

М. А. АЛИХАНИЯН, С. М. МАРТИРОСОВ

ТРАНСПОРТ H^+ , Na^+ и K^+ У БАКТЕРИЙ

Исследование транспортных систем микроорганизмов, ответственных за перенос ионов и поддержание их неравномерного распределения между клеткой и средой, привлекательно по крайней мере с двух точек зрения. Во-первых, имеется возможность получать клетки с заданными нарушениями отдельных звеньев систем переноса и, во-вторых, искать связь между этими нарушениями и геномом. Поэтому в последние несколько лет заметно возрос интерес к механизмам, регулирующим движение ионов через бактериальные мембраны. Так же как на тканях высших животных, здесь идет параллельное исследование общих характеристик потоков ионов через мембрану и АТФ-азной активности мембранных фракций.

Еще в 1961 г. по тщательно разработанной методике пламеннофотометрического анализа внутриклеточных концентраций ионов Na^+ и K^+ Шульцу и Соломону [23, 27] удалось выяснить зависимость внутриклеточных концентраций ионов натрия и калия от фазы роста *E. coli*. Было показано, что в стационарной фазе роста внутриклеточные концентрации натрия выше, чем калия (табл. 1), что прямо противоположно обычному соотношению концентраций этих ионов в клетке. Однако в логарифмической фазе роста происходит постепенная замена внутриклеточного натрия на калий среды и устанавливается обычная высокая внутриклеточная концентрация калия и низкая натрия. Даже при очень низкой концентрации калия во внеклеточной среде, равной 0,05 мМ, клетка способна поддерживать распределение ионов K^+ , равное 3700:1 [27]. На рис. 1 представлен характер этого обмена для логарифмической фазы роста *E. coli*. Особенностью этого обмена является поглощение гораздо большего количества ионов K^+ , чем выведенных ионов Na^+ т. е. не наблюдается эквивалентного обмена. Создается впечатление, что K^+ частично поглощается либо в обмен на какой-то другой катион, выводимый из клетки, либо входит в клетку вместе с хлором, так как концентрация Cl^- у *E. coli* поддерживается на довольно высоком уровне—приблизительно 25% от общего количества анионов клетки. Однако из табл. 1 видно, что в этот же период концентрация Cl^- в клетке падает.

Следует заметить, что в период логарифмической фазы роста происходит одновременное усиление метаболизма клетки, что может свидетельствовать о связи между химической активностью и энергозависимым переносом ионов. Было установлено, что, когда *E. coli* росли в среде с

Таблица 1
Внутриклеточные концентрации Cl^- , Na^+ и K^+ у *Escherichia coli* [3]

Фазы роста	Cl_0^*	Cl_i^*	Cl_0/Cl_i	Na_0	Na_i	Na_i/Na_0	K_0	K_i	K_i/K_0
Стационар- ная	25	$21,2 \pm 0,6$	1,18	145	177 ± 4	1,22	5	$11,2 \pm 1,0$	2,2
	50	$44,5 \pm 2,0$	1,12	170	188 ± 3	1,11	5	$9,6 \pm 1,1$	1,9
	75	$68,1 \pm 3,6$	1,10	145	165 ± 4	1,14	5	$13,0 \pm 1,1$	2,6
	100	$69,9 \pm 1,0$	1,43	170	148 ± 1	0,85	5	$28,3 \pm 0,5$	5,7
Логарифми- ческая	25	$8,3 \pm 1,5$	3,0	145	81 ± 2	0,56	5	217 ± 5	43,4
	50	$17,1 \pm 0,9$	2,9	120	70 ± 2	0,58	5	224 ± 8	44,8
	75	$23,7 \pm 3,0$	3,2	145	80 ± 4	0,55	5	227 ± 5	45,4
	100	$33,5 \pm 1,7$	3,0	170	89 ± 8	0,52	5	257 ± 1	51,5

* Индексы 0 и i обозначают концентрации в среде и в клетке соответственно.

