

10. Дильовий М.В. Вплив 2,4-динітрофенолу і глюкози на утилізацію сукцинату, лактату, пірувату та форміату *Escherichia coli* K12 // Укр. біохім. журн. – 1996. – Т.68. №2. – С.37-41.

Halyna Semchyshyn, Tetiana Bagnyukova
OXIDATIVE STRESS EFFECT ON CATALASE ACTIVITY WITH
TWO PH-OPTIMUMS IN ESCHERICHIA COLI

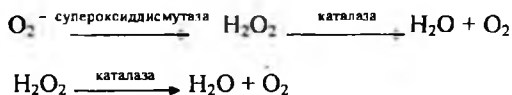
In previous work we have found two catalase activity peaks at pH 3.5 and pH 7.0 in *E. coli*. The activities demonstrated different activation as the result of hydrogen peroxide effect. It was suggested the activity with acid maximum is associated with some membrane protein component and regulated by OxyR factor.

Юрій Дем'ячук, Олександра Абрам

**ВПЛИВ РІЗНИХ РІВНІВ КИСНЮ НА РІСТ БАКТЕРІЙ
ESCHERICHIA COLI ШТАМІВ MC4100, GS071 ТА GS047**

Кисень є фактором, без якого неможливе існування більшості біологічних систем. Він бере участь в обміні речовин та енергії, без нього неможливе функціонування різних метаболічних шляхів. Найголовнішим процесом, в якому бере участь кисень, є дихання. Воно спряжене з окисним фосфорилуванням, а останнє, в свою чергу, – з перенесенням електронів через електронно-транспортний ланцюг (ЕТЛ). При перенесенні електронів через ЕТЛ, частина їх може виходити з нього і вступати в реакції, що ведуть до утворення активованих форм кисню (АФК) [4; 7]. До них, зокрема, належать супероксид-аніон (O_2^-) та пероксид водню (H_2O_2). АФК – речовини, що здатні пошкоджувати більшість компонентів живої клітини [3; 4; 7]. Це говорить про те, що кисень виступає не тільки як акцептор електронів у процесі окисного фосфорилування, але і як потужне джерело ендогенного оксидативного стресу.

У процесі еволюції живі організми виробили власні механізми захисту від АФК. Ці механізми скеровані на детоксикацію вільних радикалів, що постійно утворюються в клітині як побічні продукти деяких біохімічних процесів [7]. Детоксикація O_2^- та H_2O_2 відбувається за такою схемою:



Супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза є ключовими ферментами антиоксидантного захисту.

Ю. Дем'янчук, О. Абрам. Вплив різних рівнів кисню на ріст бактерій *Escherichia coli* штамів mc4100, gs071 та gs047

У *E. coli* гени, які кодують Mn-СОД та каталазу HPI, входять до регулонів *SoxRS* (СОД) та *OxyR* (каталаза) [7; 8]. Активація регулонів *SoxRS* та *OxyR* спостерігається внаслідок підвищення рівнів O_2^- та H_2O_2 відповідно [1; 6]. У світлі цієї проблеми особливу цікавість представляє вивчення організмів, які не здатні синтезувати ті чи інші ферменти анти-оксидантного захисту.

Виходячи з цього, ми поставили за мету дослідити характеристики росту культур *E. coli* штамів MC4100 та GS071, GS047, що є дефектними за генами *soxR* та *oxyR* відповідно.

Матеріали і методи

У роботі використовували бактерії *Escherichia coli* штамів MC4100 (*araD139A1thi rpsL150 flbB5301 Δ(lacU139) deoC7pisF25*), GS071 (*MS4100 ΔsoxRS-zjc2205zjc2204::Tn10 ran*), GS047 (*MS4100 ΔoxyR::kan*), які були люб'язно надані Національним інститутом здоров'я та розвитку людини (США).

Бактерії вирощували в поживному середовищі для культивування бактерій виробництва "НДІ поживних середовищ" (м. Махачкала, Росія), яке містить 10,05г/л панкреатичного гідролізату кільки і 4,95г/л хлориду натрію (рН=7,2 ± 0,2). Для цього готували середовище з 1,5%-ним вмістом поживного бульйону. Нічна культура росла протягом 18 годин в умовах глибинного культивування при температурі 37°C.

