

ОСОБЕННОСТИ ИОННОГО ОБМЕНА У *ESCHERICHIA COLI*

С. С. ДУРГАРЬЯН

Показано влияние температуры гипертонического отмывочного раствора на последующее перемещение ионов калия через мембраны *E. coli*. Скорость пассивного выхода ионов калия прямо пропорциональна возрастанию его концентрации во внешней среде. Скорость глюкозозависимого поглощения ионов калия почти в три раза превышает максимальную скорость пассивного истечения. Длительная преникубация бактерий в среде без глюкозы ведет к слиянию первой и второй фаз поглощения ионов калия. В щелочных средах с рН, превышающих 9,0, наблюдается секреция протонов, поглощение катионов тетрафенилфосфония и удержание ионов калия клетками *E. coli* в отсутствие источников энергии. Результаты позволяют предположить, что процессы ионного обмена у *E. coli* связаны не только с деятельностью протонно-калиевого насоса.

Экспериментально показано, что от осмотического давления внешней среды зависят как скорость поглощения ионов калия бактериями *E. coli*, так и их внутриклеточное содержание [10, 15]. Поглощение ионов калия клетками *E. coli* в щелочных средах происходит в две фазы [1]. Первая фаза энергозависимого поглощения осмочувствительна: ее длительность, а также количество поглощенного в этот период калия прямо пропорциональны величине положительного осмотического шока [7]. При отрицательном осмотическом шоке первая фаза поглощения сменяется фазой выхода ионов калия, несмотря на наличие глюкозы в экспериментальной среде, а количество вышедшего калия тем больше, чем сильнее отрицательный осмотический шок [3, 7]. В то же время поглощения ионов калия у *E. coli* при положительном осмотическом шоке не наблюдается, а наоборот, имеет место истечение калия из клеток, если в инокулированной среде нет источника энергии [4]. В предыдущих работах изучалось влияние внешних факторов на характер поглощения ионов калия у *E. coli* [4, 8]. Определялось количественное соотношение потоков ионов водорода и калия, чувствительных к N,N'-дициклогексилкарбодимиду. На основе этих данных была предложена модель осморегулируемого электрогенного протонно-калиевого насоса [5, 9]. В настоящую статью вошли результаты экспериментов, полученные нами в процессе изучения ионного обмена у *E. coli*. Некоторые из них еще не нашли полного объяснения и именно поэтому представляют самостоятельный интерес.

Материал и методика. Методика выращивания клеток *E. coli* K-12 (Δ), подготовки их к опыту, измерения активности H^+ и K^+ катионселективными электродами и величины мембранного потенциала по распределению тетрафенилфосфония (ТФФ^+) описана ранее [2, 3, 5, 7].

Результаты и обсуждение. Колебание температуры ростовой среды для *E. coli* в пределах от 22° до 30° не оказывает влияния на катионное содержание клеток [10]. Однако быстрое охлаждение бактерий может вызвать сильное изменение внутриклеточного состава. Предполагается, что при изоосмотическом холодном шоке происходит кристаллизация растворимых липидов внутри мембраны, что способствует возникновению гидрофильных каналов, облегчающих истечение накопленных субстратов из клеток [14].

Изучение проницаемости мембран у *E. coli* на основе анализа содержания ионов калия в клетках проводилось в широком диапазоне температур от 0° до 45° . Показано, что чувствительность бактерий к изменению температуры окружающей среды более вариабельна при переходе от штамма к штамму и от культуры к культуре, чем осмочувствительность [10, 12, 13]. Ледер исследовал одновременное воздействие температурного и осмотического шоков на клетки *E. coli* и установил, что гипертоническая отмывка бактерий предохраняет их от холодного шока, т. е. отмывка бактерий при низких температурах растворами высокой тоничности способствует удержанию накопленных клеткой субстратов [14].

Воздействие холодной отмывки бактерий на выходящий поток калия проявляется при сопоставлении результатов, приведенных на рис. 1.

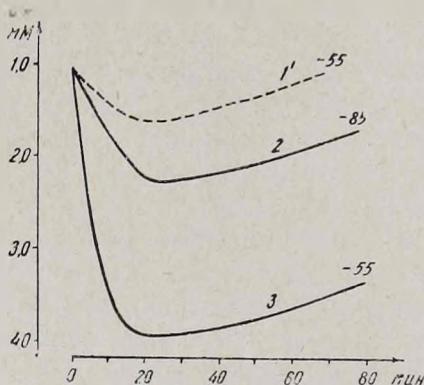


Рис. 1. Влияние охлаждения бактериальной суспензии на выходящий поток калия. 3—бактерии отмывались 400 мМ раствором сахарозы при $3-5^\circ$. 2—бактерии отмывались в 430 мМ растворе сахарозы при комнатной температуре. 1'—отмывка бактерий в 400 мМ растворе сахарозы при комнатной температуре. Активность калия в экспериментальной среде 1 мМ, рН 8,2, содержание глюкозы 50 мМ.