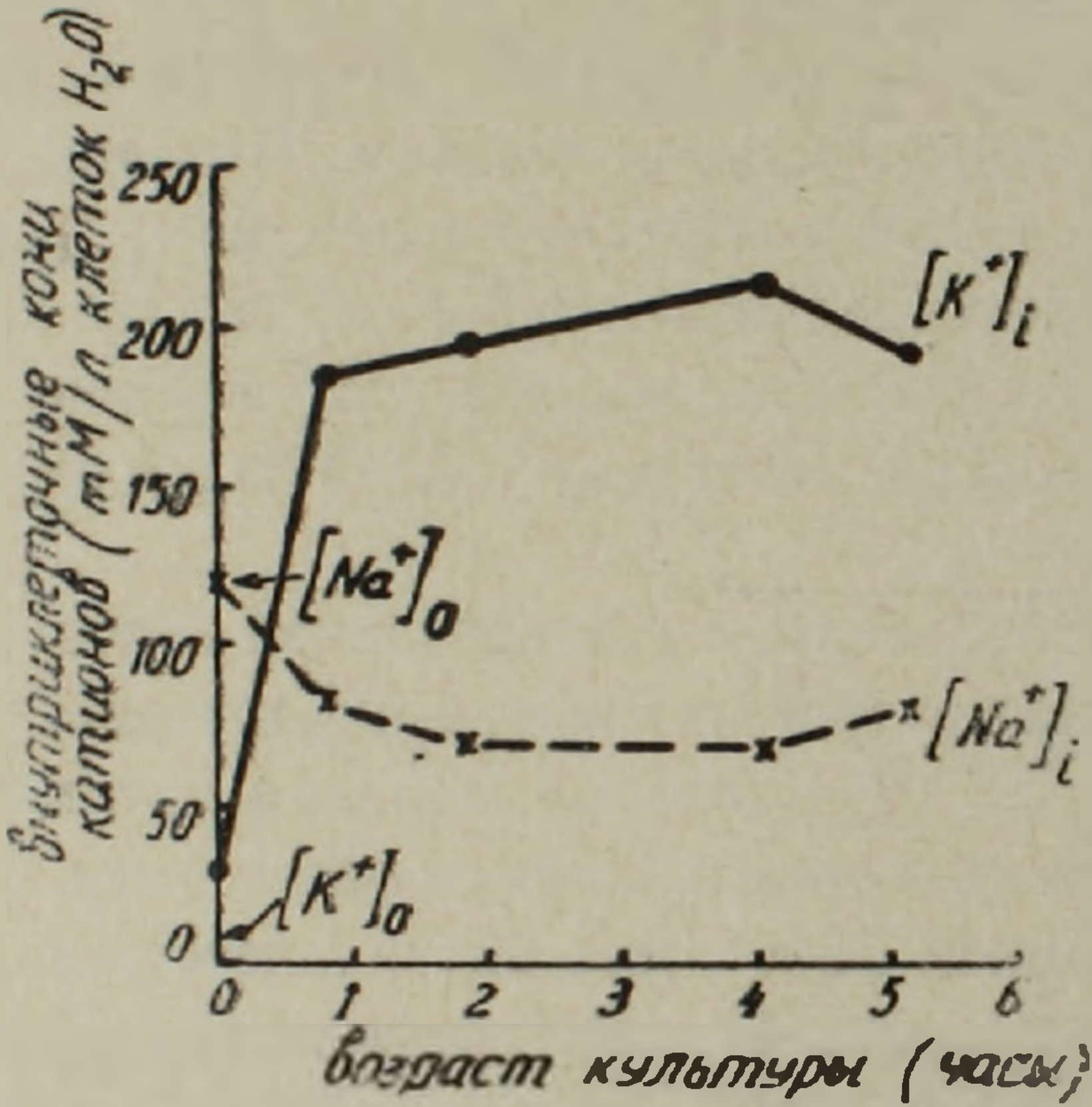


Рис. 1. Поглощение K^+ и выведение Na^+ у 48-час. культуры *E. coli* в среде, содержащей 5 мг-ион K^+ /л. рН изменялся от 7,0 до 6,6 [23].

