

ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ КЛЕТКАМИ
 STREPTOCOCCUS FAECALIS И ESCHERICHIA COLI

С. С. ДУРГАРЬЯН, С. М. МАРТИРОСОВ, Л. С. ПЕТРОСЯН

Изучались особенности обмена ионов подорода клетки на ионы калия среды у грамположительных бактерий *Streptococcus faecalis* ВКМ В-602 и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* К-12 (А). Установлены зависимости величины и скоростей поглощения калия и секреции протонов от свойства внешней среды. Экспериментальные результаты находят наиболее полное объяснение, если допустить существование активной аккумуляции ионов калия бактериями.

Транспорт протонов играет важную роль в трансформации энергии и секреции кислоты у микроорганизмов. Сейчас накопилось большое количество данных, доказывающих наличие протонных насосов в мембранах этих объектов [1]. Значительно хуже изучена природа поглощения калия у микроорганизмов, где эти ионы играют важную роль в регуляции осмотического давления клеток. Для грамположительных бактерий предполагается, что их протонный насос является электрогенным и в период своей деятельности генерирует разность потенциалов на мембране в (—200) мв, а ионы калия по градиенту этого поля втягиваются в клетку, распределяясь пассивно между бактериями и средой [2]. Для грамотрицательных организмов допускалось, что насос электронеутрально обменивает один протон клетки на один ион калия среды с затратой энергии АТФ, что приводит к накоплению ионов калия [3]. Кроме того, в отношении *E. coli* установлено, что насос включается и ответ на изменение осмотического давления среды [4, 5]. Более детальный анализ показал, что, по-видимому, у *E. coli* через насос переносятся два иона водорода из клетки в среду и один ион калия в обратном направлении, следовательно, он в данном случае электрогенен [6]. Таким образом, понески доказательств в пользу активного поглощения ионов калия бактериями в настоящее время становятся целесообразными. Экспериментальные данные настоящей работы легче интерпретируются с точки зрения энергозависимого поглощения калия.

Материал и методики. В опытах использовались бактерии *Streptococcus faecalis* ВКМ В-602 и *Escherichia coli* К-12 (А). Культуры хранились на косяках рыбкостного агара под слоем вазелинового масла при температуре 3—5° и ежемесячно пересеивались. Ростовая среда, в которой выращивались *E. coli* до поздней стационарной фазы (46—52 час.) при 37° без аэрации, представляет собой водный раствор 2%-го пептона, 0,5%-го NaCl, 0,2%-го K₂HPO₄ и глюкозы.

Условия выращивания *St. faecalis* описывались ранее [7].

Бактериальные клетки осаждались центрифугированием и течение 20 мин при $n=3600$ г, отмывались и вновь осаждались при тех же условиях центрифугирования. 2 мл сконцентрированной бактериальной суспензии вносились в 18 мл экспериментального раствора, основу которого составляли фосфатный буфер (H_2PO_4 и $C_4H_{11}NO_3$), хлориды калия и натрия и сульфат магния. Источники питания—глюкоза или молочная кислота—добавлялись по мере необходимости. В течение всего опыта экспериментальная ячейка находилась в контролируемых термостатических условиях (12, 25 и 37°).

В качестве отмывочных растворов использовалась дистиллированная вода и растворы сахарозы различных концентраций.

Если бактерии переносятся из одной среды в другую с той же точностью, такой перенос является изотоническим, а осмотический шок, испытываемый клетками, равен нулю. При переносе бактерий из среды с более низким в среду с более высоким осмотическим давлением клетки подвергаются положительному осмотическому шоку. Если точность второй среды меньше, чем первой, клетки испытывают отрицательный осмотический шок.

Осмотичность растворов определялась расчетами.

Концентрация бактерий в 1 мл жидкой среды определялась числом бактерий на твердые питательные среды с последующим подсчетом колоний. В процессе подготовки концентрированной бактериальной суспензии возрастала в 20 раз. Такая высокая концентрация бактерий, близкая к M -титру, исключает деление клеток и обеспечивает постоянство их числа, что подтверждалось специальными тестами [8]. Кроме того, было установлено, что в процессе центрифугирования и отмывок, ведущих к созданию различных осмотических шоков, клетки не погибают. Такого рода проверки исключают возможность зависимости изменения активности ионов во внешней среде от изменения числа клеток в популяции.

