

При одинаковых условиях содержания безоаровых коз и муфлонов большая предрасположенность к анаэробным инфекциям отмечена у первых, что, по-видимому, связано со спецификой физиологии данного вида диких копытных в условиях неволи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лавов В. М. Анаэробные инфекции и борьба с ними. М., 1971.
2. Польшковский М. Д. Болезни овец и коз. 3-е изд. М., 1973.
3. Протасов А. И. Болезни жвачных. Справочник по ветеринарии. М., 1968.
4. Ромейс В. Микроскопическая техника. М., 1955.
5. Семенчук К. Л., Байкин В. Ф. Анаэробные инфекции у пятнистых оленей зоопарка «Аскания-Нова». Научн. тр. Укр. Ин-та животноводства степных районов. 13. 1968.
6. Урзуев К. Р. Клостридозы овец. М., 1977.
7. Урзуев К. Р. Болезни овец, 3-е изд., М., 1973.
8. Rusell W. C. J. Amer. Vet. Med. Ass., 157, 5, 1970.

Институт зоологии АН Армянской ССР

Поступило 15 III 1985 г.

УДК 577.352

ФОСФАТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И СТЕХИОМЕТРИЯ H^+ -НАСОСА И K^+ -НАСОСА У БАКТЕРИИ *SERRATIA MARCESCENS*

А. Ж. ХАЧАТРИАН, М. В. БОГДАНОВ, С. С. ДУРГАРЬЯН

Измерены внутриклеточные стационарные концентрации АТФ, АДФ и фосфата у *S. marcescens* и рассчитан фосфатный потенциал ΔC_{ip} в период элиминации, равный 45 кДЖ у анаэробных и 47 кДЖ у аэробных клеток*. Функционирующий в присутствии глюкозы осмочувствительный K^+ -насос создает распределение ионов калия, соответствующее равновесному калиевому потенциалу 200 мВ. Проведено сравнение плазматического заряда клеток в различных физиологических состояниях. Подсчитаны стехиометрии калиевого и водородного насосов, равные соответственно 2,2 и 3,0. Показано, что в присутствии ионов калия увеличивается скорость дыхания клеток *S. marcescens*, по-видимому, в ответ на функционирование K^+ -насоса, создающего электрический шунт на мембране дышащих клеток.

S. marcescens-ի մոտ չափված են ԱՏՖ-ի և ֆոսֆատի ստացիոնար կոնցենտրացիաները և հաշված է քիմիոտիկ ընթացքում ΔC_{ip} ր ֆոսֆատային պոտենցիալը, որը հափաար է 45 կՋ անաերոբ և 47 կՋ աերոբ բջիջներում: Գլյուկոզայի ներկայությամբ գործող օսմոզոզային K^+ -պոմպը ստեղծում է կալիումի իոնների բաշխում, որը համապատասխանում է 200 մՎ հափաարակչի կալիումային պոտենցիալին: Կատարված է բջիջների աղնիյատային լիցքի համեմատություն տարբեր ֆիզիոլոգիական պայմաններում: Հաշված են կալիումային և քրածուչին պոմպերի հաբարերակցությունները, որոնք համապատասխանաբար հափաար են 2,2 և 3,0:

Ցույց է տրված, որ կալիումի իոնների ներկայությամբ աճում է *S. marcescens* բջիջների շնչառության արագությունը, ըստ կրկնվելն, ի պատասխան K^+ -պոմպի գործունեությանը, որը առկում է էլեկարական շունտ՝ շնչող բջիջների մեմբրանի վրա:

* Здесь и далее «анаэробные и аэробные клетки» означают клетки, выращенные в анаэробных и аэробных условиях соответственно [3].

Stationary intracellular concentrations of ATP, ADP and phosphate in *S. marcescens* were measured and phosphate potential ΔG_p was calculated during the glycolysis, equal to 45 kJ and 47 kJ in anaerobic and aerobic cells, respectively. The osmosensitive K^+ -pump operating in the presence of glucose generates potassium ion distribution corresponding to the equilibrium K^+ potential of 200 mV. The adenylate energy charge of the cells was compared according to their physiological condition. The stoichiometries of potassium and hydrogen pumps were calculated to be 2.2 and 3.0, respectively. The respiration rates of *S. marcescens* increased in the presence of potassium ions, perhaps in response to K^+ pumping which creates an electrical shunt on the membranes of the respirating cells.

Ключевые слова: бактерии *S. marcescens*, фосфатный потенциал, аденилатный заряд, стехиометрия, H^+ /АТФ и K^+ /АТФ.