Для дослідження відповідний об'єм нічної культури розводили стерильним бульйоном у співвідношенні 1:50. Після розведення нічної культури суспензію клітин вирощували за умов глибинного культивування, аерації та оксигенації.

Протягом лаг-фази і експоненційної фази росту культури оптичну густину визначали через кожні 15 хв, а після виходу на стаціонарну фазу – через кожні 30 хв за допомогою фотоелектроколориметра при довжині хвилі 670 нм.

Середній час подвоєння клітин і продовженість лаг-фази розраховували за формулами:

$$T = t * \lg 2 / (\lg n - \lg n_0), \text{ де:}$$

T – середній час подвоєння клітин, хв;

t – продовженість експоненційної фази, хв;

n_0 , n – концентрація клітин на початку і в кінці експоненційної фази відповідно.

$$L = t - (\lg n - \lg n_0) T / \lg 2, \text{ де:}$$

L – продовженість лаг-фази, хв;

n_0 – концентрація клітин на початку культивування;

n – концентрація клітин у момент часу t;

T – середній час подвоєння клітин, хв.

Результати та обговорення

Кишкова паличка, яка є представником нормальної мікрофлори кишківника людини і тварин, належить до факультативних анаеробів, тобто може жити як за наявності, так і за відсутності кисню [2; 6]. Проте наявність кисню в різних концентраціях неоднозначно впливає на ріст бактерій, що відрізняються за генетичними характеристиками. Наочним показником останнього є результати проведених нами досліджень.

Таблиця 1. Показники середнього часу подвосини клітин в експоненційній фазі розвитку культури (Т) та продовженості лаг-фази (L) культур *E. coli* штамів MC4100, GS071 та GS047 за різних умов культивування

Умови культивування	Штами <i>E. coli</i>					
	MC4100		GS071		GS047	
	T, хв	L, хв	T, хв	L, хв	T, хв	L, хв
Глибинне культивування	247	18	200	20	185	27
Аерація	74	44	76	129	74	63
Оксигенація	88	55	85	175	74	70

Вивчено вплив різних рівнів кисню в середовищі культивування на ріст штамів *Escherichia coli* MC4100 (дикий тип) та GS071, GS047, які є похідними від попереднього і дефектними за регулонами *SoxRS* і *OxyR*. Як видно з рис. 1, у штаму MC4100 продовженість лаг-фази за умов оксигенації (крива 3) та аерації (крива 2) становить відповідно 44 хв та 55 хв. Швидкість росту оксигенованої культури теж, практично, не відрізняється від такої, що вирощена за умов аерації. Це може свідчити про те, що концентрація кисню в культуральному середовищі оксигенованої культури, будучи більшою за концентрацію в аерованій, все ж недостатня для суттєвого підвищення рівня вільнорадикального фону в клітинах дикого штаму. Це може свідчити про те, що дикий штам має потужну систему знешкодження вільнорадикальних форм.