Таблица 2
Начальные скорости катионных потоков, секреции лактата и кислоты [34]

Измерения	Без ионов K^+	С ионами K^+
	ммоль/л клеток	H_2O в 1 мин
H^+		
Лактат	67 ± 3 67 ± 4	206 ± 5 145 ± 6
H^+	5 ± 5	61 ± 7
K^+ поглощение	0	139 ± 10
выведение	0	93 ± 10
$\text{K}^+ - \text{Na}^+$	0	46 ± 14

низкой концентрацией калия, экспоненциальный рост бактерий продолжался до тех пор, пока клетки не обеднялись сильно ионами K^+ [6]. Дальнейший рост продолжался с уменьшенной скоростью в соответствии с уменьшением клеточного калия. Такие клетки отличаются значительными метаболическими нарушениями [31]. В результате добавления K^+ в суспензионную среду наблюдается быстрое поглощение K^+ , восстанавливается нормальный клеточный метаболизм, а также экспоненциальный рост.

Детальное исследование, проведенное Зерленго и Шульцем [34] на *Streptococcus faecalis*, выявило ряд очень существенных фактов связи транспорта катионов с ростом бактерий и метаболизмом. Обычно *S. faecalis* поддерживают внутриклеточные концентрации K^+ и Na^+ соответственно 550 и менее 5 мМ, когда растут экспоненциально в среде, содержащей около 5 мг-ион K^+ /л и 150 мг-ион Na^+ /л. Если клетки в стационарной фазе выдержать предварительно в безкалиевой среде, то будет происходить значительное возрастание внутриклеточного Na^+ и уменьшение K^+ . Перенесение этих клеток в нейтральные среды, содержащие обязательно субстрат гликолиза и ионы калия, ведет к крутому обмену между Na^+ клетки и K^+ среды (рис. 2). Здесь прежде всего бы-

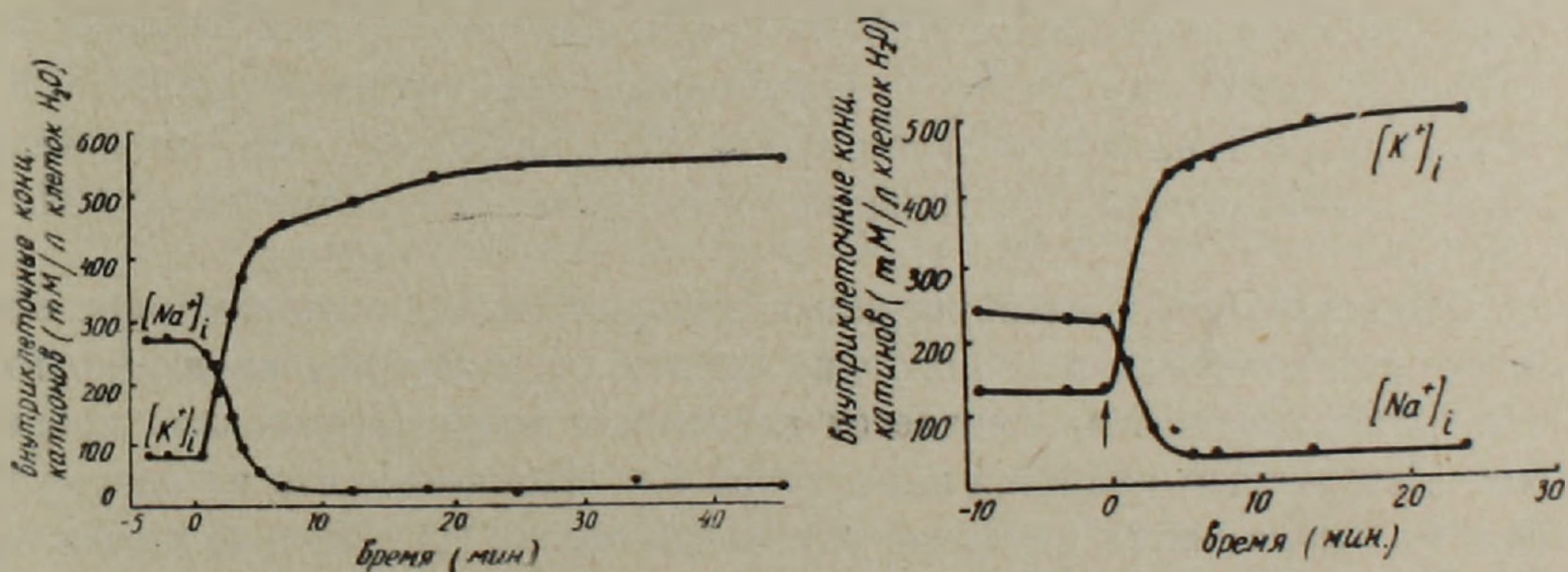


Рис. 2. Изменение внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ у *S. faecalis*, с низкой исходной концентрацией K^+ и высокой Na^+ , после добавления в среду 20 мМ глюкозы (а) или 10 мМ KCl (б) [34].

