3).

В модельных опытах по определению биологической активности компонентов фактора  $d_2$  было показано, что олеиновая и пальмитолеиновая кислоты вызывали активный лизис клеток культуры *M. capsulatus* линейной фазы роста. Так, в присутствии олеиновой кислоты, рассматриваемой как химический аналог фактора  $d_2$ , вносимой в суспензию клеток в концентрации  $(4-70) \cdot 10^{-2}$  мкг/мл, уже через 1 ч инкубирования наблюдался интенсивный лизис культуры (70%), который достигал практически 100% при увеличении времени инкубирования до 4 ч (об автолизе клеток судили по падению оптической плотности клеточной суспензии, а также по количеству реализуемого из клеток в инкубационную среду растворимого белка, уровень которого в данном случае составил 37%). Это заключение согласуется с ранее полученными результатами изучения

химической природы факторов  $d_2$ , бактерий *Pseudomonas carboxydoflava* и *Bacillus cereus* [11].

Механизм действия СЖК (фактора  $d_2$ ) на клетки основан на их способности включаться в мембранные без участия ацилпереносящих белков [15]. Показанная стимуляция дыхания клеток стареющих культур под влиянием низких концентраций СЖК может объясняться способностью ненасыщенных жирных кислот увеличивать жидкостность мембранных липидов, что ведет к повышению активности интегрированных в мембранах ферментов электрон-транспортной цепи [16]. Стимуляция дыхания под действием насыщенных жирных кислот, вероятно, основана на их способности разобщать дыхание и окислительное фосфорилирование [17]. Этот эффект выражен сильнее при закислении среды, когда СЖК полностью протонированы. Внесение высоких концентраций фактора  $d_2$  (20–80 мкг/мл) или его активного начала – ненасыщенных жирных кислот, в данном случае олеиновой и пальмитолеиновой (200 нМ/мл), в пролиферирующую культуру бактерий, приводит к сверхкритическому повышению жидкостности мембран, что вызывает ингибирование дыхания клеток и является побудительной причиной автолиза клеток. Этот вывод не противоречит имеющимся в литературе данным о дестабилизирующем мембраны влиянии насыщенных жирных кислот [18].

Необходимо отметить, что избранная в качестве биологического теста автолитическая деструкция микроорганизмов, вызванная влиянием высоких концентраций фактора  $d_2$  или его химического аналога, является случаем реакции клеток на экстремальное действие ауторегуляторов. В процессе развития культур микроорганизмов изменение структуры и функциональной активности мембран под действием физиологических концентраций СЖК обеспечивает сбалансированность метаболических процессов (кatabолических и anabolических), играющих важную роль на протяжении всего жизненного цикла микроорганизмов.

Таким образом, биологическая роль фактора  $d_2$  микроорганизмов, в данном случае метанокисляющих бактерий, заключается в поддержании жидкости клеточных мембранных липидов в пределах, обеспечивающих оптимальные и необходимые липид-белковые взаимодействия, посредством которых осуществляется контроль функциональной активности мембран. При предельно допустимой концентрации фактора  $d_2$  в культуре он вызывает дестабилизацию мембран, что индуцирует развитие автолитических процессов.

Эти данные могут быть использованы для разработки приемов автолиза клеток метанокисляющих бактерий с помощью фактора  $d_2$  или его химического аналога с целью получения клеточного белка в растворенном виде, что существенно повышает усвоемость и перевариваемость микробной биомассы, используемой как кормовая белковая добавка в сбалансированных по белку кормах для сельскохозяйственных животных и птицы.

Полученные результаты по определению химической структуры и биологической активности фактора  $d_2$  были использованы для анализа материалов по стабильности технологического процесса получения биомассы метанотрофных бактерий в опытно-промышленных условиях. При выяснении причин возникновения спонтанного автолиза хемостатной культуры *M. capsulatus* мы исходили из следующего предположения. Возможно, в рассматриваемых случаях происходило усиление синтеза внеклеточного фактора  $d_2$ , и, следовательно, нарушение баланса активности факторов  $d_1/d_2$  в сторону последнего, что и явилось побудительной причиной развивающегося автолиза клеток. Сравнительный анализ уровня фактора  $d_2$  в варианте стабильно растущей хемостатной культуры и культуры автолизирующейся обнаружил, что в последнем случае наблюдалось су-

