

ОСОБЕННОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ K^+
У *SERRATIA MARCESCENS*

А. Ж. ХАЧАТРЯН

Измерены потоки H^+ и K^+ и величина мембранного потенциала у грамотрицательных бактерий *S. marcescens*. Показано, что повышение осмотического давления среды ведет к усилению обмена H^+ на K^+ в присутствии глюкозы. Стехиометрия ионного обмена H^+ на K^+ у этих бактерий не сохраняется в отличие от таковой у *E. coli*. Определены кинетические характеристики исследованной транспортной системы: $K_m = 1,5 \text{ mM}$, $V_{max} = 0,4 \text{ mM} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. Q_{10} для потоков H^+ и K^+ равно 2,0—2,5. Мембранный потенциал падает почти до нуля при введении в среду глюкозы, что вызвано независимым от потока H^+ входом ионов K^+ .

Մասնաշաղկապի *S. marcescens* մանրէների մոտ չափված են H^+ -ի և K^+ -ի հոսքերը և մեմբրանային պոտենցիալի մեծությունը: Ծույց է տրված, որ գլյուկոզայի առկայությանը միջավայրի օսմոտիկ ճնշման ավելացումը հանգեցնում է H^+ - K^+ փոխանակման ուժեղացմանը: Ի տարբերություն *E. coli* բջջերի, այս մանրէների մոտ H^+ - K^+ փոխանակման ստեքիոմետրիան չի պահպանվում: Որոշված են ուսումնասիրված տրանսպորտային սխեմայի կինետիկ բնութագրերը: $K_m = 1,5 \text{ մՄ}$, $V_{max} = 0,4 \text{ մՄ} \cdot \text{գ}^{-1} \cdot \text{րոպե}^{-1}$: H^+ -ի և K^+ -ի հոսքերի համար Q_{10} ցուցանիշը է 2,0—2,5: Ուղիավարում գլյուկոզի ավելացնելիս մեմբրանային պոտենցիալի բնիկում է համարյա մինչև զրո, որն առաջանում է H^+ հոսքից անկախ K^+ իոնների մուտքով:

The flows of H^+ and K^+ and the value of the membrane potential of gram-negative bacteria *S. marcescens* are measured. It has been shown, that in the presence of glucose the increase of osmotic pressure of the medium leads to the intensive exchange of H^+ for K^+ . Unlike *E. coli* cells, the stochiometry of H^+ - K^+ exchange of these bacteria does not remain. The kinetic characteristics of the investigative transport system are defined: $K_m = 1.5 \text{ mM}$, $V_{max} = 0.4 \text{ mM} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Q_{10} for flows of H^+ and K^+ is 2.0—2.5. When glucose is injected into the medium, the membrane potential falls to about zero, which is connected with the K^+ entry independent of H^+ flow.

Ключевые слова: бактерии *S. marcescens*, осмотическое давление, мембранный потенциал, ионы калия.

Ионы калия наряду с другими неорганическими ионами — натрия, магния, кальция, меди, марганца, железа и аммония — входят в состав минеральных веществ бактерий и необходимы для их жизнедеятельности [6, 13, 22]. Это в первую очередь относится к грамотрицательным бактериям, у которых ионы калия участвуют в осморегуляции [18, 19], поддержании внутриклеточного рН [10, 11, 29], регуляции активности ферментов [2]. Необходимая внутриклеточная концентрация ионов калия обеспечивается транспортными системами калия, способными накачивать этот ион в количествах, намного превышающих его количество во внешней среде [7, 12, 21, 32, 33]. Одной из характерных особенностей процесса поглощения K^+ у грамотрицательных бактерий *E. coli* является чувствительность потоков H^+ и K^+ к осмотическому

давлению среды [8, 18, 19]. Показано, что у *E. coli* чувствительностью к тоничности среды обладает как kdp-система, так и H^+ -АТФазный комплекс $ecF_1 \cdot F_0$ [31]. При снижении осмотического давления среды анаэробно выращенные *E. coli* не способны поглощать ионы калия [24, 25]. При анаэробном выращивании Tgk-система транспорта K^+ у этих бактерий, по-видимому, структурно связывается с H^+ -АТФазным комплексом $ecF_1 \cdot F_0$, и такой суперкомплекс функционирует как H^+ - K^+ насос с устойчивой стехиометрией АТФ: $2H^+ : 1K^+$ [9, 26, 27]. В свете сказанного представляет интерес изучение природы транспорта ионов K^+ у других видов, таксономически близких к *E. coli*. С этой целью нами исследованы биоэлектрохимические характеристики транспорта ионов K^+ у *Serratia marcescens*, свидетельствующие о существенном отличии транспорта K^+ у этих бактерий по сравнению с таковым у *E. coli*.