Изменение активности H^+ , K^+ и Na^+ во внешней среде регистрировалось потенциометрическим методом с помощью катионселективных электродов, как описано ранее [7].

Для клеток *E. coli* количество глюкозы в ростовой среде имело существенное значение. Концентрация глюкозы в ростовой среде 55 мМ ингибирует поглощение калия—скорость и общее его количество—по сравнению с 22 мМ глюкозы, когда калий не только быстрее поглощается, но и удерживается клетками.

Так как целью нашей работы было исследование двухфазного поглощения калия у *E. coli*, клетки выращивались в ростовой среде с 11 мМ глюкозы (рис. 1). В некоторых опытах в качестве источника питания использовалась молочная кислота. При этом бактерии специально не адаптировались к новому виду источника энергии.

Результаты и обсуждение. Поглощение калия и осмотичность среды. В присутствии глюкозы бактерии секретируют кислоту и поглощают ионы калия. Характер поглощения ионов калия у клеток *E. coli* определяется осмотическим шоком, которому они подвергались при переносе из отмывочного раствора в экспериментальный. Зависимость поглощения калия клетками *E. coli* от времени при разных осмотических переносах представлена на рис. 2. На всех кривых можно выделить две фазы, из которых первая имеет продолжительность 5—7 мин и определяется величиной осмотического шока. Характерным для этой фазы является постоянство скорости поглощения калия в первые минуты и постепенное удлинение ее (смещение пиков вправо) с увеличением осмотического шока. Две нижние кривые (—55 мосМ и —115 мосМ) соответствуют отрицательным осмотическим шокам. В этих двух случаях поглощение в первой фазе заменяется истечением калия из клеток. Кривые

«+80 мосМ» и «+180 мосМ» можно рассматривать как переходные случаи.

С пятой по двадцатую минуту у анаэробно выращенных *E. coli* в щелочных средах наблюдается истечение калия [5].

Вторая фаза поглощения калия является более растянутой, не зависит от величины осмотического шока и наблюдается во всех описанных случаях. Создается впечатление, что общая кривая кинетики поглощения калия является суперпозицией двух кинетических процессов, а, возможно, и двух режимов работы мембранной транспортной системы у осмочувствительных бактерий. Шульц, Эпштейн и Соломон предположили наличие у *E. coli* двух систем, обеспечивающих протонно-калиевый и калий-натриевый обмен [9]. В наших же опытах не было зарегистрировано никакого перемещения ионов натрия у *E. coli* как при положительном, так и при отрицательном осмотических шоках.

Совершенно иной характер поглощения калия, сопровождающийся секретцией кислоты, наблюдается у осморезистентных клеток *St. faecalis*. Этот процесс происходит в одну фазу и может повторяться много часов подряд при повторных добавках глюкозы в среду [7].

Источники энергии и pH среды. Кривые 1 и 2 (рис. 3) иллюстрируют случаи, когда клетки *E. coli*, подвергнутые одному и тому же положи-

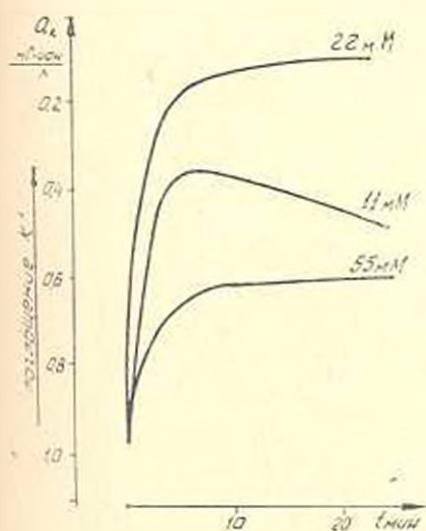


Рис. 1.

Рис. 1. Особенности кинетики энергезависимого поглощения калия клетками *E. coli* в зависимости от количества глюкозы в ростовой среде; a_K — активность ионов калия в среде, pH 7,5.