В первом случае (кривая 3) клетки *E. coli* в процессе отмывки в гипертоническом растворе сахарозы осаждались центрифугированием при низкой температуре ($3-5^\circ$). После перенесения бактерий в экспериментальную среду с меньшей тоничностью (345 мОсМ) при 37° , т. е. при одновременном создании температурного и отрицательного осмотического (-55 мОсМ) шоков, в течение первых 10—15 мин ионы калия с очень высокой скоростью покидают клетки. Во втором случае (кривая 2) клетки подвергались большему отрицательному осмотическому шоку

(—85 мосМ), но вся процедура подготовки бактерий велась при комнатной температуре.

При положительном осмотическом шоке, но в отсутствие источника энергии наблюдается замедляющийся со временем выход ионов калия из клеток (рис. 2). Уменьшение скорости истечения ионов калия прямо пропорционально возрастанию его концентрации во внешней среде. Такая линейная зависимость свидетельствует о пассивном характере наблюдаемого процесса. Очевидно, выход ионов калия является след

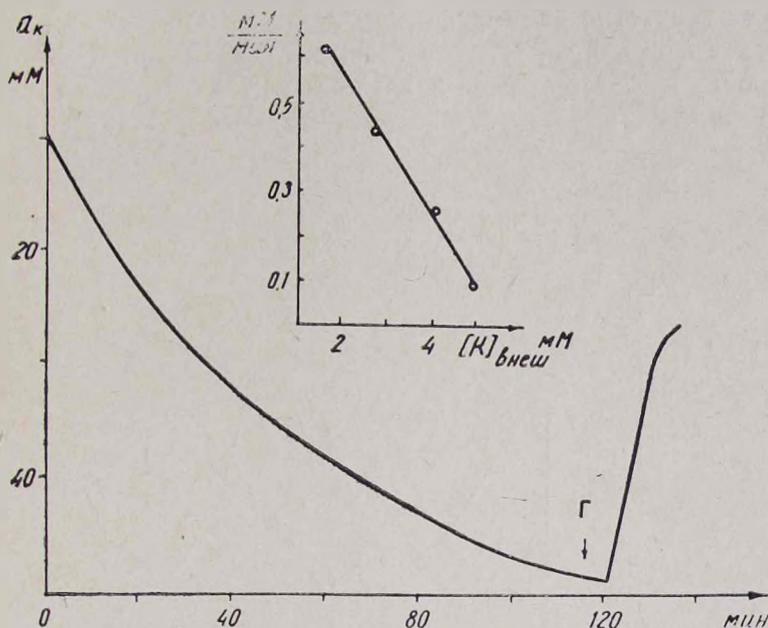


Рис. 2. Сравнение скоростей пассивного и глюкозозависимого переносов ионов калия. Г—добавка глюкозы, рН среды 7,95.

ствием большого концентрационного градиента и приблизительно к сотовой минуте почти полностью прекращается, что обусловлено, вероятно, выравниванием концентраций свободного калия внутри и снаружи клетки (5 мМ). Расчетная величина внутриклеточной концентрации калия в нулевой момент времени по количеству вышедшего калия равна 1250 мМ. Эта цифра в несколько раз превышает встречающиеся в литературе данные, равные ~ 250 мМ [6, 10].

Причины такого расхождения, вероятнее всего, связаны с самим способом определения $[K]_{\text{внутр}}$. В наших расчетах использовалась концентрация бактерий, определяемая методом высева на твердые питательные среды с последующим подсчетом колоний [4]. Известно, что не все клетки в популяции жизнеспособны, т. е. могут образовывать колонии на питательной среде. В общее число клеток входят также мертвые или поврежденные клетки (сферопласты), не поддающиеся учету при применении этого метода.

Как видно из рис. 2, добавка глюкозы вызывает поглощение калия, составляющее в пике около 2 мМ, при этом внутриклеточное содержание калия возрастает, по нашим оценкам, до 700 мМ. Скорость энергозависимого поглощения ионов калия на участке кривой в интервале 120—130 мин почти в три раза превышает максимальную скорость пассивного выхода.

