

Р. И. Юсупова, А. И. Курмаева, М. В. Потапова,
Е. М. Кулагина, В. П. Барабанов

СУСПЕНЗИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ КАК КОЛЛОИДНАЯ СИСТЕМА

Часть 2. Поверхностный заряд и электрокинетические свойства дрожжевых и бактериальных суспензий

Ключевые слова: биосуспензия, культуральная жидкость, заряд клеточной поверхности.

Измерен ζ -потенциал и показано влияние pH на поверхностный заряд.

Keywords: bio-suspension, cultural liquid, surface charge of cells.

The ζ -potential has been measured, and the effect pH on the surface charge of microorganism cells has been demonstrated.

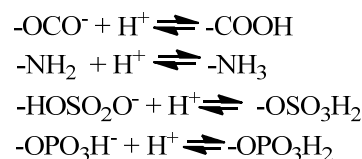
Введение

Клетки микроорганизмов, растущие в жидкой питательной среде или помещенные в буферные растворы, можно рассматривать как биосуспензию в которой дисперсной фазой будут являться клетки микроорганизмов, а дисперсионной средой – культуральная жидкость или буферный раствор [1 – 3].

Поверхность клетки (живой организм) принципиально отличается от поверхности дисперсных систем (неживой объект). Она сложна по строению и составу, неоднородна по глубине поверхностного слоя, изменяется в процессе роста организма. Через клеточную поверхность проходит пассивный и активный транспорт питательных веществ и ионов. Клеточная поверхность заряжена [4,5]. Поверхностный заряд клеток обусловлен диссоциацией кислотных и основных групп поверхности. На его величину большое влияние оказывает pH системы, в которой находятся клетки. Уменьшение величины pH ведет к снижению ионизации кислотных групп, а увеличение pH приводит к подавлению диссоциации основных групп находящихся на клеточной поверхности.

По современным представлениям [6,7], на клеточной поверхности существует «мозаика» зарядов из катионных и анионных групп. Известно, что и грамположительные и грамотрицательные бактерии несут на своей поверхности отрицательный заряд. Общий отрицательный заряд есть результат суммирования 10^7 – 10^8 отрицательных зарядов, приходящихся на одну клетку и 10^6 – 10^7 положительных зарядов. Отрицательный заряд клеточной поверхности обуславливается анионными полимерами клеточных стенок. Это в основном пептидогликан, который образует упорядоченную структуру ячеистого строения, построенную из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных β -1,4-гликозидными связями. Сонненфелд с соавт. [8] показали: а) отрицательный заряд клеточной стенки обеспечивается как фосфатными группами тейхоевых кислот, так и карбоксильными пептидогликана; б) карбоксильные группы ориентированы по направлению к внешней поверхности клеточной стенки; в) отрицательный заряд в толще клеточной стенки распределяется

асимметрично, благодаря ориентации тейхоевых кислот и пептидных субъединиц пептидогликана в направлении к ее внешней поверхности, поверх плоскости гликанового слоя. Главная функция тейхоевых кислот – сохранять высокий поверхностный заряд клеток. Долевое участие ионогенных групп белков, липидов и углеводов, входящих в состав клеточной стенки, определяет электрический заряд поверхности. Эти группы диссоциируют в растворе и поверхность приобретает электрический заряд. Основными диссоциирующими группами клеточной поверхности являются:



Электроотрицательные свойства клеточной поверхности, способствуя отталкиванию клеток друг от друга, создают благоприятные условия для распространению бактерий в окружающей среде и более эффективного использования питательных веществ.

Вокруг клетки в водной среде (аналогично дисперсным системам) образуется двойной электрический слой, который состоит из плотной и диффузной частей. Плотная часть двойного электрического слоя примыкает к заряженной потенциалопределяющими ионами поверхности клеток и образована слоем адсорбированных ионов. Эта заряженная поверхность притягивает к себе противоположно заряженные ионы (за счет Кулоновских сил), образуя диффузионную часть двойного электрического слоя. Под действием внешнего электрического поля происходит взаимное смещение фаз относительно друг друга, что приводит к образованию границы скольжения. Одним из важных параметров двойного электрического слоя является электрокинетический потенциал, или ζ -потенциал, определяемый как потенциал границы скольжения. ζ -потенциал используют часто для характеристики биологических объектов [9].

Все факторы, влияющие на величину двойного электрического слоя, изменяют и величину ζ -потенциала. Плотность заряда

варьирует от организма к организму, зависит от pH, ионного состава окружающей среды. Это свойство микроорганизмов можно использовать для измерения общего электрического заряда поверхности или изменения поверхностных свойств клеток при взаимодействии их с белками, полиамфолитами, антибиотиками, ферментами.

ξ -потенциал можно косвенно рассчитать, измеряя скорость движения клеток в электрическом поле [10]. Природа поверхностного заряда клеток исследуется с помощью зависимости электрофоретической подвижности (ЭФП) от pH, ионной силы, добавления поливалентных ионов, ПАВ, и обработки ферментами.

Величина и характер электрического заряда клеточной поверхности будут определяться долевым участием поверхностных соединений, несущих ионогенные группы. Степень диссоциации этих групп находится в зависимости от величины pH системы. Уменьшение величины pH ведет к снижению ионизации кислотных групп, а увеличение величины pH приводит к подавлению диссоциации основных групп [11].

Изучено влияние pH на поверхностный заряд клеток этанолюкисляющих дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae*. Исследована электрофоретическая подвижность клеток в системах «клетки – культуральная жидкость», «клетки – 0.85% NaCl» и «клетки – цитратно-фосфатный буфер (ц.ф.б.)» от pH. На рисунке 1 представлены зависимости изменения ξ - потенциала клеток в различных системах от pH.

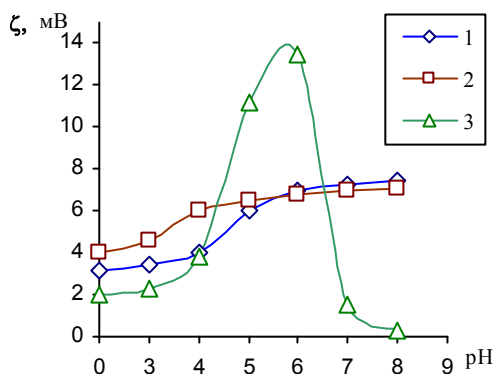


Рис. 1 - Зависимость ξ - потенциала клеток в различных средах от pH: 1 – 0.85% NaCl; 2 – цитратно-фосфатный буфер; 3 – культуральная жидкость

Видно, что в культуральной жидкости зависимость носит экстремальный характер, причем максимальный заряд клеток отвечает pH исходной дрожжевой суспензии. В модельных системах с увеличением pH происходит нарастание потенциала до определенного значения, после чего он практически не меняется. Можно предположить, что при снижении pH происходит уменьшение отрицательного заряда клеток, благодаря переходу карбоксильных групп поверхностных соединений из ионизированной формы в неионизированную и

диссоциации белковых аминокрупп, сообщаящих клеткам положительный заряд.

Проведены исследования по определению взаимосвязи устойчивости систем «клетки – 0.85% NaCl» и ξ - потенциала клеток (рис. 2).

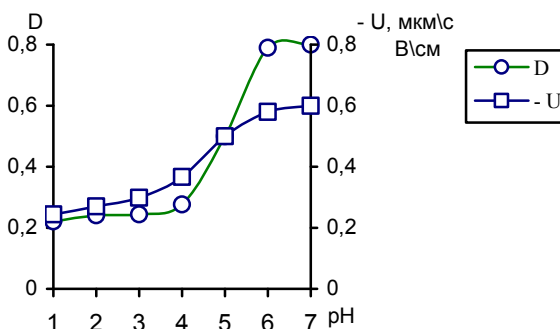


Рис. 2 - Изменение оптической плотности (D) и электрофоретической подвижности (-U) клеток в системе «клетки – 0.85% NaCl»

Потеря устойчивости биосуспензий наступает при некотором снижении электрофоретической подвижности клеток. Высокая точность и достоверность использованного метода измерения электрокинетических свойств клеток позволяет сделать заключение о том, что необходимым условием агрегации клеток является снижение их потенциала. Произведен расчет плотности клеточного заряда и числа элементарных зарядов на одну клетку при различных значениях pH. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Электрофизические характеристики дрожжевых клеток

Система	pH	Плотность заряда, (эл.ст.ед./см ²)	Число зарядов на 1 клетку, 10 ⁻⁶
Клетки – 0.85% NaCl	2.5	350	0.572
	3.0	362	0.617
	4.0	544	0.865
	5.0	578	0.912
	6.0	612	0.953
	7.0	612	0.953
	8.4	612	0.953

Как видно из таблицы, плотность поверхностного заряда клеток и число зарядов сильно зависят от pH системы. Выявлена общая закономерность нарастания этих величин с повышением pH системы. Согласно многочисленным исследованиям [5-8,12,13], заряд дрожжевых клеток обусловлен карбоксильными группами, а также amino- и фосфатными группами белков и фосфоманнанов, причем на стадии роста культуры плотность карбоксильных групп значительно превосходит плотность amino- и фосфатных группировок. Этот факт подтверждается отрицательным зарядом клеток во всем исследованном диапазоне pH. Как видно из рисунка 1, в системах «клетки – 0.85% NaCl» и «клетки –

ц.ф.б.» ξ –потенциал клеток практически не меняется в щелочном диапазоне pH систем. Это может быть объяснено тем, что в этом диапазоне pH все имеющиеся на клеточной поверхности карбоксильные группы полностью диссоциированы, а диссоциация amino- и фосфатных групп подавлена [2-4].

Проведено исследование влияние фермента РНКазы на плотность поверхностного заряда бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Установлено, что интактные клетки, взятые из середины фазы экспоненциального роста, имеют плотность электростатического заряда для *E.coli* 400 эл.ст.ед./см² а для *B. subtilis* 260 эл.ст.ед./см². Действие фермента в стимулирующих дозах резко снижает заряд грамотрицательных клеток до 225 эл.ст.ед./см², а грамположительных до 110 эл.ст.ед./см², не меняя значения в течении 60 минут.

Таким образом, адсорбция экзогенного фермента - РНКазы приводит к изменению заряда на поверхности клеток вследствие нейтрализации отрицательно заряженных групп биополимеров клеточной поверхности.

Литература

1. Шукин, Е.Д. Коллоидная химия / Е.Д. Шукин, А.В. Перцов, Е.А. Амелина.–М.: МГУ, 1982. – 348 с.
2. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: МГУ. - 1992. -96 С.
3. Шлегель Г. Общая микробиология. // Пер. с немецкого Н.В. Алексеевой и Н.Ю. Несиловой. - М.: - Мир. - 1987. - 502 С.
4. Archibald, A.R., Hancock I.C., Harwood C.R. In: Cell wall structure, synthesis, and turnover / A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C. – 1993.– P. 381 – 410.
5. Фомченко, В.М. Влияние полиэлектролитов на электроповерхностные свойства микроорганизмов / В.М. Фомченко, А.К. Ажермачев, В.А. Чугунов, П.В. Бабаева // Коллоидный журнал. – 1983. – Т. 25. – № 2. – С.273-281.
6. Seltmann, G., Holst, O. In The Bacterial Cell Wall / Hardcover, eds, Springer-Verlag, New York, Incorporated. 2002.
7. Тажибаева, С.М. Поверхностные свойства дрожжевых клеток / С.М. Тажибаева [и др.]. // Коллоидный журнал. – 2003. – Т. 65. – № 1. – С.132-135.
8. Sonnenfeld, E.M., Beveridge T.J., Koch A.L. Doyle R.J. J. Bacteriol. 1985. – V. 163. – P. 1167-1171.
9. Мирошников, А.И. Электрофизический анализ и разделение клеток / А.И. Мирошников, В.М. Фомченко, А.Ю. Иванов. // М.: Наука.–1986. – 182 с.
10. Духин, С.С. Электрофорез / С.С. Духин, Б.В. Дерягин. // М.:Наука. – 1976. – 332 с.
11. Дудкина, Л.И. Комплексное исследование электроповерхностных свойств клеток / Л.И. Дудкина, К.Г. Лерхе // Коллоидный журнал. – 1982. – Т.44. – вып. 3. – С.424-430.
12. Кулагина Е.М. Интенсификация фазового разделения в биологической системе под действием ПАВ / Е.М. Кулагина, М.В. Потапова, Р.И.Юсупова, А.И. Курмаева // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – №6. С. 225-228.
13. Кулагина, Е.М. Органическая суспензия как основа биоудобрения / Е.М. Кулагина, В.П.Барабанов, С.Ю. Егоров, М.В. Потапова // Вестник Казанского технологического университета. – 2009. – Спец. выпуск. С. 91-96.

© **Р. И. Юсупова** – канд. хим. наук, зав. лаб. каф. физической и коллоидной химии КНИТУ; **А. И. Курмаева** – канд. хим. наук, доц. той же кафедры; **М. В. Потапова** – канд. хим. наук, доц. той же кафедры; **Е. М. Кулагина** – канд. хим. наук, доц. той же кафедры; **В. П. Барабанов** – д-р хим. наук, проф. той же кафедры, barabanov@kstu.ru.