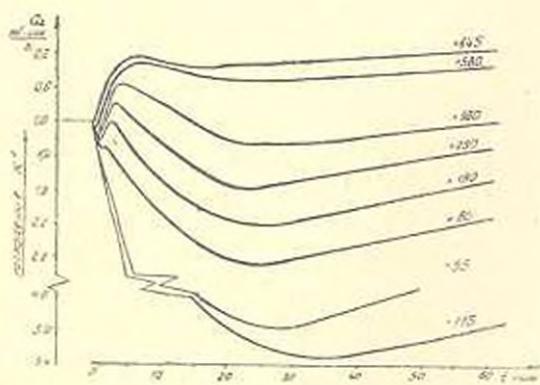


Рис. 2.

Рис. 2. Изменения активности ионов калия в экспериментальной среде для клеток *E. coli*, подвергнутых различным осмотическим шокам. Начальная активность калия в экспериментальной среде 1 мг-ион/л, pH 8,0, содержание глюкозы 50 мМ. Положительные значения параметра $\Delta_{ос}$ соответствуют положительному осмотическому шоку, отрицательные — отрицательному. Ростовая среда содержит 11 мМ глюкозы.

тельному осмотическому шоку (+580 мосМ), переносится в глюкозные среды, отличающиеся только рН. При более низком рН (6,5) калий поглощается и удерживается клетками (кр. 1); при рН 7,5 различаются две фазы поглощения, разделенные фазой выхода калия из клеток (кр. 2). Однако начальные скорости энергозависимого поглощения калия при разных рН равны. Если во внешней среде отсутствует источник энергии, то пассивное истечение калия при одинаковых значениях рН определяется тоничностью экспериментального раствора (кр. 3 и 5). При осмотическом давлении внешней среды, равном 425 мосМ (кр. 5), наблюдается довольно длительный выход калия, тогда как при тоничности 900 мосМ (кр. 3) почти мгновенно наступает равновесие. В начальный период скорости пассивного истечения калия совпадают. Гораздо большую роль в удержании клетками калия играет рН наружной среды, что хорошо видно при сравнении кр. 4 с кр. 3 и 5. Благодаря более низкому значению рН, равному 6,5, калий почти не покидает клетки, хотя величина тоничности экспериментального раствора занимает промежуточное положение. Во всех приведенных случаях бактерии отмывались в дистиллированной воде, поэтому величина осмотического шока совпадает с тоничностью раствора. Добавка глюкозы вызывает секрецию протонов и поглощение ионов калия.

Если экспериментальная среда вместо глюкозы содержит молочную кислоту, то у клеток *E. coli* при положительном осмотическом шоке и рН 7,5 наблюдается первая фаза поглощения калия, хотя и сильно отличающаяся по величине от первой фазы при глюкозозависимом поглощении. Наиболее существенным является полное отсутствие второй фазы (кр. 6 рис. 3).

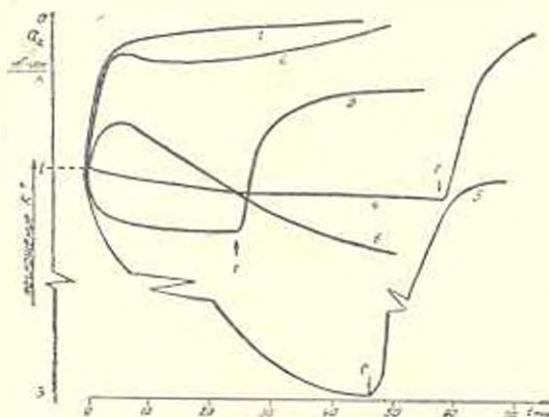


Рис. 3. Влияние рН среды и ее тоничности на удержание калия клетками *E. coli* в присутствии глюкозы (кр. 1 и 2), молочной кислоты (кр. 6) и без источников питания в среде (кр. 3, 4 и 5). Начальная активность калия в среде—1 мг-ион/л. Кр. 1 и 2: начальное значение рН среды 6,5 и 7,5 соответственно, осмотический шок +585 мосМ. Кр. 3 и 5: начальное значение рН среды 7,5, осмотический шок +900 и +425 мосМ. Кр. 4: осмотический шок +650 мосМ, рН 6,5. Кр. 6: вместо глюкозы в экспериментальной среде содержится 30 мМ молочной кислоты, рН 7,0.