Уместно напомнить, что после введения глюкозы перемещение ионов калия с такой высокой скоростью происходит против концентрационного градиента, что подтверждает гипотезу активного переноса K^+ через бактериальную мембрану [5, 9, 11].

При сравнении характера поглощения ионов калия бактериями, получившими глюкозу через 25 и 125 мин после инокуляции среды, обнаруживается сглаживание перехода первой фазы во вторую (рис. 3).

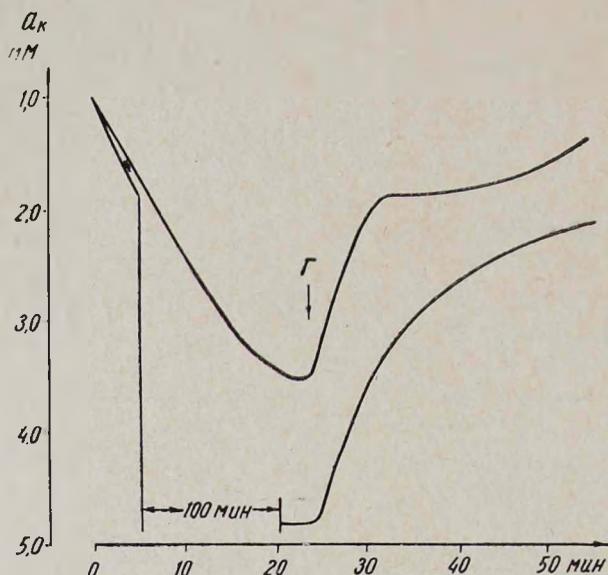


Рис. 3. Изменение характера перехода первой фазы поглощения ионов калия во вторую. Положительный осмотический шок 420 мосМ, рН 7,8, активность калия 1 мМ, Г—добавка глюкозы.

В серии опытов, в которых глюкоза вводилась через 20—80 мин, аппликация ее вызывает немедленную секрецию протонов, тогда как начало поглощения ионов калия несколько запаздывает. Время задержки, определенное по семи опытам, в среднем равно 1 мин (рис. 4а). В контрольных измерениях установлено, что в тех же условиях добавка разбавленной соляной кислоты вызывает одновременное изменение показаний электродов, исключающее приборную ошибку (рис. 4б).

При истощении запаса энергии во внешней среде секреция кислоты у *E. coli* прекращается и ионы калия начинают покидать клетки. В ще-

лочных средах (рН 7,2—8,0) после завершения гликолиза рН раствора не меняется. Если же в момент истощения запаса глюкозы рН окружающей среды лежит в области 6,0—6,5, то наблюдается защелачивание экспериментального раствора, т. е. имеет место перенос ионов водорода через бактериальную мембрану внутрь клетки. При повторной аппликации глюкозы можно опять наблюдать закисление среды.

Считается, что у *E. coli* внутриклеточное значение рН поддерживается на уровне 7,6—7,8 [16]. Таким образом, в кислых средах создается трансмембранный градиент рН порядка 1,0—2,0 единиц рН, и ка-

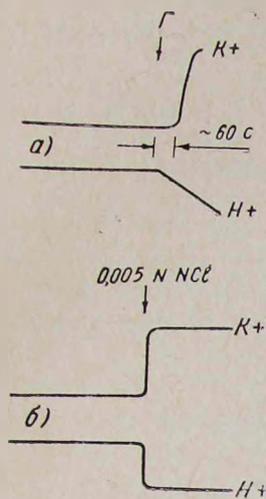


Рис. 4.

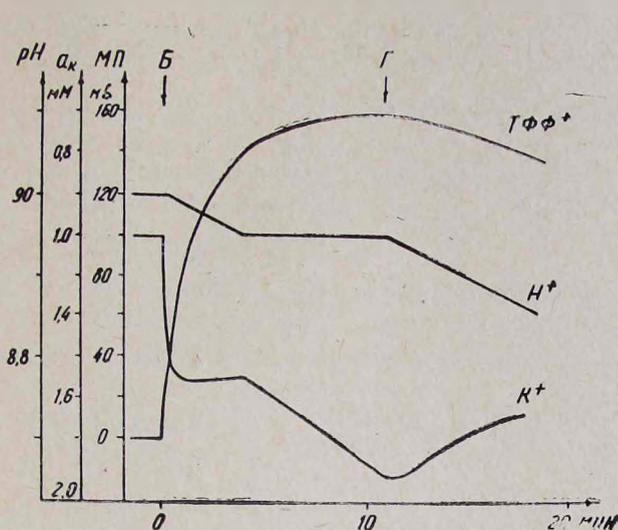


Рис. 5.