ло установлено, что между химическим циклом гликолиза для анаэробных клеток *S. faecalis*, $Na^+ - K^+$ — обменом и числом вырабатываемых молекул АТФ имеется прямая связь. Однако выведенное количество Na^+ было эквивалентно только 60% поглощенного K^+ . Еще ранее были получены доказательства того, что в дрожжевых клетках [22] имеет место обмен H^+ клетки на K^+ среды. Непрямые доказательства $H^+ - K^+$ — обмена были получены на *E. coli*. Было показано, что концентрация 30 мМ Na полностью подавляет выведение Na из *E. coli*, в то время как поглощение K^+ уменьшается только на 20%. При сдвиге pH суспензии *E. coli* от 4,5 до 8,0 выведение Na^+ существенно не изменяется, но аккумуляция K^+ возрастает в 8 раз в течение часа после сдвига pH [27]. Таким образом, можно было предположить, что обычно наблюдаемая

неэквивалентность в $K^+ - Na^+$ —обмене покрывается выведением H^+ из клетки.

Известно, что в логарифмической фазе роста *S. faecalis* поддерживают значительно более щелочное рН, чем в наружной среде. Гликолиз ведет к выработке молочной кислоты, т. е. к постоянному производству лактата и H^+ . Чтобы поддерживать постоянное рН, клетке необходимо удалять ионы водорода. Табл. 2 наглядно показывает увеличение секреции протонов и лактата из клетки в обмен на ионы K^+ наружной среды. Если при этом учесть, что бактериальные мембраны непроницаемы для ионов водорода [5, 33], а также то обстоятельство, что ионы водорода и натрия переносятся против своих химических градиентов, то необходимо предположить существование в бактериальных мембранах специальных транспортных систем, осуществляющих обмен ионов.

Таким образом, бактериальные клетки характеризуются двумя типами обменов ионов: Na^+ клетки на K^+ среды и H^+ клетки на K^+ среды.

Большое количество работ по выяснению связи метаболизма с переносом ионов, а также построению возможной модели транспорта катионов через бактериальные мембраны было выполнено Гарольдом с соавторами [10—17]. Установлено [17], что мембраны *S. faecalis* позволяют свободно обменивать Na^{22} на немеченый Na^+ , хотя обычно эти клетки не аккумулируют Na^+ . Очень интересно, что даже при 5 мМ K^+ не подавлялось начальное поглощение Na^+ клетками, что свидетельствует, по-видимому, о независимости каналов проницаемости для Na^+ и K^+ .

Эксперименты с антибиотиками, которые создают на мембране «каналы» для катионов, позволяют, по мнению этих авторов, предположить, что выталкивание Na^+ является первичным энергозависимым процессом, а вторичным является накопление K^+ . Показано, что на аккумуляцию K^+ мало влиял монактин или валиномицин [11, 12], в то время как переносчик протонов тетрахлорсалициланилид блокировал катионный обмен. Гарольдом с соавторами была предложена схема ионного обмена на бактериях, изображенная на рис. 3.

Предполагается, что у бактерий имеется два типа насосов: одна энергозависимая транспортная система откачивает ионы Na^+ из клетки, другая—ионы водорода, которые создают в клетке щелочное рН, низкую концентрацию натрия и потенциал, негативный относительно наружной среды, т. е. оба насоса электрогенны. Ионы калия наружной среды по градиенту электрического поля распределяются между средой и клеткой так, что концентрация ионов калия в клетке становится намного выше, чем в наружной среде. Доказательств того, что бактериальная клетка заряжается отрицательно, в настоящее время еще не имеется. Однако Слейман [24, 25] методом микроэлектродного отведения разности электрических потенциалов на мембране показал, что мембранный потенциал *Neurospora crassa* зависит от метаболизма. Исходная величина мембранного потенциала была равна 200 мв и уменьшилась до 25 мв за