Материал и методика. Использовались клетки *S. marcescens* (штамм ATCC 9986, липкий тип), выращиваемые при 30° до ранней стационарной фазы двумя способами: 1) в среде, содержащей пептон-2, NaCl—0,5, K_2HPO_4 —0,2, глюкозу—0,5%, без принудительной аэрации (анаэробные клетки); 2) в жидкой среде Гливера (NH_4Cl —0,5, NH_4NO_3 —0,1, Na_2SO_4 —0,2, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ —0,3, KH_2PO_4 —0,1, $MgSO_4$ —0,01%, с 0,5% сульфата магния с принудительной аэрацией (аэробные клетки). После достижения ранней стационарной фазы (18—20 ч) клетки осаждались центрифугированием при 5000 об/мин, отмывались дистиллированной водой или раствором неутилизируемого сахара арабинозы необходимой концентрации (для создания соответствующего осмотического шока) и вновь осаждались. Осадок разбавлялся небольшим количеством отмывочного раствора и переносился в экспериментальный раствор следующего состава: трис-50, KCl—от 1 до 15, NaCl—1, $MgSO_4$ —0,1 мМ. Ортофосфорная кислота (11 М) добавлялась в количествах, необходимых для создания требуемого pH. Тоничность раствора регулировалась добавлением арабинозы. В течение всего опыта в ячейке поддерживалась постоянная температура (30°, 20° и 10°).

Количество биомассы определялось по оптической плотности бактериальной суспензии, сухому весу клеток в 1 мл и по титру—количеству жизнеспособных клеток в единице объема. Размеры клеток определялись с помощью микроскопа. Объем анаэробных клеток составлял $3,8 \cdot 10^{-13}$ см³, а аэробных— $2,4 \cdot 10^{-13}$ см³, что несколько отличается от ранее приведенных данных [30].

Осмотический шок для клеток—положительный или отрицательный—создавался резким повышением тоничности экспериментального раствора за счет введения неутилизируемого сахара арабинозы, либо перенесением клеток из отмывочного раствора с высокой тоничностью в экспериментальный раствор с более низкой тоничностью.

Потоки ионов рассчитывались по измеряемому неспецифическим электродами изменению активности ионов (Δa) в среде за интервал времени (Δt) $I \sim \frac{\Delta a}{\Delta t}$. Активность ионов в любой момент времени определялась уравнением Никольского [4]:

$$E = E_0 + S \lg (1/k + ka_{Na^+}).$$

куда кроме уже упомянутых величин входит E —регистрируемый потенциал, E_0 —потенциал асимметрии электрода, S —изменение показания данного электрода при 10-кратном изменении активности иона, равное 54 мВ, k —коэффициент избирательности электрода, равный 0,14.

Разность электрических потенциалов (РЭП) у предварительно обработанных ЭДТА клеток определялась по известной методике [20, 23].

Результаты и обсуждение. Одной из характерных особенностей ионного обмена у бактерий *S. marcescens* является чувствительность глюкозозависимых потоков H^+ и K^+ к изменению осмотического давления среды [5]. Как и у *E. coli*, поглощение ионов калия у *S. marces-*

сепс наблюдается только в присутствии источника энергии—глюкозы. Резкое увеличение тоничности внешней среды вызывает усиление поглощения K^+ и секреции H^+ у клеток, подвергнутых как положительному, так и отрицательному осмотическому шоку (рис. 1), в чем проявляется

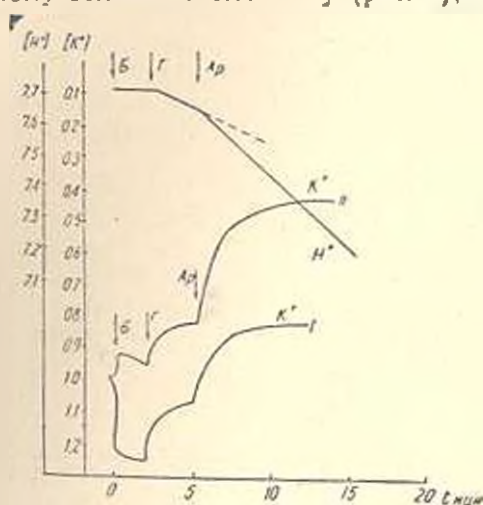


Рис. 1. Поглощение K^+ и секреция H^+ у анаэробных клеток, подвергнутых отрицательному (I) и положительному (II) осмотическому шоку. Б—бактерии, Г—глюкоза (10 мМ), Ар—арабиноза (200 мМ).

