

<https://doi.org/10.3176/biol.1977.3.04>

УДК 576.8:377.1

Райво ВОКК

ИЗМЕНЕНИЯ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ *ESCHERICHIA COLI* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОЗОНА

Появление первых данных о биоцидности озона вызвало большой интерес ученых к проблеме использования его как сильного окислителя для очистки питьевой воды. В последнее время в связи с увеличением загрязненности природных водоемов эта проблема охватывает широкий круг вопросов, связанных с очисткой сточных вод и промышленных отходов. Во многих работах обсуждаются преимущества озонирования перед хлорированием, придающим питьевой воде неприятный привкус, а также обладающим менее выраженными очистительными свойствами (Bringmann, 1954; Fetner, Ingols, 1956; Diaper, 1972; Hirota и др., 1972; Черкинский, Трахтман, 1962 и т. д.). В ряде исследований, посвященных изучению биоцидности озона, приведены данные о действии его на бактерии, в частности на одну из наиболее устойчивых к озону — *E. coli* (Работнова и др., 1972; Dickermann и др., 1954; Broadwater и др., 1973), определением титра которой пользуются при оценке качества питьевой воды (т. н. колититр). Наряду с изучением чувствительности бактерий к озону требуется и более детальное исследование биохимических показателей жизнедеятельности организма под действием озона. До настоящего времени изучены лишь некоторые аспекты ферментативной деятельности микроорганизмов после воздействия озоном (Chow, Tappel, 1972, 1973; Freeman и др., 1973), а о липидном обмене под действием озона данных в литературе найти не удалось. Липиды, наряду с белками, нуклеиновыми кислотами и углеводами, являются важным структурным компонентом живого организма и необходимы для поддержания и осуществления его функций. При различных воздействиях на организм происходят различные изменения на клеточном и субклеточном уровнях, а именно нарушения мембранной системы, в частности состава фосфолипидов как важнейших компонентов биологических мембран, на которых протекают особо важные для жизнедеятельности биохимические процессы обмена и синтеза. Поэтому мы выбрали предметом наших исследований изменения количественного и качественного состава фосфолипидов *E. coli* под действием озона. В работе проведено сравнительное исследование состава фосфолипидов *E. coli* до и после воздействия озона сублетальными дозами.

Материал и методика

Культура *E. coli*, используемая в работе, выделена в секторе протозоологии Института экспериментальной биологии АН ЭССР из воды озера Юлемисте. Культуру поддерживали на плотной среде. Для получения массовой культуры использовали синтетическую питательную среду следующего химического состава (в расчете на 1 л дистиллированной воды): NH_4Cl — 2 г, Na_2HPO_4 — 6 г, KH_2PO_4 — 3 г, NaCl — 3 г, MgCl_2 — 0,01 г, Na_2SO_4 — 0,026 г, аланина — 0,2 г и глюкозы — 1 г. Время выращивания *E. coli* 24 ч. Посевным материалом служила 24-часовая культура *E. coli*, выращенная на той же питательной среде. Посевная доза составляла 25 мл инокулята на 200 мл питательной среды. Озонирование проводили с помощью лабораторного озонатора (концентрация озона в потоке воздуха 1,0 мг/л, время экспозиции 30 сек и 1 мин). Для озонирования использовалось 200 мл суспензии клеток *E. coli*. Посевным материалом после озонирования служила суспензия клеток плотностью 300 млн/мл, посевная доза составляла 5,0 мл на 200 мл питательной среды. Контролем во всех опытах служила неозонированная культура *E. coli* в той же фазе роста. Извлечение липидов проводили по методу Фолча (Folch и др., 1957), определение количественного

Таблица 1

Значения R_f отдельных фракций фосфолипидов *E. coli*

Фракция	R_f			
	Наши данные (70 : 20 : 3)	Wagner и др., 1961 (65 : 25 : 4)	Lepage, 1964 (65 : 25 : 4)	Peypoux, Michel, 1970 (70 : 24 : 3)
1	0,16			0,23
2	0,28	0,32	0,48	0,47
3	0,38	0,40	0,62	0,57
4	0,62	0,68	0,71	0,77
5	0,81		0,74*	

* Для фосфатидной кислоты.

и качественного состава отдельных фракций фосфолипидов — с помощью метода тонкослойной хроматографии на силикагеле КСК в системе растворителей хлороформ — метанол — вода в соотношении 70:20:3 с последующим определением фосфора по методу Бартлетта (Bartlett, 1959). Пятна фосфолипидов идентифицировали путем сопоставления полученных значений R_f с R_f , взятыми из литературы (табл. 1), а также с помощью цветных реакций с нингидрином (для фосфолипидов, содержащих аминогруппу) и реактивом Драгендорфа (для холинсодержащих фосфолипидов).

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Количественный и качественный состав отдельных фракций фосфолипидов изучен в неозонированной культуре (контроль), сразу после воздействия сублетальными дозами озона на суспензию клеток *E. coli*, а также в первом пассаже после озонирования (спустя 24 ч). При помощи тонкослойной хроматографии на силикагеле КСК фосфолипиды *E. coli* были разделены на 5 фракций, которые мы идентифицировали как лизосоединения (фракция 1), фосфатидилглицерин (2), фосфатидилэтаноламин (3) и кардиолипин (4). Пятая фракция осталась полностью неидентифицированной, известно лишь содержание в ней фос-

Таблица 2

Изменения количественного состава отдельных фракций фосфолипидов у *E. coli* под действием озона в концентрациях 1,0 мг/л

Фракция	Содержание от общей суммы фосфолипидов, %				
	Контроль	Экспозиция 30 сек		Экспозиция 1 мин	
		сразу после озонирования	спустя 24 ч	сразу после озонирования	спустя 24 ч
1 (лизосоединения)	1,61±0,35	3,09±0,00	3,26±0,47	13,61±1,57	8,47±2,23
2 (фосфатидилглицерин)	3,45±0,27	5,17±0,88	9,54±0,66	15,25±1,55	10,57±0,02
3 (фосфатидилэтанол-амин)	75,95±1,43	66,09±0,30	61,96±1,94	42,37±1,12	48,45±0,82
4 (кардио-липин)	15,80±0,69	14,02±1,72	22,97±1,75	18,94±0,76	20,73±2,02
5 (неидентифицирована)	2,69±0,43	12,62±3,02	3,20±0,66	9,76±0,27	11,78±2,09

фатидной кислоты. Результаты количественного анализа приведены в табл. 2. Как видно из табл. 2, более 70% суммы фосфолипидов составляет фракция фосфатидилэтаноламина, затем следует кардиолипин (около 15%). Минорные фосфолипиды (лизосоединения, фосфатидилглицерин и фракция 5) составляют менее 10%. Полученные данные хорошо согласуются с результатами, приведенными в литературе о фосфолипидном составе *E. coli* (De Siervo, 1969; Starka, Moravová, 1970). Сразу после действия озона изменяется количественный состав отдельных фракций фосфолипидов у 24-часовой культуры *E. coli*. Доза озона 0,07 мг/л, которая соответствует концентрации озона в потоке воздуха 1,0 мг/л при экспозиции в течение 30 сек, вызывает уменьшение содержания фосфатидилэтаноламина почти на 10% с одновременным увеличением содержания лизосоединений от 1,61 до 3,09% общей суммы фосфолипидов. При увеличении дозы озона до 0,11 мг/л (время экспозиции 1 мин) наблюдается более резкое уменьшение содержания фосфатидилэтаноламина (от 75,95 до 42,37%) и соответственно увеличение количества лизосоединений до 13,61%. Содержание остальных фракций фосфолипидов при экспозиции в течение 1 мин увеличивается.

При исследовании состава фосфолипидов и количественного содержания отдельных фракций аналогичные изменения наблюдались и через 24 ч после озонирования. Как и в первой генерации, так и в повторном пассаже под действием озона при экспозиции 30 сек уменьшается содержание фосфатидилэтаноламина и в то же время возрастает содержание лизосоединений. При удлинении времени экспозиции отмечается резкое уменьшение фосфатидилэтаноламина (до 48,45%) и возрастание содержания лизосоединений до 8,47%. Обнаруживается более усиленный биосинтез фосфатидилглицерина по сравнению с контролем. При последующем пересеве культуры наблюдается также усиленный биосинтез кардиолипина и сдвиг содержания пятой фракции в сторону нормализации после озонирования в течение 30 сек. Более длительная экспозиция вызывает увеличение содержания пятой фракции как сразу после озонирования, так и через 24 ч после воздействия озона на культуру *E. coli*.

Качественный состав фосфолипидов *E. coli* под действием озона не изменяется.

На основании полученных данных можно предположить, что у *E. coli* в результате озонирования в липидном обмене происходят адаптационные изменения, которые способствуют образованию более устойчивых к озону форм *E. coli*.

Требуется дальнейшее исследование характера выявленных изменений, а в частности, изучение жирнокислотного состава и процессов перекисления фосфолипидов *E. coli* под действием озона.

Автор выражает свою искреннюю благодарность старшему научному сотруднику лаборатории антибиотиков биологического факультета МГУ Сухаревой Н. Н. за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

- Работнова И. Л., Бобкова Т. С., Злочевская И. В., Чекунова Л. Н., Сомов В. С., Слезкина В. Ф., 1972. О чувствительности к озону бактерий и дрожжей. Биол. науки 2 : 86.
- Черкинский С. Н., Трахтман Н. Н., 1962. Обеззараживание питьевой воды. М. Bartlett, G. V., 1959. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234 : 466.
- Bringmann, G., 1954. Versuche zur quantitativen Bestimmung der letalen Wirksamkeit von Chlor und Ozon auf *E. coli*. Z. Hyg. 139 : 130.
- Broadwater, W. T., Hoehn, R. C., King, P. H., 1973. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. Appl. Microbiol. 26 (3) : 391.
- Chow, C. K., Tappel, A. L., 1972. An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. Lipids 7 (8) : 518.
- Chow, C. K., Tappel, A. L., 1973. Activities of pentose-shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone-exposed rats. Arch. Environ. Health 26 (4) : 205.
- De Siervo, A. J., 1969. Alterations in the phospholipid composition of *E. coli* B during growth at different temperatures. J. Bacteriol. 100 : 1342.
- Diaper, E. W. J., 1972. Ozone moves more to the fore. "Water and Wastes Eng." 9 (5) : 65.
- Dickermann, J. M., Castraberti, A. O., Fuller, J. E., 1954. Action of ozone on waterborne bacteria. J. N. Engl. Water Works Ass. 68 : 11.
- Fetner, R. H., Ingols, R. S., 1956. A comparison of the bactericidal action of ozone and chlorine against *E. coli* at 1°. J. Gen. Microbiol. 15 : 381.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226 : 497.
- Freeman, G., Stephens, R. J., Coffin, D. L., Stara, J. F., 1973. Changes in Dog's lungs after long-term exposure to ozone. Arch. Environ. Health 26 (4) : 205.
- Hiromasa, M., Norikazu, T., Takashi, I., 1972. Mitsubishi denki giho. (Очистка сточных вод озонированием) 46 (5) : 552.
- Lepage, M., 1964. J. Lipid Res. 5 : 587 цит. по Кейтс М., 1975. Техника липидологии : 268.
- Peypoux, F., Michel, G., 1970. Etude des phospholipides d'une souche sauvage et d'une souche mutante thermosensible d' *Escherichia coli*. BBA 218 : 453.
- Starka, J., Moravová, J., 1970. Phospholipids and cellular division of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 60 : 251.
- Wagner, H., Horhammer, C., Wolff, P., 1961. Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. Biochem. Z. 334 : 175.

Raivo VOKK

ESCHERICHIA COLI FOSFOLIPIIDIDE FRAKTSIOONILISE KOOSTISE MUUTUMINE OSOONI TOIMEL*Resümee*

Uuriti *E. coli* fosfolipiidide kvalitatiivse ja kvantitatiivse koostise muutumist osooni toimel. Leiti, et osooni subletaalsed kontsentratsioonid ei mõjusta *E. coli* fosfolipiidide kvalitatiivset koostist, kuid põhjustavad nende eri fraktsioonide kvantitatiivseid muutusi, ja seda mitte ainult vahetult pärast osoneerimist, vaid ka järgnevas passaažis. Sellest järeldatakse, et lipiidiainevahetuses tekib osooni toimel teatud nihkeid, mis on seotud bakterite adaptatsiooniga osoonitundlikkuse vähenemise suunas.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalsbioloogia Instituut

Toimetusse saanud
28. X 1976

Raivo VOKK

PHOSPHOLIPIDS COMPOSITION OF OZONE-EXPOSED *ESCHERICHIA COLI**Summary*

The quantitative and qualitative compositions of phospholipid fractions of ozone-exposed *E. coli* were studied. Sublethal doses of ozone did not cause any changes in different phospholipid species, but there were remarkable changes in their quantities. This was noticed both in the bacteria fractionated immediately after ozone-exposition as well as during their following passage in ozone-free conditions. These observations have led us to the hypothesis that ozone may cause adaption changes in the lipid metabolism of *E. coli*, which in turn decreases their sensitivity to the action of ozone.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Oct. 28, 1976