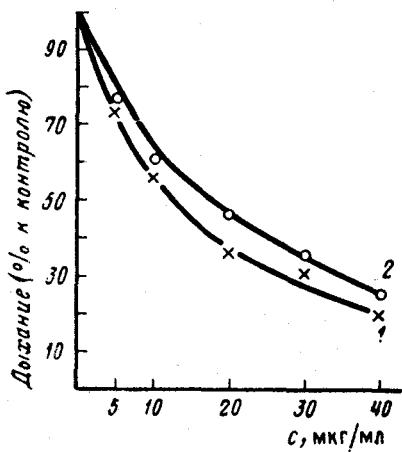


Рис. 3

Рис. 3. Подавление НАДН-оксидазной (1) и малатоксидазной (2) активности изолированных мембран *Micrococcus lysodeikticus* фактором  $d_2$  [13]

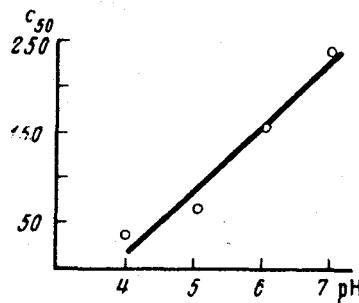


Рис. 4

Рис. 4. Влияние рН инкубационной среды (0,2 М фосфатно-цитратный буфер) на ингибирование фактором  $d_1$  эндогенного дыхания клеток *M. capsulatus*;  $c_{50}$  — количество фактора  $d_1$  (мкг/мл), ингибирующее дыхание клеток на 50%

щественное увеличение как активности фактора  $d_2$  (стабильная культура — 12,3 ед/л, автолизирующемся — 19,6 ед/л), так и удельного содержания ненасыщенных жирных кислот (табл. 1). Следует отметить, что увеличение общей суммы ненасыщенных жирных кислот в варианте автолизирующейся культуры по сравнению со стабильно растущей не коррелирует с соответствующим возрастанием активности фактора  $d_2$ . Однако полученный факт объясним при учете данных о более сильном дестабилизирующем мембранных действиями полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с мононенасыщенными. Как следует из табл. 1, в варианте автолизирующейся культуры появляются в существенном количестве  $C_{18}$ -полиненасыщенные кислоты. Таким образом, причиной нестабильности производства биомассы *M. capsulatus*, связанной с автолизом клеток хемостатной культуры, может быть повышение уровня активности фактора  $d_2$ . Исходя из этого возможная практическая рекомендация заключается в необходимости создания сбалансированности уровней активностей факторов  $d_1/d_2$ , что может быть достигнуто искусственным внесением химического аналога фактора  $d_1$ .

Что же представляет собой ауторегуляторный фактор  $d_1$ , *M. capsulatus*? Как было показано выше, ауторегуляторные факторы  $d_1$ , обнаруженные у некоторых бактерий [9], обладают мембранотропным действием, тестом на которое является изменение эндогенного дыхания клеток и экзогенно стимулируемого дыхания мембран. Биологическое действие факторов  $d_1$  проявляется в их способности индуцировать переход вегетативных клеток в анаэробическое состояние, тестом на которое является образование под влиянием фактора  $d_1$  рефрактильных покоящихся форм микроорганизмов [19].

В процессе очистки фактора  $d_1$  культуры *M. capsulatus* было установлено, что искомым типом действия обладает ацетоновая фракция, полученная при разделении «сырого» препарата фактора  $d_1$  (водно-спиртовая фракция в бифазной системе хлороформ — метanol — вода в соотношении 2 : 2 : 1) на колонке с силикагелем. Дальнейшее разделение этой фракции методом ТСХ в системе растворителей хлороформ — метanol — уксусная