основное различие в осмочувствительности ионного обмена у *S. marcescens* по сравнению с *E. coli* [3, 14]. Кроме того, у *S. marcescens* никогда не наблюдалось двухфазного поглощения ионов калия, аналогичного обнаруженному у *E. coli* [1, 14]. У аэробно выращенных клеток *E. coli* утрачена чувствительность поглощения калия к изменению осмотического давления внешней среды [28]. У клеток *S. marcescens*, как анаэробов, так и аэробов, это свойство сохраняется.

Анализ зависимости направленного внутрь потока K^+ у аэробных и анаэробных клеток *S. marcescens* от концентрации K^+ во внешней среде позволил определить кинетические характеристики этого процесса. Для анаэробных клеток $k_m = 1,5$ мМ, $V_{max} = 0,4$ мМ·г⁻¹·мин⁻¹, что отличается от тех же параметров для *E. coli* [31]. Для аэробных клеток k_m близко к нулю. Более точные измерения этих параметров у аэробов требуют привлечения других методов.

Тщательное исследование характера ионного обмена у *E. coli* показало, что независимо от внешних условий—вида источника энергии, pH среды, ее температуры, концентрации ионов калия—осмочувствительный глюкозозависимый ДЦКД-ингибируемый обмен ионов калия внешней среды на внутриклеточные ионы водорода осуществляется с постоянной стехиометрией $2H^+ : 1 K^+$ [15, 16]. Как показано на рис. 2, у *S. marcescens* это соотношение не сохраняется, оно зависит от активности K^+ в среде и падает от 1,3 при низкой концентрации ионов калия до 0,3 при ее увеличении. Это говорит об отсутствии непосредственной структурной связи между системой транспорта K^+ и водородным АТФ-азным комплексом, не исключаяющей, однако, опосредованной связи

между ними. Вывод об отсутствии непосредственной связи между системами переноса ионов калия и водорода также вытекает из анализа потоков H^+ и K^+ при разных температурах, т. е. при сопоставлении величины Q_{10} для них.

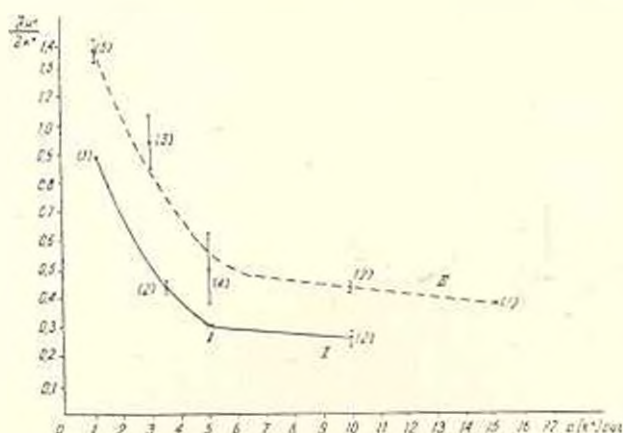


Рис. 2. Зависимость отношения потока ионов водорода и калия J_{H^+}/J_{K^+} от концентрации ионов калия в среде у аэробных (1) и анаэробных (2) клеток. В скобках указаны число измерений для каждой точки.

Измерение РЭП на мембране *S. marcescens* показало, что у аэробных клеток она составляет 175 ± 8 мВ, а у анаэробных — 130 ± 6 мВ (отрицательный внутри), и то время как потоки ионов, наоборот, у анаэробных клеток намного выше по сравнению с аэробными. Причем аппликация глюкозы вызывает снижение мембранного потенциала почти до нуля у анаэробных клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что только наличие РЭП на мембране не может быть движущей силой, вызывающей наблюдаемое поглощение ионов калия.