Из рис. 3 видно, что поглощение калия у *E. coli*, так же как и у *St. faecalis*, может иметь место только при наличии в среде источника энергии [7]. Несмотря на различия в свойствах бактерий—осмочувствительных *E. coli* и осморезистентных *St. faecalis*—общим является факт энергозависимого обмена протонов клетки на ионы калия среды.

Зависимость от $(a_K)_u$. Характер зависимости скорости переноса иона через мембрану от его активности в наружной среде может содержать в себе косвенную информацию о природе переноса. Эпштейн и Шульц на клетках *E. coli*, подвергнутых гипертоническому шоку, показали, что начальная скорость поглощения калия в области концентраций калия во внешней среде от 0,16 до 8,0 мг-ион/л подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, с максимальной скоростью 10 пМ/см²-сек [4]. Насыщение наступает в области 5—6 мг-ион/л калия во внешней среде.

Качественно похожие результаты получены нами при анализе диаграмм, приведенных на рис. 4а. Кинетика поглощения калия записывалась при содержании калия во внешней среде, равном 1, 3, 5 и 10 мг-ион/л. Начальный поток калия, направленный в клетку, возрастает с увеличением концентрации его во внешней среде и достигает насыщения в области 5—6 мг-ион/л, что совпадает с данными Эпштейна и Шульца [4]. Однако в нашем случае величина потока насыщения составляет 4000 пМ/см²-сек.

Если бы ионы калия поступали в клетку по градиенту электрического поля, генерируемого на мембранах бактерий в присутствии глюкозы [10—12], например благодаря деятельности протонного насоса, то проводимость для калия g_K была бы, согласно законам электродиффузии, пропорциональна активности этих ионов в среде

$$g_K = \frac{r_K l^3 E (a_K)_u}{R^2 T^2 (1 - e^{-FE/RT})},$$

где E — трансмембранный потенциал, $(a_K)_u$ — активность калия в наружной среде, r_K — проницаемость мембран бактерий к ионам калия, R , T и F — газовая постоянная, абсолютная температура и число Фарадея. В этом случае увеличение концентрации калия во внешней среде должно было бы вызвать пропорциональное увеличение величины потока.

Насыщение может наблюдаться только в том случае, когда перенос калия через мембрану связан с некоторыми отдельными ее элементами, число которых, естественно, ограничено.

Для второй фазы поглощения у *E. coli* на 20—21-й минутах величина потока линейно возрастает с возрастанием концентрации калия во внешней среде от 0,2 до 4,0 мг-ион/л (рис. 4б). Эта область измерений недостаточна для определения характера зависимости потока калия от $(a_K)_u$. Существенным является тот факт, что максимальная величина потока (100 пМ/см²-сек) во второй осмочувствительной фазе во много раз меньше, чем в осмочувствительной фазе, согласно нашим результатам, но хорошо совпадает с данными Эпштейна и Шульца для осмочувствительной фазы у *E. coli* [4].

Возможно, в мембранах *E. coli* имеются две системы для регуляции распределения ионов между клеткой и средой, выявляемые в эксперименте как две фазы: осмочувствительная и осмонсочувствительная. Не исключена и другая возможность. Одна и та же система работает в раз-

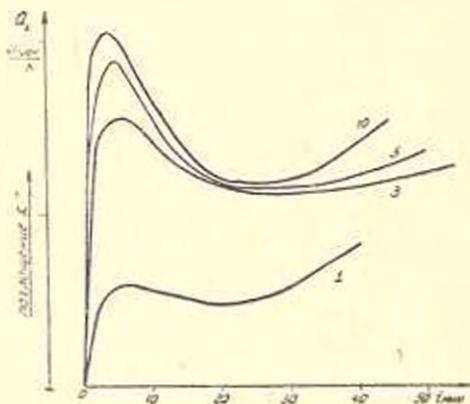


Рис. 4а. Поглощение ионов калия клетками *E. coli* при различных начальных активностях калия в среде, равных соответственно 1, 3, 5 и 10 мг-ион/л; во всех случаях осмотический шок равен $+185$ мосМ, начальное значение рН среды 7,5.

