

М. А. АЛИХАНЯН, С. М. МАРТИРОСОВ, Л. С. ПЕТРОСЯН

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРА ДВИЖЕНИЯ ИОНОВ ВОДОРОДА, КАЛИЯ И НАТРИЯ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ КАТИОНСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

В работе показаны возможности использования метода одновременного определения активностей ионов калия, натрия и водорода для анализа кинетики обмена ионов у бактерий. Учитывая значительное отношение поверхности к объему у бактериальной суспензии, метод позволяет определять небольшие изменения в характере транспорта этих ионов.

Определение внутриклеточной концентрации ионов методом пламеннофотометрического анализа [6, 8] и наблюдения за перемещением изотопов через клеточные мембраны [4, 5] позволили решить ряд серьезных вопросов, связанных с транспортными системами бактерий [1, 7]. Каждый из указанных выше методов исследования обладает рядом неоспоримых преимуществ. Однако при решении некоторых задач имеется необходимость как в многочасовом одновременном наблюдении за транспортом всех ионов, так и в регистрации изменений в короткие интервалы времени (например, 1—2 мин). Кроме того, визуальное постоянное наблюдение за характером переноса ионов позволило бы во время эксперимента вводить в среду вещества, влияющие на транспорт, и наблюдать кинетику их действия.

Исходя из этого, в данной работе предлагается использовать метод, основанный на том, что отношение поверхности к объему у бактериальной суспензии достигает значительных величин ($\sim 10^5 \text{ см}^{-1}$), и даже небольшие изменения в переносе ионов можно достаточно четко видеть по изменению их активности в наружной среде.

Методика. Определение изменений активности ионов калия и натрия, а также pH наружной среды производилось с помощью макроэлектродов, изготовленных из соответствующих катионселективных стекол на кафедре физической химии Ленинградского государственного университета.

Электроды, чувствительные к K^+ и Na^+ , были изготовлены из стекол фирмы Jenaer Glaswerk Schotta & Gen. (Mainz) и имели константы селективности: калиевый электрод $K_{\text{K/Na}} = 1:4$ и натриевый электрод $K_{\text{Na/K}} = 1:1000$. Водородный электрод был изготовлен из стекла КСТ. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, приготовленный на 3М КСl, сваренном на агаре.

Поглощение и выведение ионов бактериями определялось по изменению их активностей в среде потенциометрическим методом. Чтобы наблюдать небольшие изменения активностей, потенциал электродов компенсировался на выходе с регистрирующего прибора, так что записывающий прибор показывал лишь изменения исходной актив-

ности ионов в омывающей бактерии среде в виде изменений электродных потенциалов ΔE_K , ΔE_{Na} и ΔpH . Приборами, регистрирующими электродные потенциалы, служили высоковольтные милливольтметры (рН-метры типа ЛПУ-01), а запись производилась на самопишущем потенциометре типа КСП-4. Дрейф нуля не превышал допустимый для указанных приборов. Весь опыт проходил в измерительной термостатируемой камере в объеме 20 мл при температуре 37°C.

Для экспериментов был использован штамм *Streptococcus faecalis* ССЕВ-079 (грам-положительный), который хранился на агаровых чашках (МПА и РА). Прямо с этих чашек бактерии инокулировались в жидкую ростовую среду следующего состава [7]: дифко-триптон—1,0%, дифко-дрожжевой экстракт—0,5%, глюкоза—56 мм, Na_2HPO_4 —60 мм и аргинин солянокислый—30 мм; рН среды был 7,5—7,6. Бактерии выращивались в термостате при 37° в течение 18—20 час. После этого 400 мл суспензии дважды отмывались в дистиллированной воде центрифугированием при 3000 об/мин × 20 мин. Затем бактерии концентрировались в 200 раз, и уже 2 мл клеточной суспензии в воде добавляли к 18 мл раствора, находящегося в измерительной камере при 37°. Через несколько минут и в конце опыта из камеры отбиралось 0,1 мл суспензии для снятия титра. Обычно титр сохранялся в пределах $(2 \div 5) \cdot 10^9$, и при превышении этого количества наблюдалась гибель бактерий до указанного максимального титра. Основной экспериментальный раствор содержал KCl —1 мм; $NaCl$ —1 мм; трис—0,2 м; H_3PO_4 —50 мм; $MgSO_4$ —0,4 мм при рН, 7,8. Глюкоза добавлялась в раствор в период опыта по мере необходимости.