Таблица. Значения Q_{10} для глюкозой (H^+ и K^+) и арабинозой (H^+ и K^+) компонент потоков ионов

Вид клеток	H^+ _{гл}	K^+ _{гл}	H^+ _{ар}	K^+ _{ар}
Анаэробные	2.3 ± 0.3	1.5 ± 0.6	2.2 ± 0.6	2.5 ± 0.7
Аэробные	2.6 ± 0.6	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.2

Таким образом, сопоставление кинетических характеристик поглощения H^+ и K^+ у *S. marcescens* и *E. coli* свидетельствует о различии механизма осмоточувствительного энергозависимого ионного обмена у этих бактерий. Система поглощения K^+ у *S. marcescens* существенно отличается от kdp-системы *E. coli* [17] своими электрохимическими и кинетическими параметрами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиханян М. А., Миртиросов С. М., Петросян Л. С. Докл. АН АрмССР, 58, 94, 1973.

2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1966.
3. Дургарьян С. С., Мартirosов С. М. Биофизика, 25, 654, 1980.
4. Никольский Б. П., Матерова Е. А. Ионселективные электроды. Л., 1980.
5. Хачатрян А. Ж., Дургарьян С. С., Мартirosов С. М. Биофизика, 1986 (в печати).
6. Шлегель Г. Общая микробиология. М., 1972.
7. Bakker E. P., Harold F. M. J. Biol. Chem., 255, 433, 1980.
8. Berger E. A., Heppel L. A. J. Biol. Chem., 249, 24, 7747, 1974.
9. Bourd G. J., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 10, 315, 1983.
10. Brey R. N., Beck J. C., Rosen B. P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 83, 4, 1589 1978.
11. Brey R. N., Beck J. C., Rosen B. P. J. Biol. Chem., 255, 39, 1980.
12. Damadian R. J. Bact., 95, 113, 1968.
13. Damadian R. Biophys. J., 11, 39, 1971.
14. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 554, 1978.
15. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 561, 1978.
16. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 567, 1978.
17. Epstein W., Laimins L. Trends Biochem. Sci., 5, 21, 1980.
18. Epstein W., Schultz S. G. J. Gen. Physiol., 49, 2, 221, 1965.
19. Epstein W., Schultz S. G. In: Microbial Protoplasts, spheroplasts and L-form. Guze L. B., Baltimore, 1969.
20. Grinlavene B., Chmelauskaitė V., Girnius L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 206, 1974.
21. Heefner D. L. Mol. Cell. Biochem., 11, 81, 1982.
22. Luria S. B. In: The Bacteria, Eds. Gunstalus J. C., Stanley R. J., N.-Y., 1960.
23. Lippman E. A., Topaly V. P. Biochem. Biophys. Acta, 163, 125, 1968.
24. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 8, 605, 1981.
25. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 11, 29, 1983.
26. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 9, 459, 1982.
27. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 13, 1955, 1984.
28. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 13, 248, 1985.
29. Padan E., Zilberstein D., Rottenberg H. European J. of Biochem., 63, 533, 1976.
30. Powell E. O. Sci. Food. Agric., 1, 1963.]
31. Rhoads D. B., Waters F. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 67, 325, 1976.
32. Schultz S. G., Solomon A. K. J. Gen. Physiol., 45, 355, 1961.
33. Weiden P. Senior Thesis, Harvard College, 1963.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 15.XI 1985 г.

«Биолог. ж. Армении» г. XXXIX, № 3, 1986

УДК 577.23

Δ_{PH} У РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИЙ

А. А. ТРЧУНЯН, В. А. ТЕР-НИКОСЯН

Анаэробно выращенные *Escherichia coli* K-12 (r), *Salmonella typhimurium* LT-2 поддерживают Δ_{PH} около 150 мВ. Δ_{PH} у дезэнергизованных бактерий и мутантов *E. coli* AN 120, *S. typhimurium* TH-31 включает DCC⁺ — чувствительную компоненту. Глюкоза приводит к кратковременному увеличению Δ_{PH} у диких типов бактерий, не обработанных EDTA. Аэробно выращенные бактерии и аэробные *Micrococcus lysodeikticus* имеют высокий Δ_{PH}, соответствующий распределению K⁺ между клеткой и средой. Дыхательная цепь является, возможно, мощным генератором Δ_{PH}, имеющего существенное значение для регуляции функций аэробных бактерий.