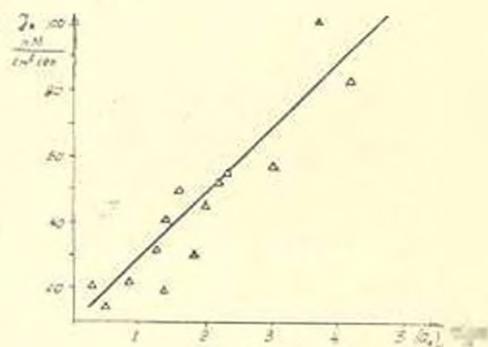


Рис. 4б. Зависимость направленного в клетку потока от его активности в наружной среде в период второй фазы поглощения калия у *E. coli*; рН экспериментального раствора 7,5. Каждый треугольник соответствует одному измерению.

ных режимах в зависимости от потребностей клетки. В стрессовом состоянии, когда клетка подвергается значительному перепаду осмотических давлений внешней среды, система работает с максимальной скоростью. А в состоянии равновесия та же система с меньшими затратами энергетических ресурсов клетки просто обеспечивает жизнедеятельность организма.

В отношении *St. faecalis* не наблюдалось какой-либо заметной разницы в скорости поглощения ионов калия в зависимости от их концентрации во внешней среде.

Действие валиномицина. Известно, что валиномицин увеличивает проницаемость мембран для ионов калия. Нами проверялось его действие на характер поглощения калия как в отношении *St. faecalis*, так и *E. coli*. В ранее выполненных экспериментах изучалось влияние валиномицина на поглощение калия без учета возможного воздействия его на мембранный потенциал [2, 13]. В наших опытах действие валиномицина

проверялось на пассивном и активном перемещении ионов калия. И у *St. faecalis*, и у *E. coli* он увеличивает скорость пассивного истечения калия (рис. 5а), создавая в бактериальных мембранах каналы проводи-

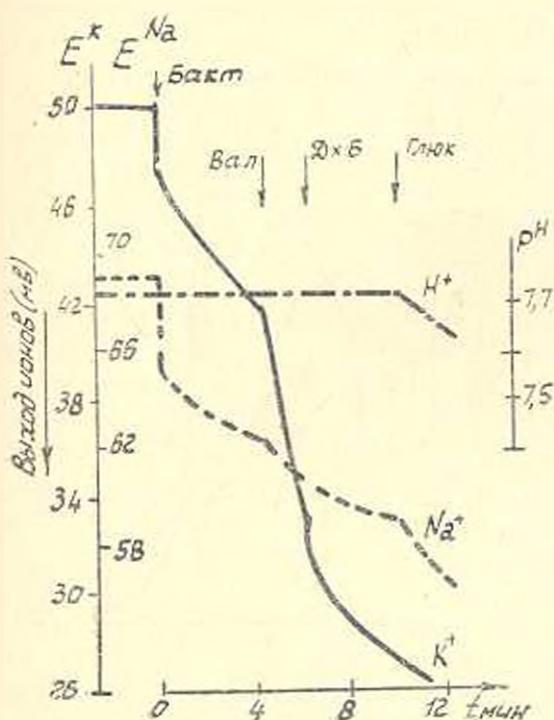


Рис. 5а. Действие валиномицина на пассивное истечение калия из клеток *St. faecalis*, рН 7,7, начальная активность калия в среде 1 мг-ион/л; конечные концентрации валиномицина 10^{-7} М, ДХБ (декахлор-о-харборан) 5×10^{-5} М. Приведены одновременно записанные изменения активности ионов H^+ и Na^+ . Стрелками указаны добавки: бактерии, валиномицин, ДХБ и глюкоза.

мости для калия. Действие валиномицина на активное поглощение калия клетками *St. faecalis* показано на рис. 5б: поглощение калия сменяется его истечением. На клетки *E. coli* действие его проявляется в некотором уменьшении скорости поглощения без изменения направления движения ионов. Действие валиномицина на клетки *E. coli* не во всех случаях проявляется однозначно, особенно при его аппликации после первой фазы [14]. Это может иметь место, если он не всегда способен встраиваться в бактериальную мембрану и служить электрическим шунтом.

Более подробно проанализируем действие валиномицина на свойства мембраны, определяющие ионный обмен между клеткой и средой.