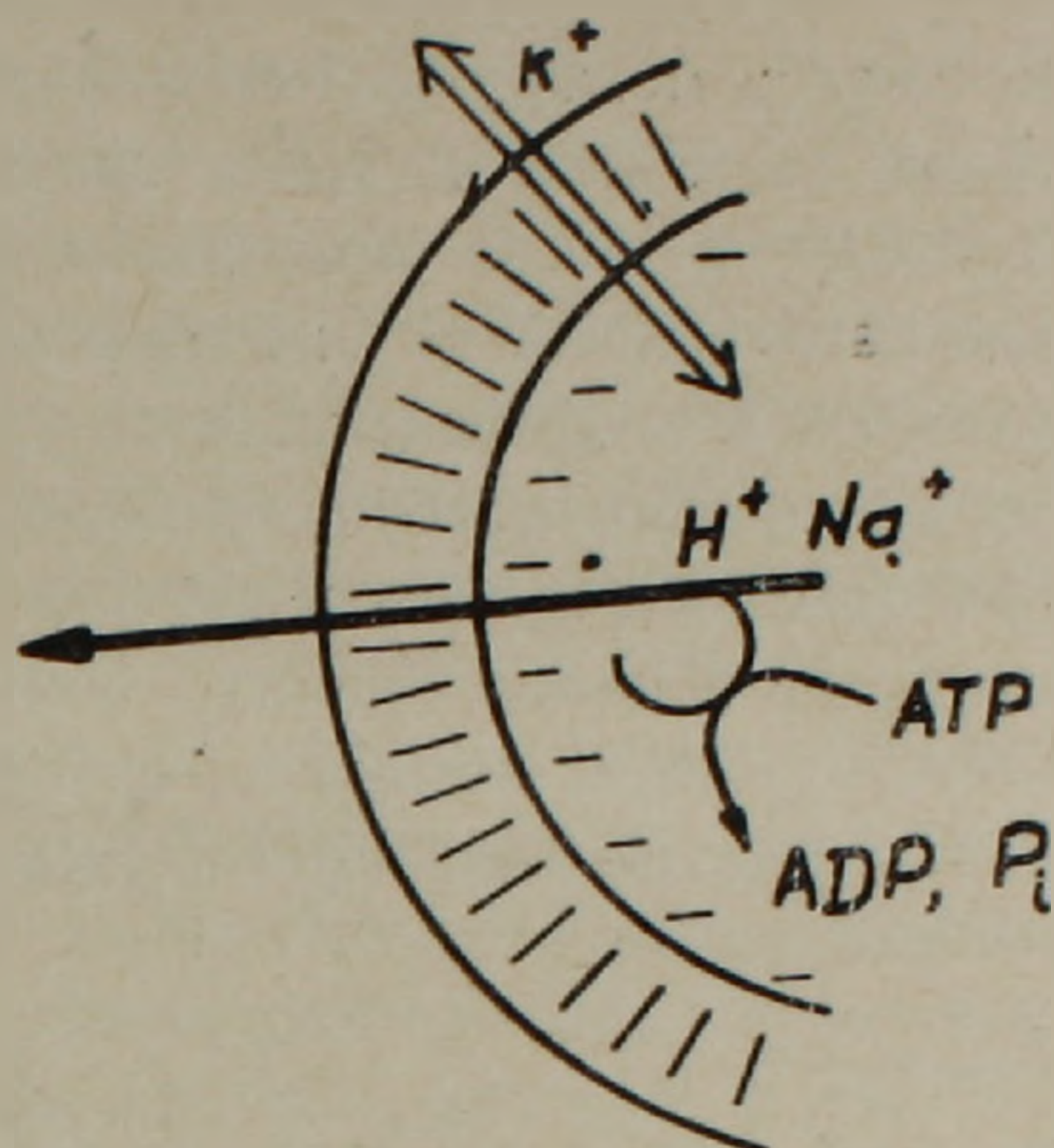


Рис. 3. Катионный транспорт у *S. faecalis*. Схематически показано энергозависимое выведение H^+ и Na^+ , которое является первичным процессом.

K^+ аккумулируется пассивно по градиенту электрического поля [17].