кислота — серный эфир (в соотношении 35 : 5 : 5 : 45) выявило, что активность фактора  $d_1$ , обнаруживалась во фракции с  $R_f = 0,67$ . После рехроматографии был получен хроматографически гомогенный препарат, индивидуальность которого доказана хроматографией на пластинках «Silufol» и «Merck» в исходной системе, а также в системах хлороформ — ацетон — метанол (12 : 4 : 1) и хлороформ — метанол (85 : 15). Хроматографически индивидуальная фракция фактора  $d_1$ , обладала всеми свойствами ранее описанных ауторегуляторов этого типа. В концентрациях 7—40 мкг/мл препарат ингибирировал эндогенное дыхание клеток и стимулируемое НАДН, малатом или сукцинатом дыхание изолированных мембран. Степень ингибирования дыхания зависела от концентрации вносимого фактора, pH среды и развивалась во времени (рис. 3, 4). Выделенная индивидуальная фракция фактора  $d_1$  культуры *M. capsulatus* не обладала видоспецифичностью в отношении как других видов метанокисляющих бактерий, так и бактерий других родов, но степень воздействия на клетки была различной. Специфическая биологическая активность фактора  $d_1$  культуры *M. capsulatus* была аналогичной действию ауторегуляторов этого типа ранее изученных бактерий [8, 9]. В дозах 20—80 мкг/мл фактор  $d_1$  индуцировал образование рефрактильных анабиотических форм *M. capsulatus*. Как следует из принятого определения покоящихся форм микроорганизмов, к таковым можно относить специализированные клетки, образование которых является естественным событием в цикле развития микробных культур [20]. Исходя из сказанного, были подобраны условия культивирования *M. capsulatus*, предусматривающие возможное повышение синтеза фактора  $d_1$  в культуре, вследствие чего цикл ее развития завершался образованием рефрактильных форм, аналогичных тем, которые были получены при действии на клетки бактерий чистым препаратором фактора  $d_1$ . Рефрактильные формы *M. capsulatus*, как полученные при действии фактора  $d_1$ , так и образующиеся в естественном цикле развития этих бактерий, обладали всеми характеристиками, свойственными покоящимся формам микроорганизмов: отсутствием экспериментально определяемой метаболической активности, повышением степени их светопреломления вследствие обезвоживания клеточного протопласта, длительным сохранением жизнеспособности, характерными особенностями их ультраструктурной организации, отличными от вегетативных клеток.

Таким образом, анабиотические клетки, образование которых индуцируется действием фактора  $d_1$ , можно отнести к цистоподобным анабиотическим формам, предназначенным для сохранения вида бактерий в неблагоприятных для роста условиях.

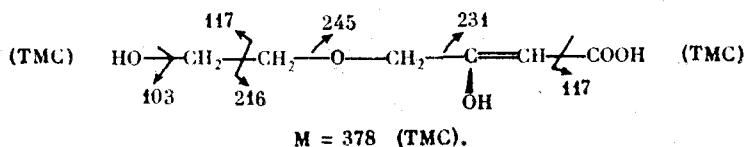
Авторы высказывают предположение, что покоящиеся формы, описанные для некоторых метанокисляющих бактерий, по-видимому, образуются при участии фактора  $d_1$  этих бактерий, а отмеченные авторами публикаций [6, 21] различия в строении их оболочек или в степени рефрактильности, обусловлены условиями, определяющими активность этого ауторегулятора и его концентрацию. Полная аналогия в проявлении биологической активности фактора  $d_1$  бактерий *M. capsulatus* и ранее описанных факторов  $d_1$  бактерий *P. carboxydoflava* и *B. cereus* позволяет предположить и идентичность механизма их действия на структурную организацию мембран [22, 23]. Механизм действия факторов  $d_1$  на липидный бислой мембраны основан, по-видимому, на образовании сети межмолекулярных водородных связей между функциональными группами молекулы ауторегулятора и молекулами липидов, что приводит к иммобилизации липидного матрикса. Следствием структурной реорганизации мембраны (поликристаллизации) является изменение функциональной активности интегрированных в них ферментов (в частности, ингибирирование ферментов электрон-транспортной цепи); изменение проницаемости мем-

бранны для моновалентных ионов и связанное с этим обезвоживание клетки (увеличение степени рефрактальности). Таким образом, факторы  $d_1$ , способны модифицировать структуру липидной фазы мембраны, увеличивая ее микропластичность, в противоположность действию факторов  $d_2$ , увеличивающих жидкостность мембраны.

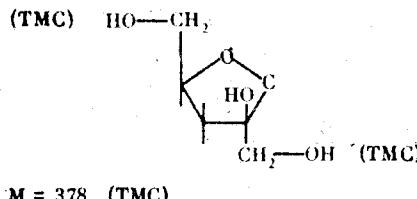
Наконец, следует еще раз отметить, что регуляторная функция факторов  $d_1$  и  $d_2$  микроорганизмов зависит не только от их концентрации в развивающейся культуре, но и от внешних условий культивирования, в частности от pH и ионного состава среды роста. В этой связи их можно рассматривать как медиаторы передачи внешнего сигнала в клетку.