Если при введении валиномицина величина мембранного потенциала E не изменяется, то, благодаря увеличению пассивной проницаемости мембраны, скорость проникновения ионов калия в клетку по градиенту электрического поля должна возрастать [10–12]. Несколько более

сложным представляется случай, когда валиномицин увеличивает проницаемость мембраны p_K , но при этом одновременно уменьшается мембранный потенциал E . Так как p_K и E не являются независимыми величинами, а связаны между собой следующим образом: $E = f(p_K)$,

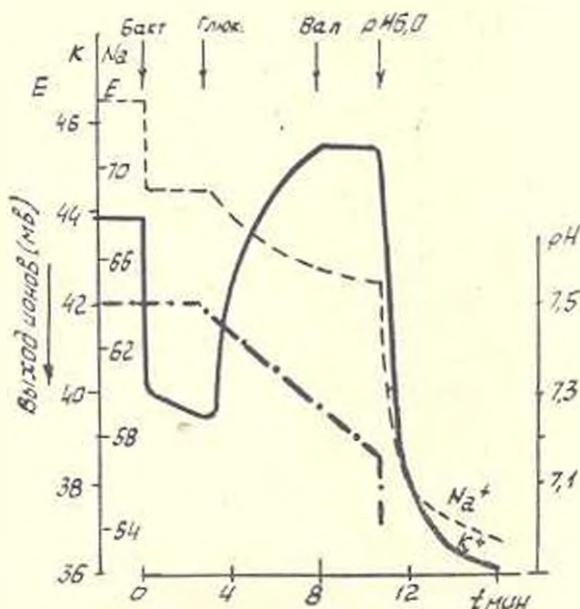


Рис. 5б. Действие валиномицина на энергозависимое поглощение калия в присутствии глюкозы у *St. faecalis*, рН 7,5, начальная активность калия в среде 1 мг-ион/л; конечная концентрация валиномицина 10^{-7} М. Одновременно записано изменение активности H^+ и Na^+ в наружной среде. Стрелками указаны добавки: бактерии, глюкоза, валиномицин и концентрированная HCl.

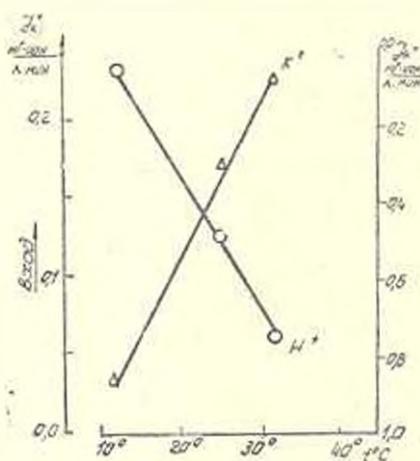


Рис. 6. Зависимость скорости секретиции H^+ и поглощения K^+ у *St. faecalis* от температуры экспериментальной среды. Начальная активность калия—1 мг-ион/л, рН 7,1. Каждый знак—среднее значение пяти измерений. Ошибка не превышает размер знака.

то проводимость мембраны будет определяться ее проницаемостью в большей степени, чем изменение E . Увеличение ρ_k скажется на потоке в большей степени, чем уменьшение E . Таким образом, если калий поступает в клетку по градиенту электрического поля, то при одновременном уменьшении E и увеличении ρ_k поток калия в клетку должен возрасти, что противоречит нашим опытам (см. [14], а также рис. 5).

Рассмотрим, наконец, энергозависимое поступление ионов калия в клетку с помощью протонно-калиевого насоса [3, 6]. Ионы калия непрерывно и с постоянной скоростью, определяемой работой протонно-калиевого насоса, поступают в клетку. Покидают же клетку они пассивно, и скорость этого процесса определяется проницаемостью мембраны. Регистрируемое в опыте поглощение калия является, таким образом, суммой двух противоположно направленных процессов. Накопление значительных концентраций калия в клетках бактерий возможно, если поступающий по электрическому полю калий почти весь связывается и становится неактивным, или если ионы калия закачиваются в клетку с помощью ионообменного протонно-калиевого насоса. В первом случае присутствие валиномицина должно ускорить процесс поглощения калия по электрическому полю, а во втором — замедлить его из-за более ускоренного одновременного истечения его из клеток. Именно этот факт и отмечался в наших опытах.