Результаты и обсуждение. На рис. 1. приведен многочасовой эксперимент, характеризующий связь между переносом ионов водорода и натрия из клетки и поглощением ионов калия. В первые 1,5 час. в растворе отсутствовала глюкоза и, естественно, не наблюдалось энергозависимого выхода H^+ из бактерий. При этом ионы калия покидали бактериальные клетки с достаточно высокой скоростью. Добавление глюкозы в среду привело к тому, что бактерии стали выводить H^+ в обмен на поступающие в клетку ионы K^+ . Когда же клетки набрали высокую внутриклеточную концентрацию калия к 3 час., дальнейшее энергозависимое выведение H^+ стало необходимым для поддержания этой высокой концентрации от 3 до 4 час. и т. д. Выход же ионов Na^+ из клеток заканчивался в первые 5—7 мин [8].

Достаточно удовлетворительно можно проследить также за характером сопряжения между переносом H^+ и поглощением K^+ бактериальными клетками. Добавление в среду 0,1 мМ ТТФБ (тетрахлор—2-трифторметилбензимидазол), уменьшающего абсолютную величину мембранного потенциала [3], приводит к эффекту, представленному на рис. 2. Согласно гипотезе Гарольда с соавторами [5], в мембранах бактерий имеется водородный насос, который энергозависимо и электрогенно транспортирует H^+ из клетки в среду. Образуется разность потенциалов на мембране с отрицательным потенциалом на ее внутренней стороне. Ионы калия поступают в клетку по градиенту этого электрического поля. Как из рис. 1, так и из рис. 2 следует, что только при выведении H^+ из клеток наблюдается поглощение K^+ . Когда в среду вводится ТТФБ (рис. 2), величина мембранного потенциала резко уменьшается и, следовательно, исчезает сила, удерживающая ионы калия в

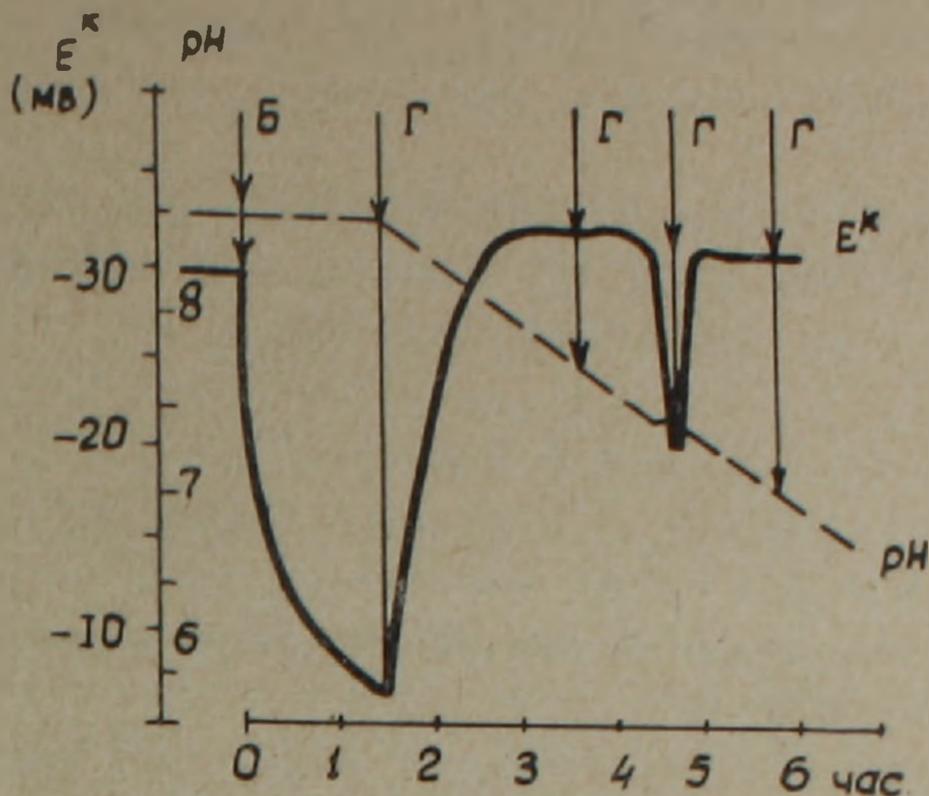


Рис. 1. Обмен H^+ клеток *S. faecalis* на K^+ — наружной среды. Среда содержит $1 \text{ мг-ион } K^+ / \text{л}$; E^k — потенциал калиевого электрода; $t^\circ = 37^\circ$; Б — бактерии; Г — глюкоза.