30 сек при аппликации цианида или азиды. По-видимому, указанный потенциал создается непрерывным электрогенным выведением H^+ из клетки. Непосредственным измерением уровня АТФ в клетке было установлено, что при добавлении 10^{-3} М цианида в раствор постоянная времени снижения концентрации АТФ от 3 мМ до 0,3 мМ была равна 5,4 сек, и с той же постоянной времени происходило уменьшение мембранного потенциала [26]. Этот факт является лишь косвенным доказательством предложенной схемы обмена ионов на бактериальных клетках (рис. 3). Имеются трудности и другого характера. Необходимо постулировать, что натриевый насос бактерий не похож на натриевый насос высших животных, так как не подавляется оубаином. Подавление общей АТФ-азы на 30% добавлением оубаина в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М было получено Соломоном [28], однако эти данные не подтвердились [цит. по 9]. Попытка выделить мембранные фракции с $Na^+ - K^+$ АТФ-азой пока безрезультатны. Mg^+ АТФ-аза была показана у нескольких разновидностей бактерий: *E. coli* [7], *B. megaterium* [30], *S. faecalis* [2]. Эта АТФ-аза активируется порознь ионами K^+ или Na^+ , однако ее характеристики отличны от $Na^+ - K^+$ АТФ-азы [1]. Только Хавкеншейду и Бонтингу [9] удалось получить такую $Na^+ - K^+$ АТФ-азу, очень небольшой активности, когда фракции обрабатывались мочевиной. Однако сами авторы пока не уверены в том, что это и есть истинная $Na^+ - K^+$ АТФ-аза, участвующая в транспорте катионов.

Как мы уже указывали, для понимания многих фактов, характеризующих активный транспорт ионов через мембраны, перспективным является исследование мутантов, дефектных по какому-либо одному «транспортному признаку».

Гарольдом с соавторами был описан класс мутантов *Strept. faecalis* 687А, генетический дефект которого заключался в неспособности обменивать H^+ клетки на K^+ среды [16, 17]. При этом они хорошо обме-

нивали K^{42} на K^+ через свои мембраны. Как показано на рис. 4, клетки мутанта 687А, полностью загруженные Na^+ , гликолизуют довольно хорошо при рН, равной 6,2, и легко обменивают K^+ на Na^+ . Однако клетки, предварительно нагруженные H^+ , не гликолизуют при той же рН среды и не накапливают K^+ . Дефектность по удалению протонов ведет к одновременному понижению восприятия фосфатов и аминокислот. Этими авторами [16] был получен мутант и другого типа, генетический дефект которого заключался в неспособности обменивать Na^+ клетки на K^+ среды. Этот класс мутантов, нагруженных Na^+ , не способен обменивать эти ионы на K^+ среды. При этом рН клеток был равен 8,2, т. е. H^+ —насос работал нормально.