Рис. 4. Задержка начала поглощения ионов калия относительно секреции протонов после введения глюкозы (Г): а. эффект запаздывания. б. контроль.

Рис. 5. Кинетика ионного обмена у *E. coli* в щелочной среде (рН 9,0). Активность калия 1 мМ, Б—добавка бактерий, Г—добавка 20 мМ глюкозы.

жется вполне естественным пассивный вход протонов в клетку по концентрационному градиенту. Интересно, что этот процесс нами ни разу не наблюдался в начале опыта. Сравнение потоков ионов входящего водорода и выходящего калия не дает устойчивого количественного соотношения, но обычно $\bar{J}_{H^+} \gg \bar{J}_{K^+}$. А скорость защелачивания среды приблизительно в 2—3 раза меньше скорости секреции протонов при гликолизе.

Когда начальное значение рН наружной среды близко к 9,0, то ионы водорода могут секретироваться клеткой в окружающую среду и при отсутствии в ней глюкозы (рис. 5). Несмотря на отсутствие в экспериментальном растворе источника энергии, в течение первых четырех минут после инокуляции наблюдается закисление внешней среды. После резкого начального скачка, связанного с внесением

дополнительного количества калия с отмывочным раствором бактерий, концентрация калия сохраняется на одном уровне. Иными словами, перемещение этих ионов через мембрану обнаруживает тесную временную связь: в период секреции протонов ионы калия удерживаются клетками.

Одновременно зарегистрировано значительное поглощение ТФФ⁺, приписываемое наличию в этот период разности электрических потенциалов (отрицательной внутри) на мембране *E. coli* порядка [—160] мВ. Как только прекращается закисление среды, ионы калия начинают покидать клетку. Аппликация глюкозы вызывает секрецию протонов и поглощение ионов калия; судя по выходу ТФФ⁺ из клеток, мембранный потенциал при этом несколько снижается.

Ереванский физический институт

Поступило 31.II 1979 г.

ESCHERICHIA COLI ՅՈՆԱՅԻՆ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ
ՅՈՒՐԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ս. Ս. ԴՈՒՐԳՅԱՆ

Հետազոտման տվյալները հանգեցնում են այն եզրակացության, որ յոնային փոխանակության պրոցեսները աղիքային ցուպիկի մոտ կապված են ոչ միայն պրոտոն կալիումի պոմպի գործունեության հետ:

PECULIARITIES OF ION EXCHANGE IN ESCHERICHIA COLI

S. S. DURGARYAN

Presented experimental data have indicated that the ion exchange processes in *E. coli* may be connected not only with proton potassium pump action.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алиханян М. А., Мартиросов С. М., Петросян Л. С. ДАН АрмССР, 57, 94, 1973.
2. Алиханян М. А., Мартиросов С. М., Петросян Л. С. Биолог. ж. Армении, 26, 27, 1973.
3. Дургарьян С. С., Мартиросов С. М., Петросян Л. С. Биолог. ж. Армении, 31, 697, 1978.
4. Дургарьян С. С., Мартиросов С. М. Биофизика, (в печати).
5. Дургарьян С. С., Мартиросов С. М. Биофизика, (в печати).
6. Damadian R. J. Bacteriol., 95, 113, 1968.
7. Durgaryan S. S., Martirosou S. M., Bioelectrochem. and Bioenergetics, 5, 554, 1978.
8. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. and Bioenergetics, 5, 561, 1978.
9. Durgaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. and Bioenergetics, 5, 567, 1978.
10. Epstein W., Schultz S. G. J. Gen. Physiol., 49, 221, 1965.
11. Epstein W., Schultz S. G. In: Microbial protoplasts, spheroplasts and L—forms. ed. Guze L. B. p. 186, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1968.
12. Kaback H. R. In: Current Topics in Membranes and Transport (Bronner F. and Kleizeller A., ed) 1, 68, 1970, New York.
13. Leder I., Perry J. Fed. Proc. 26, 394, 1967.
14. Leder I. J. Bacteriol. 111, 211, 1972.
15. Orskov S. L. Acta Path. Microb. Scand. 25, 277, 1948.
16. Padan E., Zilberstein D., Rotenberg H. Eur. J. Blochem. 63, 533, 1976.