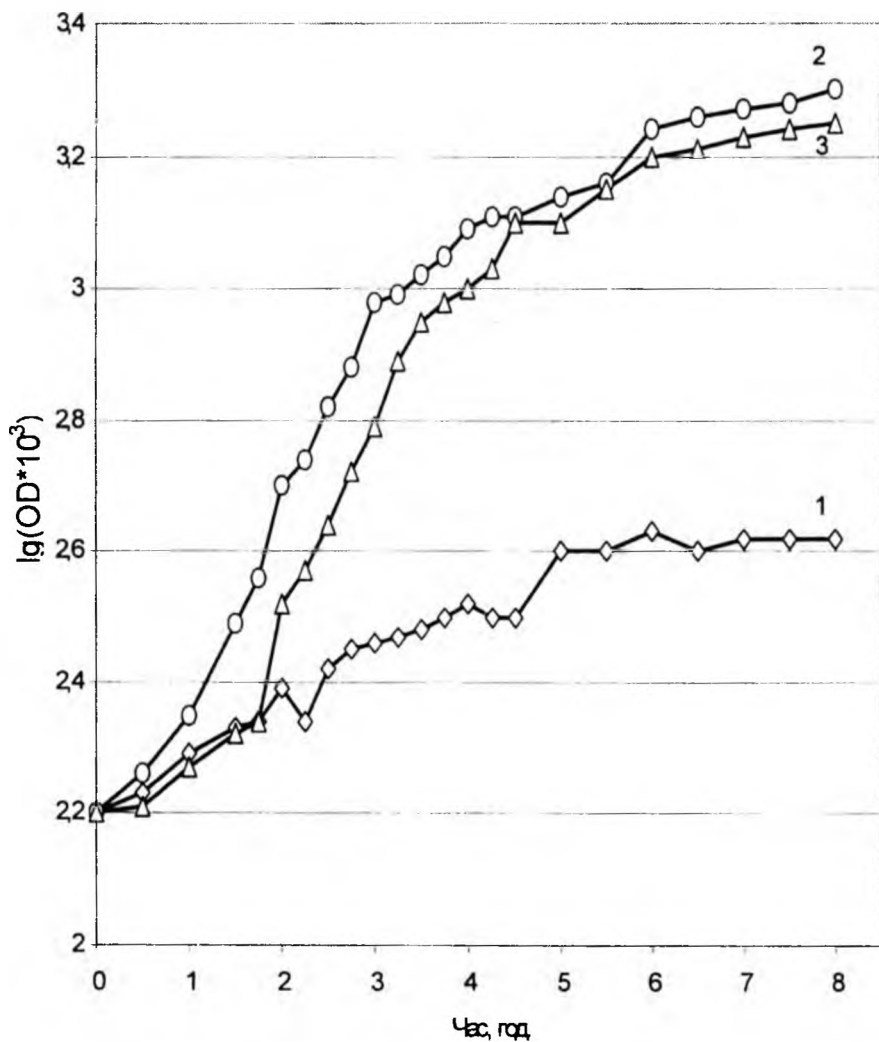


Рис. 1. Криві росту *E. coli* MC4100 за умов: 1 – глибинного культивування; 2 – аерації; 3 – оксигенації.

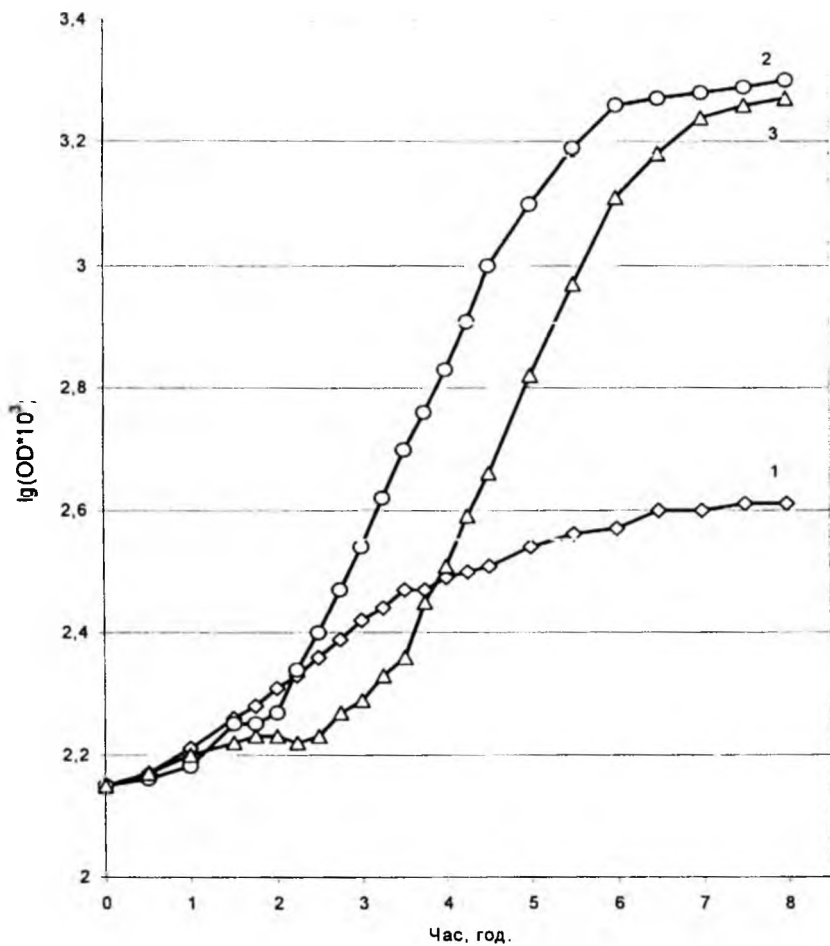


Рис 2. Криві росту *E. coli* GS071 за умов: 1 – глибинного культивування; 2 – аерації; 3 – оксигенації.