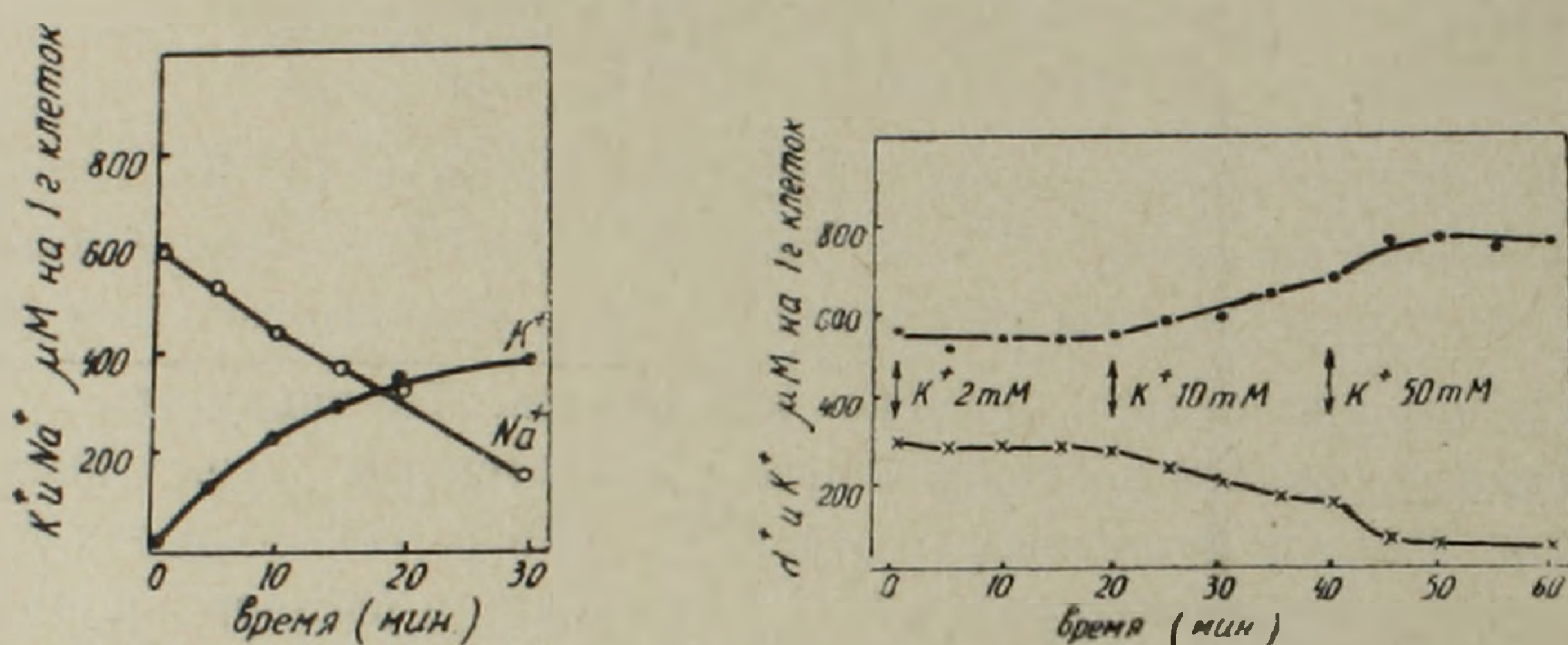


Рис. 4. а — обмен K^+ на Na^+ мутантом *S. faecalis* 687А, дефектным по H^+ — K^+ — обмену. б — тот же мутант очень плохо обменивает H^+ клетки на K^+ среды [17].

Мутанты, дефектные по накоплению K^+ , можно разбить на два класса: к первому классу относятся мутанты, у которых изменена пассивная проницаемость по K^+ , т. е. они не способны обменивать ^{42}K на K^+ , ко второму классу (представляющему особый интерес) принадлежат мутанты, способные легко обменивать ^{42}K на K^+ , но не обладающие способностью к накоплению K^+ в клетке, вследствие дефектов в активной транспортной системе обмена H^+ или Na^+ клетки на K^+ среды [4, 6, 10—13].

Несмотря на то, что уже сейчас мы можем дифференцировать характер обменов в бактериальных клетках, ряд данных свидетельствует о том, что схема процесса, представленного на рис. 3, требует уточнения. В частности, переносчики протонов блокируют обмен Na^+ на K^+ [16], т. е. создается впечатление, что выталкивание протонов из клеток является первичным процессом.

Имеются многочисленные примеры бактериальных ферментных систем, которые регулируются репрессией или дерепрессией в ответ на наличие или отсутствие субстрата, т. е. когда синтез фермента не конститутивный, а индуцируемый. Примером такой регуляции может служить *lac*-оперон *E. coli*, принцип работы которого установили Жакоб и Моно [19]. Недавно появились свидетельства, что некоторые механизмы бактериального транспорта могут регулироваться подобным же образом

[18, 29]. Гольдманом с соавторами [6] показано, что если в суспензию клеток *E. coli*, предварительно обедненных калием, добавить калий, то наблюдается резкое начальное увеличение потока K^+ . Но добавление в среду ингибитора белкового синтеза хлорамфеникола ограничивало начальный поток K^+ . К сожалению, авторами не был установлен тип обмена ($H^+ - K^+$ или $Na^+ - K^+$), с которым было связано подавление K^+ потока. Кроме того, не ясно, почему в более ранних экспериментах [28] хлорамфеникол не подавлял поглощения K^+ в сходных экспериментальных условиях.

На основании вышеизложенного можно считать доказанным, что транспортные системы у бактерий имеют ряд принципиальных особенностей по сравнению с клетками высших животных. Прежде всего это относится к наличию водородного насоса, играющего центральную роль в поддержании неравномерного распределения H^+ , K^+ и Na^+ между бактериями и окружающей средой. Кроме того, у бактерий, по-видимому, имеется более тесная связь между транспортом ионов и метаболизмом клетки. В свою очередь возможность получить нормально развивающиеся штаммы, имеющие «дефекты» транспорта, расширяет методологические приемы, с помощью которых можно определить границы, в которых нарушения регуляции ионного транспорта не сказываются летально на жизнедеятельности клетки. И в этом смысле исследование транспортных систем бактерий имеет общебиологическое значение.