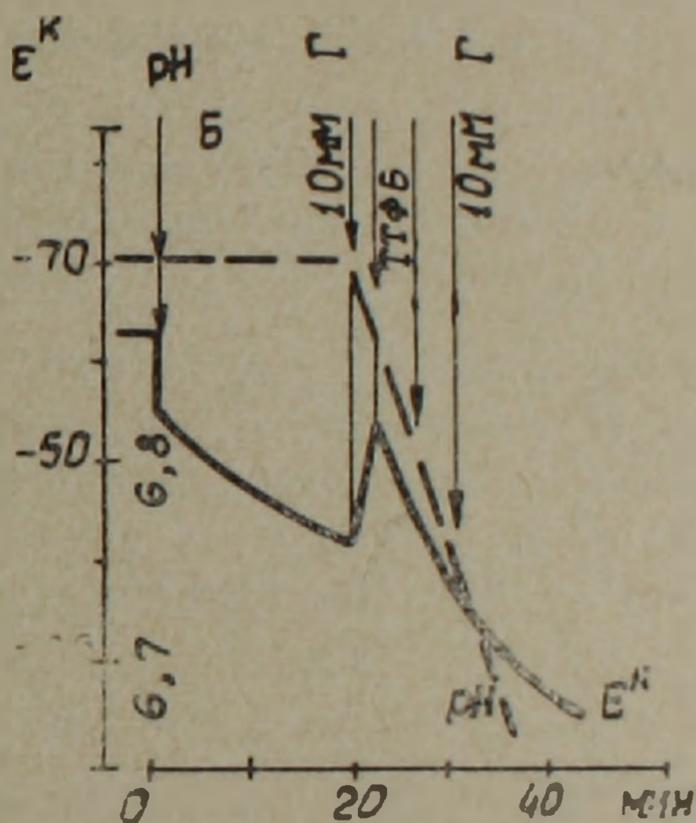


Рис. 2. Разобщение поглощения ионов калия от выделения ионов водорода у *S. faecalis* с помощью 10 М ТТФБ (тетрафтор-2-трифторметилбензимидазол). E^k — потенциал калиевого электрода; $t^\circ = 37^\circ$; Г — глюкоза.

клетке, что ведет к резкому их выходу в среду. При этом аппликация ТТФБ не влияет на работу H^+ -насоса.

Таким образом, с помощью катионселективных электродов возможно вполне просто и наглядно продемонстрировать ряд феноменов, приущих транспорту ионов у бактерий [1].

В настоящей работе указаны лишь качественные возможности метода. Однако можно произвести и количественный анализ, используя обычные уравнения для определения активностей [2].

Մ. Ա. ԱԼԻԽԱՆՅԱՆ, Ս. Մ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՈՎ, Լ. Ս. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ

ՋՐԱԾՆԻ, ԿԱԼԻՈՒՄԻ ԵՎ ՆԱՏՐԻՈՒՄԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ՇԱՐԺՄԱՆ ԲՆՈՒՅԹԻ
ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄԵՄԲՐԱՆՈՒՄԻ ԿԱՏԻՈՆԸՆՏՐՈՂԱԿԱՆ
ԷԼԵԿՏՐՈՂՆԵՐԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Աշխատանքում ցույց է տրված բակտերիալ բջիջներում ջրածնի, կալիումի և նատրիումի իոնների շարժման բնույթի միաժամանակյա որոշման մեթոդի կիրառման հնարավորությունը:

Հիմնվելով բակտերիալ սուպենդիոնի մակերեսի և ծավալի հարաբերության զգալի մեծության վրա մեթոդը հնարավորություն է տալիս որոշել այդ իոնների տեղափոխության մեջ առաջացող փոքր փոփոխությունները:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ալիխանյան Մ. Ա., Մարտիրոսով Ս. Մ., Биологический журнал Армении, 25, 8, 57, 1972
2. Белюстин А. А., Лев А. А. Сб. Химия в естественных науках, 32, 1965.
3. Симосян А. Л., Адамян С. Я., Мартиросов С. М. Сб. Биофизика мембран, Каунас, 1, 708, 1971.
4. Harold F. M., Baarda J. R. J. Bact., 96, 2025, 1958.
5. Harold F. M., Baarda J. R., Pavlasova E. J. Bact., 101, 152, 1970.
6. Schultz S. C., Solomon A. K., J. Gen. Physiol., 45, 355, 1961.
7. Solomon A. K. Biophysic. J., 2, 79, 1962.
8. Zurlengo M. H., Schultz S. C. BBA, 126, 303, 1966.