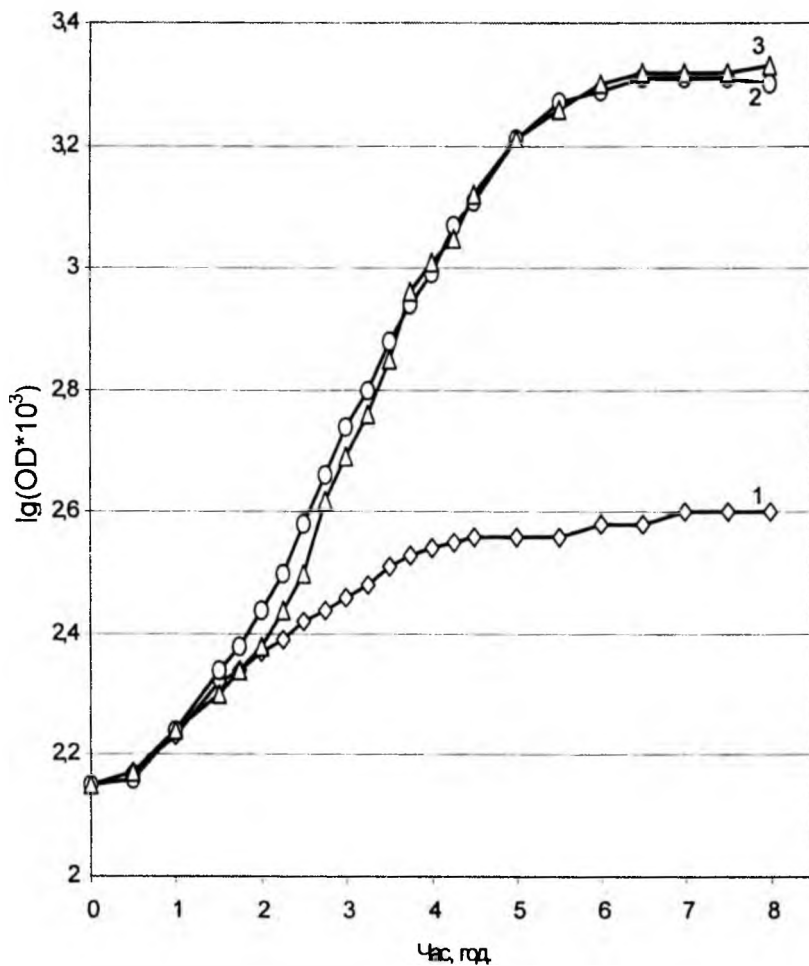


Рис. 3. Криві росту *E. coli* GS047 за умов: 1 – глибинного культивування; 2 – аерації; 3 – оксигенації.

Швидкість росту культури *E. coli* MC 4100, що знаходилася в умовах глибинного культивування (крива 1), на експоненційній фазі нижча, ніж за двох вищевказаних умов. Цього слід було очікувати, оскільки за даних умов унеможливується функціонування аеробних ферментів енергетичного обміну, що різко знижує ефективність використання високоенергетичних субстратів.

Доцільним є вивчення штамів GS071 та GS047, що дефектні за білками-сенсорами оксидативного стресу SoxR та OxyR відповідно. Нами встановлено, що в порівнянні з диким штамом продовженості лаг-фаз оксигенованої і аерованої культур штаму GS071 (рис. 2, криві 2 і 3) є більшими, чого не можна сказати про культуру, вирощену за умов обмеженого доступу кисню (рис. 2, крива 1), яка перебувала у лаг-фазі тільки 20 хвилин. Це демонструє низьку адаптивну здатність штаму до підвищеного вмісту кисню в культуральному середовищі, що, на нашу думку, безпосередньо пов'язано з регуляцією SoxRS регулону [8].