Ереванский физический институт

Поступило 12.X 1971 г.

Մ. Ա. ԱՐԻԱՆՅԱՆ, Ս. Մ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՈՎ

H^+ , Na^+ և K^+ ՏԵՂԱՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հոդվածում բերված են բազմաթիվ փորձերում տեղի ունեցող էներգետիկ պրոցեսներից կախված H^+ , Na^+ և K^+ տեղափոխության վերաբերյալ ներկայիս տվյալները և մոդելները: Բնութագրված են երկու տիպ իոնական միոցներ, որոնք բնորոշ H^+ և Na^+ իոնները տեղափոխում են արտաքին միջավայր, փոխանակվելով նրանց միջավայրի կալիում իոններով:

Քննարկվում է այդ պրոցեսների բիոքիմիական և գենետիկական կողմերը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лисовская Н. П. Успехи биологической химии. 8, 93, 1967.
2. Abrams A., McNamara P., Jonson F. B. J. Biol. Chem. 235, 3659, 1960.
3. Cirillo V. P. Bact. Rev. 30, 1, 68, 1966.
4. Damadian R. J. Bact., 95, 113, 1968.
5. Gilbl A. R., Few A. V. BBA, 30, 421, 1968.
6. Goldman D., Schultz S. G., Epstein W. BBA, 130, 546, 1966.
7. Güntner Th., Dorn F. Z. Naturforschung, 216, 1076, 1966.

8. Güntner Th., Dorn F. Z. Naturforschung, 216, 1082, 1966.
9. Hafrenscheld J. C. M. and Bonting S. L. BBA, 151, 204, 1968.
10. Harold F. M., Baarda J. R. Biochemistry, 6, 3107, 1967.
11. Harold F. M., Baarda J. R. J. Bacteriol., 94, 53, 1967.
12. Harold F. M., Baarda J. R. J. Bacteriol., 95, 816, 1968.
13. Harold F. M., Baarda J. R. J. Bacteriol., 96, 2025, 1968.
14. Harold F. M., Baarda J. R., Baron C., Abrams A. J. Biol. Chem., 244, 2261, 1969.
15. Harold F. M., Baarda J. R., Baron C., Abrams A. BBA, 183, 129, 1969.
16. Harold F. M., Harold R. L., Baarda J. R., Abrams A. Biochemistry, 6, 177, 7, 1967
17. Harold F. M., Baarda J. R., Pavlasova E. J. Bact., 101, 152, 1970.
18. Inui Y. and Akedo H. BBA, 94, 143, 1965.
19. Jakob F., Monod I. J, Molec. Biol., 3, 318, 1961.
20. Lubin M. and Ennis H. L. BBA, 80, 614, 1964.
21. Lubochinsky B., Meury J. and Stolkowski J. Compt. Rend., 258, 5106, 1965.
22. Rothstein A. and Ennis L. H. J. Cellular Comp. Physiol, 51, 562, 1958.
23. Schultz S. G. and Solomon A. K. J. Gen. Physiol., 45, 355, 1961.
24. Slayman C. L. J. Gen. Physiol., 49, 69, 1965.
25. Slayman C. L. J. Gen. Physiol., 49, 93, 1965.
26. Slayman C. L. Third Bioph. Congress.
27. Solomon A. K. Proc. Intern Bioph. Consress, Stockholm, 1961.
28. Solomon A. K. Biophys J., 2, 79, 1962.
29. Vogel H. J. PNAS, 46, 488, 1960.
30. Welbull C., Greenawalt J. W. and Low H. J. Biol. Chem., 237, 847, 1962.
31. Weiden P. L., Epstein W. and Schultz S. G. J. Gen. Physiol., (Цит. по [6]), 1966
32. Willis D. B. and Ennis H. L. J. Bacteriol., 96, 2035, 1968.
33. Zarlengo M. H. and Abrams A. BBA, 71, 65, 1963.
34. Zarlengo M. H. and Schultz S. G. BBA, 126, 308, 1966.