Наиболее важными факторами, регулируемыми гликолиз и дыхание, а также ряд других процессов, связанных с запасанием и расходом энергии в клетке, являются относительные внутриклеточные концентрации нуклеотидов. Согласно Аткинсону, энергетическое состояние клетки может быть охарактеризовано степенью «заполнения» системы АТФ—АДФ—АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями. Чем больше в клетке АТФ, тем больше заполнена она энергией и, наоборот, чем ниже ее энергетический заряд, тем меньше в ней высокоэнергетических связей. Энергетический заряд клетки можно оценить по уравнению Аткинсона:

$$\text{энергетический заряд} = \frac{1}{2} \frac{[\text{АДФ}] + 2[\text{АТФ}]}{[\text{АМФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АТФ}]}, \quad (1)$$

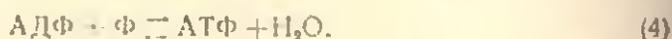
где АМФ, АДФ и АТФ внутриклеточные концентрации нуклеотидов. Энергетический заряд равен 1 в максимально энергизированном состоянии и 0, когда система энергетически пуста [1]. Эрчинская показала [10], что регуляция дыхания и генерация НАД-Н₂ обусловлены не энергетическим зарядом Аткинсона (1), а соотношением

$$\text{аденилатный заряд} = \frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}] \cdot [\text{Ф}]}, \quad (2)$$

определяющим степень фосфорилирования клетки. Это соотношение используется для расчета фосфатного потенциала клетки ΔG_p [25]:

$$\Delta G_p = \Delta G_p^\circ + RT \ln \frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}] \cdot [\text{Ф}]}, \quad (3)$$

где R—газовая постоянная, T—абсолютная температура, ΔG_p° —стандартная энергия Гиббса реакции:



Фосфатный потенциал определяется как изменением стандартной энергии Гиббса, зависящей только от температуры, так и внутриклеточными концентрациями АТФ, АДФ и Ф [25]. Ни один из этих параметров в отдельности не несет полной информации об энергетическом состоянии клетки. Для характеристики электрохимических процессов, развивающихся на мембране, очень важное значение имеет величина

фосфатного потенциала ΔG_p , характеризующая свободную энергию АТФ-синтетазной реакции [2]. Чем меньше величина ΔG_p , тем ближе реакция к равновесию. Таким образом, величина ΔG_p является функцией отклонения системы от равновесия. Однако, когда фосфатный потенциал достаточно высок и, следовательно, система находится в состоянии, далеко от термодинамического равновесия, внутриклеточное содержание АТФ может оказаться довольно низким. Аденилатный заряд (2) в некотором смысле более информативен, хотя пул нуклеотидов является только одной из форм накопления энергии клеткой, поскольку метаболическая энергия может накапливаться также в виде редокс-потенциала, трансмембранного электрохимического потенциала и т. д.

В настоящей статье приведены энергетические характеристики $K^+ - H^+$ обмена у бактерий *Serratia marcescens*, для которого нами изучены кинетические и электрохимические характеристики [3, 4].

Материал и методика. Бактерии *S. marcescens*, дикий тип, выращивали и подготавливали к опыту как описано [3, 4, 9]. Внутриклеточные концентрации K^+ определяли по количеству ионов калия, вышедшему из бактерий после толуольной обработки [11]. У предварительно обработанных ЭДТА клеток измеряли разность электрических потенциалов по описанному методу [12, 16]. В каждой указанной точке отбирали пробы на содержание АТФ, АДФ, белка и фосфата.

Для определения содержания фосфата 10—20 мл пробы дважды отмывали дистиллированной водой с мертвлятом (1%), ресуспендировали в 6%-ном растворе $HClO_4$ и инкубировали в течение 30 мин на водяной бане при 3—4°C. После удаления осадка супернатант нейтрализовали раствором 2М $KOH + 0,1 M MOPS$ и в нем определяли количество ортофосфата по методу Беренблума и Чейна [6] в модификации Вебб-Малербе [26]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 670 нм. Чувствительность метода 0—30 мкг фосфора.

Приготовление люциферин-люциферазного экстракта светлячков описано в работе [27]. Экстракт использовали в течение 8 ч после приготовления.

Экстракцию АТФ и его количественное определение проводили по методу Баккера и Малербе [5] в нашей модификации. Тушение люминесценции, пропорциональное количеству АТФ, регистрировали на люцинометре ЛКВ-1250 в смеси 50 мкл экстракта АТФ и 1 мл люциферин-люциферазного экстракта.

Количественное определение АДФ проводили путем конвертирования в АТФ по разности конечного его количества и измеренного до конверсии как описано выше.

Скорость поглощения кислорода определяли полярографическим методом из установке, с обратной и люксаном предоставленной нам для работы Ильченко А. П. (ИБФМ АН СССР, г. Пушкино). Показания полярографа LP-7 регистрировали самозписем ЕЗ-7. Скорость дыхания рассчитывали по предварительно снятой калибровочной кривой в мл/мин.