Цікавим видається той факт, що характер змін показників росту оксигенованої (рис. 3, крива 3) і аерованої (рис. 3, крива 2) культур штаму GS047 відрізняються від аналогічних показників штаму GS071. Це видно з того, що тривалість лаг-фази при аерації штаму GS047 (*ΔoxyR*) приблизно у 2 рази, а при оксигенації – у 2,5 рази менша від показників штаму GS071 (*ΔsoxR*). Це може пояснюватися тим, що існує альтернативний шлях активації регулону *OxyR*. Ми також не можемо виключити участь інших форм каталази у знешкодуванні молекул пероксиду водню, які утворюються внаслідок інтенсивного аеробного метаболізму [7].

Характеристику даних трьох штамів значною мірою доповнюють показники середнього часу подвоєння клітин на експоненційній фазі розвитку (табл. 1). Варто зазначити, що цей показник є маркером інтенсивності метаболізму, який інгібується продуктами вільнорадикальних процесів у клітині. Якщо мова йде про оксидативний стрес, то в міру зниження цього показника ми можемо робити припущення про підвищення рівня АФК.

Висновки

Як свідчать отримані дані, досліджені штами відрізняються за толерантністю до кисню. Чутливість дикого штаму MC4100 до підвищеного рівня кисню в середовищі виявилась найменшою в порівнянні з похідними від нього штамми. Це підтверджує значну роль цілісності системи антиоксидантного захисту, оскільки результатом відсутності хоча б однієї з її ланок є зниження адаптивної здатності штаму до дії на нього кисню у високіх концентраціях.

1. Amabile-Cuevas, C. F., Demple, B. Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*. Two genes control a superoxide stress regulon // Nucleic Acids Res. – 1991 – Vol 19. – P.4479-4484.

2. Beyer W., Imlay J., Fridovich I. Superoxide dismutases // Prog. Nucl. Acid Res. – 1991. – Vol.40. – P.221-253.
3. Fridovich T. An overview of oxyradicals in medical biology // Advances in molecular and cellular biology. – 1998. – Vol.25. – P.1-14.
4. Halliwell, B., Gutteridge, I. M.C. Free radicals in biology and medicine // Clarendon Press, UK, 1989.
5. Imlay, J. A., Linn, S. Mutagenesis and stress responses induced in *Echerichia coli* by hydrogen peroxide // J.Bacteriol. – 1987. – Vol.169 – P.2967-2976.
6. Storz G., Tartaglia L.A., Ames B.N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation // Science. – 1990 – Vol.248. – P.189-194.
7. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // Биохимия – 2001 – С.592-609.
8. Семчишин Г.М. Активність ферментів *SoxRS* та *OxyR* регулонів *E.coli* за дії оксидативного стресу // Укр. біохім. журнал. – 2002. – Т.46. – С.167-168.

Yuriy Demyanchuk, Olexandra Abrat

EFFECT OF DIFFERENT OXYGEN LEVELS ON THE GROWTH OF *ESHERICHIA COLI* STRAINS MC4100, GS071 AND GS047

Effect of oxygen on the growth of *Esherichia coli* different strains was investigated. It was shown that *E. coli* MC4100, GS071 and GS047 are various in their sensitivity to oxygen levels in cultivation medium. *E. coli* GS071 demonstrated longer lag-phase than MC4100 and GS047. Thus, *SoxRS* regulon is responsible for adaptation of *E. coli* on high oxygen level.

*Дмитро Господарьов, Сергій Мандрик,
Уляна Русин, Лариса Паньків*

ВПЛИВ ІОНІВ ЗАЛІЗА НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ І АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Кисень є важливим елементом у живих системах, зокрема, він відіграє роль кінцевого акцептора електронів у дихальному ланцюгу. Але використання його в клітині має не тільки позитивний характер. У процесі метаболізму можуть утворюватися активовані форми кисню (АФК), такі, як супероксид-аніон, пероксид водню, гідроксильний радикал, підвищення рівня яких у клітині викликає оксидативний стрес [8]. АФК пошкоджують різні компоненти клітини – білки, ліпіди та ДНК. При цьому в клітині накопичуються продукти окисної модифікації даних сполук. Ліпіди окислюються до пероксидів, одним із кінцевих продуктів катаболізму яких є малоновий діальдегід. Ці кінцеві продукти визначаються за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти – ТБКАП) [1].