Зависимость от температуры. Снижение температуры экспериментального раствора должно вести как к уменьшению скорости гликолиза, так и скорости секреции кислоты. Легко показать, опираясь на анализе потоков, что не более 25% АТФ клетки затрачивается на активную секрецию H^+ [6]. Следовательно, и при умеренных температурах (10—20°) клетки будут иметь возможность транспортировать ионы H^+ через насос и генерировать разность электрических потенциалов на мембране. Если калий входит в клетку по градиенту электрического поля, то скорость его поступления не должна изменяться. Однако из рис. 6 следует, что скорость поглощения калия в 5 раз падает, и, по-видимому, здесь имеет место не простая диффузия.

Ереванский физический институт ГКН АЭ

Поступило 28.II 1978 г.

ԿԱԼԻՈՒՄԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ԿԱՆՈՒՄԸ STREPTOCOCCUS FAECALIS ԵՎ, ESCHERICHIA COLI ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ

Ս. Ս. ԳՈՐԻՔԱՐՅԱՆ, Ս. Մ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱԿ, Ը. Ս. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են St. faecalis ВKM В—602 դրամդրական մանրէների և E. coli К—12 (λ) դրամբացասական մանրէների մոտ բջջի ջրածնի իոնների՝ միջավայրի կալիումի իոններով փոխանակման առանձնահատկությունները:

Հայտնաբերված են կալիումի կլանման և պրոտոնների արտադատման բանակութունների և արագությունների կախվածությունները արտաքին մի-

ջավայրի հատկություններից՝ էներգիայի աղբյուրներից, սամտիկոթյունից, թթվայնությունից, կալիումի ակտիվությունից, վալինամիցինի և պրոտոնաֆորի անկալությունից:

Փորձնական արդյունքները ստանում են առավել լրիվ բացատրություն, եթե ենթադրել մանրէների կողմից կալիումի իոնների ակտիվ ակումուլյացիայի գոյությունը:

POTASSIUM ION ACCUMULATION BY THE CELLS OF STREPTOCOCCUS FAECALIS AND ESCHERICHIA COLI

S. S. DURGARIAN, S. M. MARTIROSOV, L. S. PETROSYAN

Peculiarities of exchange of hydrogen ions from cells for external potassium ions by grampositive and gramnegative bacteria *Streptococcus faecalis* BKM—602 and *Escherichia coli* K—12 (r) have been investigated.

Dependence of the value and rate of potassium uptake and hydrogen secretion on the properties of external medium has been estimated.

The experimental data obtain a most complete explanation if we assume the existence of active potassium accumulation by bacteria.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Harold F. M. *Bacterial. Rev.*, 36, 172, 1972.
2. Harold F. M., Baarda J. R., Pavlasova E. *J. Bact.*, 101, 152, 1970.
3. Epstein W., Schultz S. G. In *Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms* L. B. Guze (ed.) 186 The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1968.
4. Epstein W., Schultz S. G. *Jour. Gen. Physiol.*, 49, 221, 1965.
5. Ալիսանյան Մ. Ա., Մարտիրոսով Ս. Մ., Սետրոսյան Լ. Ս. *ԾԱՊԱՐԱԿ ԱՐՄՍՍՐ*, 57, 94, 1973.
6. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 5, 564, 1978.
7. Ալիսանյան Մ. Ա., Մարտիրոսով Ս. Մ., Սետրոսյան Լ. Ս. *Биологический журнал Армении*, 26, 27, 1973.
8. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. *Экспериментальная микробиология*. М., 1967.
9. Schultz S. G., Epstein W., Solomon A. K. *Jour. Gen. Physiol.*, 47, 329, 1963.
10. Hirata G., Allenendorf K., Harold F. M. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 70, 1804, 1973.
11. Griniuvlene B., Chmlellauskatte V., Teluydas V., Dzheja P., Grintus L. *Bioenergetics*, 7, 17, 1975.
12. Harold F. M., Papineau D. J. *Membrane Biol.*, 8, 27, 1972.
13. Горнева Г. А., Рябова И. Ц., Фишова Г. СБ.: *Биофизика мембран*, 1, 318, 1971.
14. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 5, 554, 1978.