Описав биологическое действие фактора  $d_1$ , культуры *M. capsulatus*, вернемся к вопросу об идентификации его химической структуры. Определение структуры факторов  $d_1$  основано на данных спектрального, масс-спектрометрического анализа и спектров протонного магнитного резонанса. Ранее показано [12], что по химической природе факторы  $d_1$  бактерий *P. carboxydoflava* и *B. cereus* относятся к алкилоксибензолам, которые присутствуют в культурах бактерий в виде смеси изомеров или гомологов, различающихся положением гидроксилов в кольце и конфигурацией алкильного радикала.

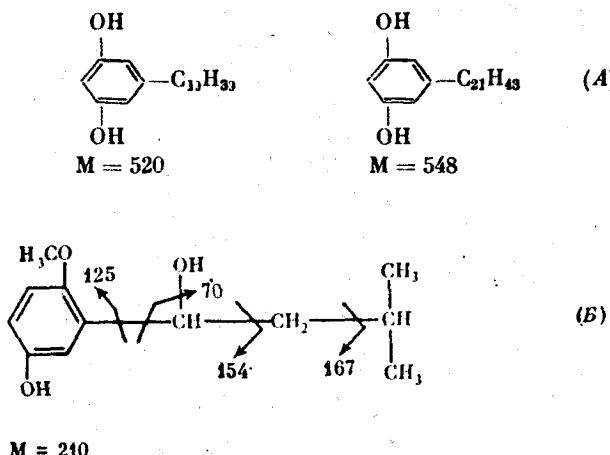
Хромато-масс-спектрометрическим анализом, проводимым в режимах, указанных в работе [11], показано, что в состав активного начала фактора  $d_1$  культуры *M. capsulatus* входят два вещества. Машинная идентификация этих веществ по библиотекам Wiley и NBS не удается. По времени удерживания эти вещества находятся в области линейных  $C_{10}$ -жирных кислот,  $C_6$ -полифункциональных кислот или дезоксипентоз. Масс-фрагментационный анализ выявил, что в спектрах обоих соединений имеются общие ионы, характерные для карбоновых кислот (ионы 117, 129, 135, 145) и гидроксильной группы – (спиртовой) (ион 103). Это свидетельствует о том, что данные вещества являются родственными – изомерами или молекулами, имеющими небольшие структурные различия. Строение исследуемых молекул до иона 261 совпадает. На основании каталога машинного поиска по деталям фрагментации молекул (под действием электронного удара 70 эВ) можно предположить строение молекул, объясняющее данные масс-спектрометрии этих соединений.



Наиболее близкая версия, предложенная ЭВМ при идентификации – это лактоны пентоновых кислот [24]. Они имеют многие из ионов, содержащихся в спиртах определяемых веществ, а именно: 103, 117, 129, 131, 133, 147, 217, 245, 235. Наиболее близким к исследуемым веществам является лактон 3-дезоксипентоевой кислоты ( $M=378$ , trimetilsilyльные производные).



Химическая структура факторов d<sub>1</sub>, выделенных из культур *P. carboxydoflava* (A), *B. cereus* (B) имеет следующий вид [12]:



Таким образом, проведенные исследования показали, что химическая природа фактора d<sub>1</sub> культуры *M. capsulatus*, индуцирующего образование абиотических форм продуцента, отличается от таковой, ранее установленной для факторов d<sub>1</sub> бактерий *P. carboxydoflava* и *B. cereus*. Сам факт обнаружения различий в химической структуре соединений, обладающих однотипным биологическим действием, очень интересен. Работы по окончательной идентификации химической структуры фактора d<sub>1</sub> культуры *M. capsulatus*, а также определение природы факторов d<sub>1</sub> других микроорганизмов представляются нам весьма значимыми. Во-первых, эти данные могут дать представление о том, какая общая структура или функциональные группы несут ответственность за биологическую активность, связанную с процессами поликристаллизации мембран, изменениями их функциональной активности и обезвоживания клеток при развитии абиотического состояния. Во-вторых, расширение знаний о структурах соединений, обладающих изучаемым типом действия, необходимо для возможного подбора дешевых и доступных химических аналогов в целях их практического применения для разработки технологий, связанных с использованием стабилизированных клеток для создания бактериальных препаратов различного назначения.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что изложенный материал является лишь частным примером в обширной области биологических знаний о природе и действии низкомолекулярных метаболитов, функцией которых является контроль за изменением качественного состояния организма, физиологической активностью клеток и их взаимодействиями между собой и окружающей средой. Надо отметить необходимость изучения биологической активности ауторегуляторов в строгой зависимости от изменения внешних условий окружающей среды, в данном случае условий культивирования микроорганизмов. Сочетание в одной системе наших представлений о роли внешних и эндогенных (авторегуляторных) факторов в процессах клеточной пролиферации (рост культуры) и цитодифференцировки будет способствовать фундаментальному познанию закономерностей жизнедеятельности микроорганизмов в среде их обитания. Помимо этого прогресс в области исследований механизмов регуляции роста и развития микроорганизмов может составить основу теории управляемого культивирования и помочь в решении конкретных задач биотехнологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Малашенко Ю. Р., Романовская В. А., Троценко Ю. А. Метанокисляющие микроорганизмы. М.: Наука, 1978. 196 с.
2. Галушко А. С., Иванова А. Е.// Микробиология. 1989. Т. 58. Вып. 2. С. 348.
3. Higgins I. J., Best D. J., Hammond R. C., Scott D.// Microbiol. Revs. 1981. V. 45. № 4. Р. 556.
4. Москаленко Э. М., Нестеров А. И.// Микробиол. пром-сть. 1975. № 1(121). С. 39.
5. Галушко А. С. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Институт микробиологии АН СССР. 1990.
6. Гальченко В. Ф., Андреев Л. В., Троценко Ю. А. Таксономия и идентификация obligatных метанотрофных бактерий. Пущино, НЦБИ АН СССР. 1986. 96 с.
7. Aaronson S. Chemical Communication at the Microbiol Level Florida: CRC Press. Inc. Boca Raton. 1981. V. 1. Р. 189; V. 2. Р. 203.
8. Эль-Регистан Г. И., Дуда В. И., Капрельянц А. С. и др.// Регуляция биохимических процессов у микроорганизмов. Тез. докл. Пущино, НЦБИ АН СССР. 1979. С. 280.
9. Эль-Регистан Г. И., Хохлова Ю. М., Дужа М. В. и др.// Изв. АН СССР. Сер биол. 1979. № 6. С. 869.
10. Kates M. Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. Amsterdam; New York, Oxford: Elsevier. 1986. 436 р.
11. Светличный В. А., Эль-Регистан Г. И., Романова А. К., Дуда В. И.// Микробиология. 1983. Т. 52. Вып. 1. С. 33.
12. Осипов Г. А., Эль-Регистан Г. И., Светличный В. А. и др.// Там же. 1985. Т. 54. Вып. 2. С. 186.
13. Бабусенко Е. С., Градова Н. Б., Эль-Регистан Г. И. и др. // Регуляция микробного метаболизма. Тез. докл. Пущино, НЦБИ АН СССР. 1989. С. 10.
14. Бабусенко Е. С., Градова Н. Б., Эль-Регистан Г. И. и др.// Тез. докл. IV Республикаской научно-теоретической конф. молодых ученых и специалистов «Биология, культивирование и биотехнология микроорганизмов». Ташкент, 1989. С. 5.
15. Cronan J. E. // J. Bacteriol. 1984. V. 159. P. 773.
16. Eze M. O., McElhaney R. N.// J. Gen. Microbiol. 1984. V. 124. P. 229.
17. Антонов В. Ф.// Липиды и ионная проницаемость мембран. М.: Наука, 1982. С. 110.
18. Araki K., Rifkind J. M.// Biochim. Biophys. acta. 1981. V. 645. P. 81.
19. Эль-Регистан Г. И., Козлова А. Н., Дуда В. И. и др.// Экспериментальный анаэроб. Тез. докл. II Всесоюз. конф. по анаэробизу. Рига. 1984. С. 109.
20. Sudo S. Z., Dworkin M.// Adv. Microbiol. Phisiol. 1973. V. 9. Р. 153.
21. Whittenbury R., Dalton H.// The Prokaryotes. Berlin: Spring-Verlag, 1981. Р. 894.
22. Капрельянц А. С., Островский Д. Н., Эль-Регистан Г. И. и др.// Регуляция микробного метаболизма факторами внешней среды. Тез. докл. международного симпозиума ФЕМО. Пущино, 1983. С. 121.
23. Капрельянц А. С., Сулейменова М. К., Сорокина А. Д. и др.// Биологические мембранны. 1987. Т. 4. С. 254.
25. Каталог масс-спектров. EPA / NIH Mass Spectra Data Base. 1979.

Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева