

ХЕМОТАКСИС БАКТЕРИЙ

Л. Ю. ЗАВАЛЬСКИЙ

Государственный научный центр прикладной микробиологии, пос. Оболенск Московской обл.

BACTERIAL CHEMOTAXIS

L. Yu. ZAVALSKY

Bacterial chemotaxis is the motor reaction of cells in response to the action of chemical substances. The signal system and the nature of bacteria's motion are now quite well studied, and can serve as a model of the behavior of more complex organisms in a changing environment.

Хемотаксис бактерий – это двигательная реакция клеток в ответ на действие химических веществ. Сигнальная система и характер движения бактерий к настоящему времени исследованы довольно подробно и могут служить прообразом для поведения более сложных организмов в изменяющихся условиях окружающей среды.

ВВЕДЕНИЕ

Хемотаксисом называют движение подвижных микроорганизмов, растений и животных, а также подвижных клеток (лейкоцитов, сперматозоидов) под влиянием химических веществ. Поскольку одним из важных признаков организма является его способность двигаться и обмениваться веществом с окружающей средой, без преувеличения можно сказать, что хемотаксису в той или иной степени подвержены все живые формы.

Несмотря на малые размеры (около 1 мкм), бактериальная клетка имеет весьма сложную морфологическую структуру. ДНК бактерии *E. coli* содержит 5 тыс. генов, из которых сто ответственны за подвижность и хемотаксис. Это означает, что в строительстве клетки и ее функционировании участвуют тысячи белков, около ста из которых формируют двигательный и хемочувствительный аппарат. Системные отношения между структурами простой бактерии столь сложны, что не поддаются самому мощному компьютерному анализу. Тем не менее основные закономерности движения бактерий к настоящему времени изучены довольно подробно.

За последние три десятилетия исследование хемотаксиса микроорганизмов вылилось в самостоятельную область биологии прокариот, добившуюся значительных успехов как в понимании биофизических и молекулярно-биохимических процессов, лежащих в основе бактериальной подвижности и хемотаксиса, так и в развитии специфических приемов и методов исследования.

КАК ДВИЖУТСЯ БАКТЕРИИ

С изобретением микроскопа ученым открылся еще один путь проникновения в неизведанное. Именно изобретатель микроскопа голландский натуралист Антони ван Левенгук в 1675 году обнаружил с помощью своего детища и зарисовал подвижные одноклеточные микроорганизмы – бактерии. Слово “бактерия” в переводе с греческого означает “палочка”. Многие бактерии и впрямь имеют вытянутую форму и похожи на

палочки. Гораздо более интересным, однако, представляется вопрос, с помощью чего, каким образом бактериям удастся поддерживать высокую подвижность в водном растворе.

Ответить на этот вопрос удалось много лет спустя, когда техника микроскопии развилась настолько, что стало возможным увидеть на клетке тела бактерии нитеподобные отростки, в несколько (иногда в десятки) раз превышающие по длине размеры самой бактерии. Эти отростки, получившие название “жгутики” (другие названия: “флагеллы”, “филаменты”), и являются органами движения бактерий в жидкой среде. Роль жгутиков как органов движения клетки может быть продемонстрирована простым экспериментом: если у подвижных клеток механическим воздействием отделить жгутики от клеток, то последние теряют подвижность. Однако, если условия культивации остаются неизменными, а клетки не получили существенных повреждений, рост жгутиков возобновляется, причем их нормальное число и длина восстанавливаются за время одной клеточной генерации. По мере роста жгутиков клетка начинает двигаться. Поступательное движение многожгутиковых бактерий восстанавливается только после того, как жгутики достигнут определенной, пороговой длины.

Число и характер расположения жгутиков на поверхности различных видов бактерий изменяются в широких пределах. Жгутики могут располагаться поодиночке или группами (пучками), распределяться по всей поверхности клетки или концентрироваться в одном месте (рис. 1). Однако в рамках одного вида характер флагелляции, как правило, является постоянным, генетически устойчивым показателем, часто используемым при классификации бактерий (*E. coli* относится к классу политрихов и имеет в норме 5–6 жгутиков).

АТТРАКТАНТЫ И РЕПЕЛЛЕНТЫ

Уже Левенгук открыл способность бактерий скапливаться вокруг кусочков пищи. Однако целенаправленные исследования хемотаксиса были начаты лишь в конце XIX века. В частности, Пфедер предложил простой количественный способ измерения хемотаксиса. В его работах были заложены основы терминологии и впервые использована классическая методика подсчета числа бактерий, входящих в капиллярную трубку, заполненную раствором исследуемого вещества.

Химические вещества, привлекающие микроорганизмы, получили название аттрактантов, а отталкивающие — репеллентов. Само же явление двигательной реакции микроорганизмов на химический раздражитель получило название “хемотаксис”. Наилучшими аттрактантами и репеллентами оказались органические вещества: сахар, аминокислоты, спирты. Кроме того, характер хемотаксической реакции сильно зависел от природы испытуемого химического соединения и изучаемого вида бактерий. Исследования Рочерта показали, что движение на аттрактанты можно избирательно подавлять, ингибируя реакцию на мясной экстракт повышением концентрации этилового спирта или хлороформа.

Исследования по хемотаксису, предпринятые в конце XIX века, носили разрозненный характер и не привели к созданию широкого направления исследований, что, по-видимому, было связано с отсутствием в то время серьезной техники и научной основы, позволившей бы достигнуть определенного успеха в понимании явления. Дальнейшие исследования хемотаксиса фактически прекратились вплоть до 60-х годов XX столетия.

В начале 60-х годов проблемой хемотаксиса заинтересовался Адлер. В качестве основного объекта он избрал кишечную палочку *E. coli*, для которой структурные особенности и биохимические процессы были наиболее детально изучены. Он применил и усовер-

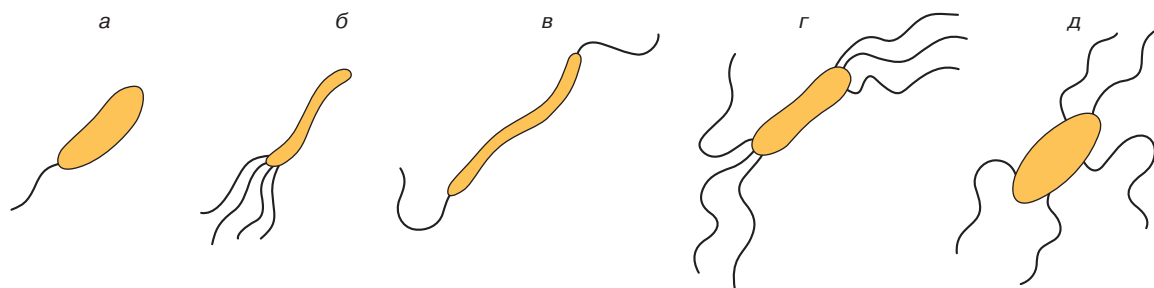


Рис. 1. Классификация бактерий по характеру расположения жгутиков на поверхности клетки: а – монополярные монотрихи, б – монополярные политрихи, в – биполярные монотрихи, г – биполярные политрихи, д – политрихи

шенствовал метод капилляра, ранее использованный Пфедфером. Адлер впервые доказал наличие у бактерий специфических белков-рецепторов, опознающих определенные химические вещества — аттрактанты и репелленты [1]. Это послужило толчком к серии биохимических и генетических исследований природы бактериальных хеморецепторов, выполненных в начале 70-х годов XX века главным образом в лабораториях Адлера и Кошланда.

В 1972 году Берг и Браун сконструировали микроскоп, автоматически следящий за движением отдельных бактерий. Генетические и биохимические данные по хемотаксису существенно дополнились детальными сведениями о характере движения бактерий. Было показано, что при отсутствии пространственных или временных изменений концентраций аттрактантов и репеллентов бактерии движутся по гладким траекториям (со скоростями примерно 10–20 мкм/с), останавливаясь и кувыркаясь примерно через равные промежутки времени (~1 с). После кувыркания (длящегося около 0,1 с) бактерия начинает плыть в направлении, не зависящем от предыдущего. В общем картина движения бактерии напоминает броуновское движение частиц — случайные блуждания с некоторой средней длиной пробега (рис. 2).

Как выяснили Берг и Браун, при наличии пространственных изменений концентрации аттрактантов или репеллентов частота кувырканий, а следовательно, и длина свободного пробега бактерии изменяются. Длина свободного пробега бактерии, плывущей в сто-

рону возрастающей концентрации аттрактанта, увеличивается, а при движении в сторону возрастающей концентрации репеллента уменьшается. Аналогичную картину наблюдали и при изменении концентрации хемоэффекторов во времени (ими была сконструирована специальная камера, обеспечивающая заданное повышение и понижение концентрации вещества), а именно: при увеличении концентрации аттрактантов продолжительность периодов относительно ровного плавания бактерий увеличивалась, а при увеличении концентраций репеллентов уменьшалась. Таким образом было показано, что бактерии “помнят” предшествующие значения концентрации определенных веществ и меняют характер движения при их изменениях.

КТО ИЗОБРЕЛ КОЛЕСО

Берг и Андерсон в 1973 году первыми выдвинули гипотезу о механизме бактериального движения: причиной перемещения бактерий служит винтообразное вращение флагелл. В том же году Сильверманом и Саймоном экспериментально была доказана правильность этой гипотезы, а также исследовано действие хемоэффекторов на направление вращения жгутиков. Оказалось, что повышение концентрации аттрактантов приводит к росту вероятности вращения флагелл против часовой стрелки, а повышение концентрации репеллентов — к повышению вероятности противоположного направления вращения.

Смена направлений вращения приводит к резким изменениям характера взаимодействия жгутиков друг с другом. Математический анализ динамики взаимодействия жгутиков, выполненный американским исследователем Макнабом, показал, что при вращении против часовой стрелки несколько флагелл, имеющих форму левосторонней спирали, могут образовывать единый тяж без перекручиваний. Такая картина и наблюдается экспериментально. При смене направления вращения такой тяж должен был бы перепутаться, однако фактически происходит перестройка флагелл. При вращении по часовой стрелке флагеллы меняют свою форму: вместо левой спирали с крупным шагом возникает правая спираль с мелким шагом и тяж распадается (рис. 3), бактерия останавливается и начинает кувыркаться. При последующей смене направления вращения флагелл вновь образуются левоспиральные структуры, они снова формируют тяж и бактерия начинает плыть в новом направлении.

Таким образом было установлено, что изменения химического состава среды, детектируемые специфическими белками-рецепторами, приводят к формированию внутриклеточных сигналов, управляющих режимом переключения направлений вращения флагелл. При движении клетки вдоль направления с возрастающей

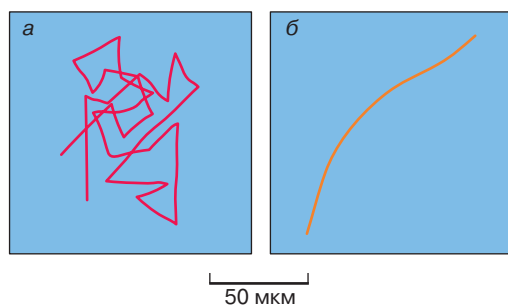


Рис. 2. Движение бактерии аналогично движению молекулы газа: траектория подвижной клетки представляет собой несколько относительно прямолнейных участков, соответствующих фазе “плавания”, соединенных между собой точками дезориентации, соответствующих фазе “кувыркания” клетки на месте. Мутанты *che-*, лишенные способности кувыркаться, плавают по ровным плавным траекториям, а лишенные способности плавать не передвигаются вовсе, лишь осаждаются под действием сил гравитации: *а* — траектория движения нормальной клетки, *б* — движение мутанта, лишенного способности кувыркаться

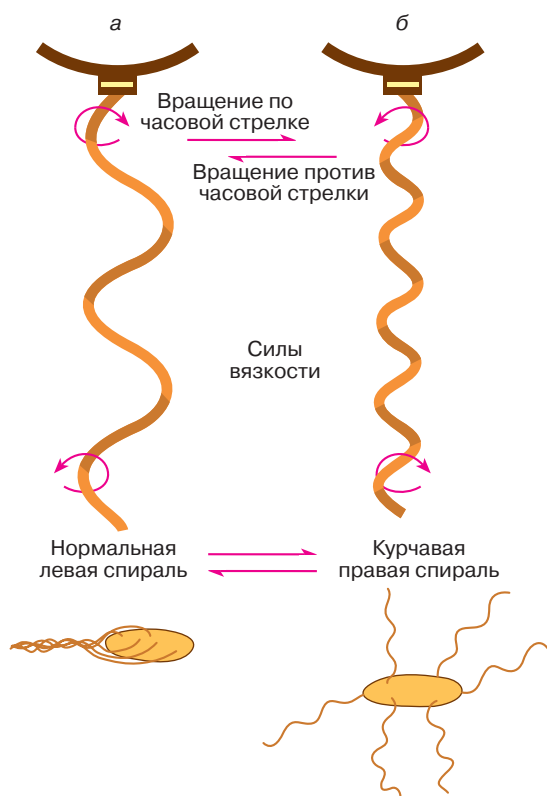


Рис. 3. Полный переход между нормальной левоспиральной формой филамента, соответствующей фазе плавания клетки (а), и (б) курчавой правоспиральной формой, соответствующей кувырканию клетки, в вязкой среде при перемене направления вращения флагаелл

концентрацией аттрактанта или убывающей концентрации репеллента удлиняется интервал, на котором происходит вращение флагаелл против часовой стрелки, и дольше существует синхронно вращающийся тяж. Все это время бактерия плывет примерно в одном направлении, и длина свободного пробега в этом направлении возрастает.

В противоположной ситуации (убывание концентрации аттрактанта или рост концентрации репеллента) происходит более быстрое переключение на вращение по часовой стрелке. Тяж распадается. Бактерия останавливается и кувырывается на месте. При последующем восстановлении тяжа движение с большей вероятностью будет происходить в другом направлении. В результате бактерии избегают мест с повышенным содержанием репеллентов и группируются в местах с наивысшими концентрациями аттрактантов.

Модель работы флагаеллярного мотора была предложена в 1978 году советскими исследователями А.Н. Гла-

голевым и В.П. Скулачевым. Согласно этой модели, вращение жгутика объясняется электростатическим взаимодействием между подвижной роторной белковой структурой жгутика и неподвижно закрепленным в мембране статорным белковым комплексом — настоящее подобие современного электродвигателя [2]. Таким образом, приписываемое человеку изобретение колеса было осуществлено в природе задолго до появления человека.

СИНХРОННОЕ ПЛАВАНИЕ “ПОД МУЗЫКУ” ХИМИЧЕСКИХ ВОЛН

Знание особенностей движения отдельных бактериальных клеток при хемотаксисе и поведения популяции в целом позволило в рамках математической модели связать эти движения воедино с целью более полного анализа и выявления как характеристик движения популяций на основе знания особенностей движения отдельных клеток, так и для решения обратной задачи расчета характеристик движения индивидуальной клетки из общей картины движения [3]. В известном смысле хемотаксис бактерий можно толковать как взаимодействие бактериального и химического полей. Химическое поле вызывает пространственное перераспределение популяции клеток, ее смещение в сторону аттрактантов и удаление от репеллентов. Бактериальное поле оказывает действие на химическое тем, что бактерии попросту съедают необходимые им компоненты и меняют окружающее химическое пространство.

В природе чаще встречается ситуация, когда аттрактант одновременно является и метаболизируемым (усваиваемым) субстратом для клетки. Популяция бактерий, помещенная в раствор такого вещества, выедает субстрат и образует так называемый градиент (концентрационный перепад) аттрактанта, вдоль которого популяция передвигается с помощью хемотаксиса, продолжая выедать субстрат. Это похоже на змейки огня в сухой траве по весне, когда пламя фронтом завоевывает невыгоревшие участки пространства. Вернемся к опытам Адлера с капиллярной трубкой. Что в действительности происходит, когда капилляр, содержащий одну-единственную аминокислоту (например, L-серин), погружают в суспензию подвижных бактерий? Аминокислоты, как правило, являются одновременно и хорошими аттрактантами и хорошими метаболитами для клеток. Бактерии, выедая аминокислоту, в результате хемотаксической реакции проникают внутрь капилляра и волной движутся вдоль него, отслеживая фронт неутрализованного субстрата (рис. 4).

На рис. 4 видны две бактериальные полосы, образующиеся в капилляре вследствие хемотаксиса. Почему две, а не одна и может ли их быть больше? Образование двух полос в данном случае объясняется тем, что

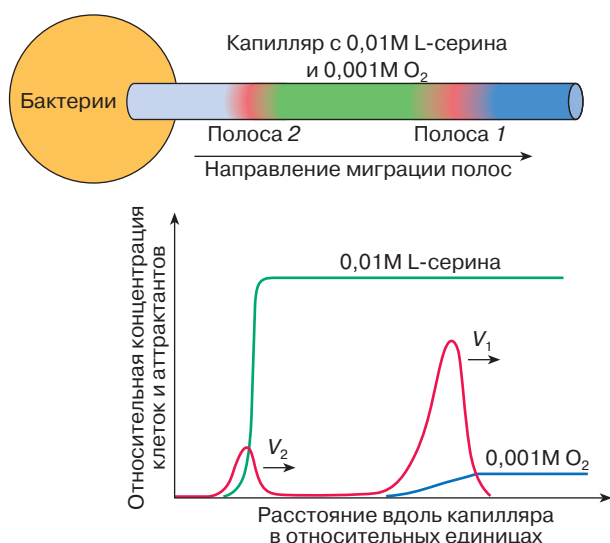


Рис. 4. Образование и миграция двух бактериальных полос *E. coli* K12 в положительной хемотаксической реакции на растворенный в воде молекулярный кислород в концентрации 0,001 М (полоса 1) и L-серин в концентрации 0,01 М (полоса 2). Сначала формируется первая полоса, мигрирующая вдоль капилляра со скоростью V_1 , на ней – вторая, двигающаяся со скоростью V_2 . $V_1 > V_2$. Картинка зафиксирована через 1 ч после погружения капилляра с исследуемым раствором в суспензию бактерий

кроме положительной аттрактивной реакции на L-серин бактерии еще реагируют на растворенный в воде кислород, который также является для них аттрактантом. Таким образом, при реакции на два вещества культура расслаивается на две части: одна порция клеток, в которой реакция хемотаксиса происходит быстрее, отделяется от основной массы и “убегает” вперед, тогда как другая порция следует за ней с меньшей скоростью. Количество, объем (определяемый числом бактерий в полосе), форма и скорости движения бактериальных полос определяются множественными факторами: концентрацией клеток и субстратов, скоростью утилизации субстратов, хемотаксическими характеристиками клеток популяции – они могут быть учтены в математической модели образования и движения полос [3].

В рассматриваемом случае (см. рис. 4) бактериальная полоса 1 (большая по размерам) соответствует реакции на градиент растворенного в воде кислорода (так называемый аэротаксис), тогда как меньшая по размерам и следующая за ней бактериальная полоса 2 движется точно по градиенту анаэробно утилизируемого клетками L-серина. Нетрудно понять, что скорость движения бактериальных полос в данном случае определяется скоростью потребления кислорода и аминокислоты, то есть соотношением числа бактерий в полосе с

концентрацией вещества, роль хемотаксиса сводится к тому, чтобы поддерживать наивысшую концентрацию бактерий строго на границе субстрата.

Еще один способ исследования хемотаксиса базируется на предсказанной теорией изменении светорассеяния ориентирующихся при хемотаксисе клеток. Эта экспресс-методика позволяет количественно и качественно измерять хемотаксическую реакцию в пределах одной минуты. Лабораторные исследования и математические модели ограничиваются в основном одномерным хемотаксисом для гомогенной популяции бактерий одного вида и одного или двух экзогенных (внешних) источников энергии. В природе все значительно сложнее. Взять хотя бы пример симбиотического взаимодействия ризосферных бактерий рода *Rhizobium* с корнями растений. Бактерии хемотаксически реагируют на экссудат (выделения) корневой системы и скапливаются в ризосферной зоне толщиной около 100 мкм. Бактерии *Rhizobium* сами по себе неспособны фиксировать атмосферный азот, но делают это совместно с корнями бобовых, заражая корни и вызывая образование корневых клубеньков. В сочетании друг с другом клетки бобовых и бактериальные клетки способны усваивать азот из атмосферы, и не последнюю роль в таком содружестве играет хемотаксис бактерий. Несмотря на все различия естественных и лабораторных условий, в них много общего, а именно волновой характер (при отсутствии активного перемешивания) распространения бактериальных популяций. В результате метаболизма и хемотаксиса формируются приграничные зоны – химические фронты, вдоль которых сосредоточиваются “бактериальные подразделения”, которые ведут активную борьбу за экзогенные источники энергии в пограничных областях. Если же добавить сюда внешние пополнения источников субстрата и другие виды бактерий, а также учесть рост и гибель клеток, картина химической войны живого и неживого будет выглядеть еще сложнее. Так и происходит в природе, где процессы ассимиляции и диссимиляции порождают бесконечную вереницу борьбы за жизнь, включая простейших.

ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМОТАКСИСА БАКТЕРИЙ

Экология микроорганизмов, мониторинг окружающей среды, биосенсорика – вот далеко не полный перечень дисциплин, где хемотаксис бактерий мог бы найти применение. Дело в том, что хемотаксическая система бактерий очень чувствительна к малейшим изменениям жизненно важных химических компонентов окружающей среды и порог хемосенсорной чувствительности составляет миллионные и даже миллиардные доли молярной концентрации таких веществ. Недаром хемотаксическая система бактерий способствовала и способствует выживанию видов в ходе эволюции. Как

и любая другая жизненно важная функция, система хемотаксиса бактерий не существует сама по себе, независимо от других функций организма. Установлена тесная связь системы хемотаксиса с дыхательной системой клетки, с процессами метилирования—демети-лирования трансмембранных белков (МСР-белков), с фосфотрансферной системой ФТС (ответственной за энергетические процессы, связанные с переносом фос-фатной группы), с уровнем внутриклеточного рН, цик-лического гуанозинмонофосфата (цГМФ) (рис. 5).

В пояснение к схеме следует подчеркнуть, что ос-новные хеморецепторы — это интегральные трансме-мбранные белки, выступающие с обеих сторон клеточ-ной мембраны. Эти белки помимо хемосенсорной вы-полняют функцию переносчиков через мембрану оп-ределенных химических соединений. При контакте со стимулирующим веществом эти белки претерпевают конформационные изменения, приводящие к актива-ции следующих звеньев переработки хемотаксического сигнала. Многочисленными исследованиями было ус-тановлено, что нормально функционирующие белки в ходе рецепции подвергаются процессу метилирова-ния—демети-лирования, за что они и получили назва-ние метилакцептирующих (МСР на схеме). Другой важный рецептор к сахарам — так называемый фер-мент II глюкозофосфотрансферной системы, прочно связанный с мембраной и катализирующий фосфори-

лирование сахаров фосфорилированным белком. Не исключена возможность, что и некоторые интеграль-ные белки других систем могут каким-то образом изме-нять уровень того или иного переключателя флагелл. Влияние некоторых стимулов (таких, например, как концентрация внутриклеточного рН) на переключат-ель мотора может быть непосредственным, в обход ос-новной системы. Многие звенья цепи управления хе-мотаксисом к настоящему времени изучены довольно подробно вплоть до уровня пространственных струк-тур и конформационных изменений участвующих в ней белков, другие только изучаются.

Известно, что загрязнение окружающей среды полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) в виде промышленных выбросов предприятий химической и нефтехимической промышленности пред-ставляет собой серьезную угрозу здоровью населения и природе. Оказывается, биодеградация ПАУ микроор-ганизмами идет интенсивнее в ризосферной сфере рас-тений, примыкающей к корню, чем непосредственно в почве. Сами же микроорганизмы скапливаются у кор-ней растений благодаря хемотаксису. Знание законов хемотаксиса бактерий может помочь в решении важ-ных вопросов утилизации промышленных отходов.

В заключение коротко остановимся на наруше-нии хемочувствительности под действием некоторых химических веществ. Кроме упомянутых этанола и

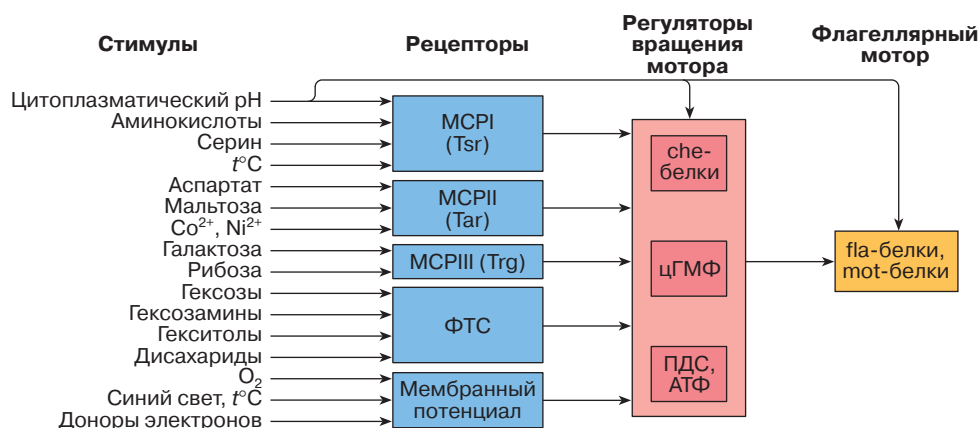


Рис. 5. Схема основных путей управления и передачи информации в бактериальной клетке. Первые обнаруженные и изученные Адлером пути рецепции проходят через интеграль-ные белки МСР I, II и III. Рецептором для некоторых сахаров выступает интегральный белок — фермент II фосфотрансферной системы, обозначенный на схеме как ФТС-рецептор (кро-ме фермента II в таксисе принимают участие и некоторые другие белки ФТС); che-белки входят в состав мембранного комплекса бактериального мотора и отвечают за функ-цию хемотаксиса; цГМФ — внутриклеточный уровень циклического гуанозинмонофосфата, игра-ющего важную роль в качестве центрального регулятора хемотаксиса; ПДС — протондви-жущая сила; АТФ — внутриклеточная концентрация аденозинтрифосфата; fla- и mot-белки формируют структуру базальной части жгутика, выступающей в роли ротора флагеллярно-го мотора

хлороформа хемотаксис блокируют бензол, ацетон, многие виды антибиотиков, а также различные вещества наркотического действия, анестетики, адреналин, ацетилхолин. Механизм их действия самый различный. Скорость расщепления бактериями некоторых органических соединений также коррелирует с их хемотаксической способностью. Например, морские бактерии активно расщепляют альбумин и казеин. Однако воздействие микроскопическими концентрациями углеводородов, толуола, фенола, отходами нефти, 2-4-дихлорфеноксиацетата, О-О-дихлорбифенила сильно ингибирует это процесс. В то же время такие малые концентрации практически не оказывают прямого пагубного действия на жизнедеятельность микрофлоры. Основной эффект их действия, по-видимому, сводится к подавлению хеморецепторной активности.

Таким образом, разнообразные загрязнения пресноводных и морских водоемов даже в малых концентрациях могут привести к серьезным нарушениям экологического баланса. При таких малых концентрациях это в первую очередь связано с нарушениями в работе хемосенсорных систем микроорганизмов. Возникшая в связи с этим новая область изучения микробиологических сообществ в последние годы получает интенсивное

развитие. Исследования в живой природе дополняются разнообразными лабораторными экспериментами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adler J.* Chemotaxis in Bacteria // *Ann. Rev. Biochem.* 1975. Vol. 44. P. 341–356.
2. *Скулачев В.П.* Электродвигатель бактерий // *Соросовский Образовательный Журнал.* 1998. № 9. С. 2–7.
3. *Завальский Л.Ю.* Кинетический анализ хемотаксиса бактерий // *Биофизика.* 1988. Т. 33, № 2. С. 328–332.

Рецензент статьи А.Н. Тихонов

* * *

Леонид Юлианович Завальский, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Государственного научного центра прикладной микробиологии. Область научных интересов – системный анализ биологических процессов, математическое моделирование бактериального хемотаксиса. Автор более 30 научных работ, двух изобретений, двух учебников и монографии.