Для определения количества белка к 3 мл бактериальной суспензии приливали 3 мл 20%-ной ТХУ, выдерживали 10 мин в кипящей водяной бане и осаждали в течение 10 мин при 5000 об/мин. К растертому осадку прибавляли 100 мкл концентрированного и 3 мл разбавленного в отношении 1:10 аммиака. Далее количество белка определяли по Лоури [17].

В работе использованы следующие реактивы: ФЭП—фосфоэнолпируват, тринариевая соль кристаллическая (Сигма); ПК—пируваткиназа (Сигма); $MOPS-3-(N$ -мирифолл)пропансульфонкислота (Сигма); Трис- HCl (Серва); АТФ—адепозин-5-трифосфат, динатриевая соль (Сигма); KCl перекристаллизованный (Сигма); арабиноза (Реанал); трицин (Сигма); ЭДТА—этилендиамин- N,N,N',N' -тетрауксусной кислоты динатриевая соль (Серва); ДТТ—дитиотритол (Серва); альбумин (Кох-Лайт); остальные реактивы—ося.

Результаты и обсуждение. В предыдущей работе [3] было показано, что бактерии *S. marcescens* в присутствии экзогенного источника

энергии способны осуществлять электрогенный транспорт K^+ внутрь клеток, выращенных как на минимальной солевой среде с сукцинатом натрия и принудительной аэрацией, так и на пептонной среде с глюкозой без принудительной аэрации. В настоящей работе измерены скорость дыхания, концентрация нуклеотидов АТФ, АДФ и неорганического фосфата у аэробных и анаэробных клеток в условиях ранее описанного эксперимента. В обоих случаях в присутствии глюкозы введение в среду ионов калия резко усиливает дыхание (рис. 1). Этот эффект

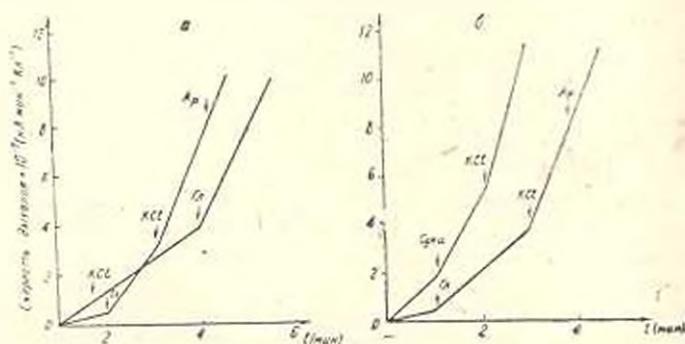


Рис. 1. Зависимость скорости дыхания от присутствия ионов K^+ у анаэробных (а) и аэробных (б) клеток. Гл—глюкоза, 10 мМ; Ар—арабиноза, 200 мМ; КСл—100 мМ; Суци—сукцинат натрия, 10 мМ.

можно объяснить, предположив, что энергозависимый транспорт K^+ внутрь бактерий шунтирует дыхательную цепь и для поддержания мембранного потенциала необходимо усиление дыхания. Клетки, выращенные различными способами, обладают одинаковой интенсивностью дыхания. Различие между ними проявляется по их реакции на введение ДЦКД (N,N'-дициклогексилкарбодимида)—ингибитора протонной АТФ-азы VF_0F_1 (рис. 2 а). В случае аэробов ДЦКД увеличивает вели-

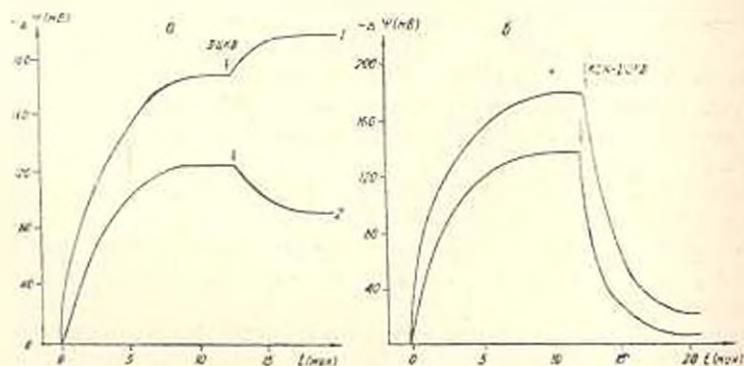


Рис. 2 а) Влияние ДЦКД на величину мембранного потенциала у аэробов (1) и анаэробов (2). ДЦКД— $5 \cdot 10^{-4}$ М. б) Влияние KCN и ДЦКД на величину мембранного потенциала у аэробов (1) и анаэробов (2). KCN—10 мМ; ДЦКД— $5 \cdot 10^{-4}$ М.

чину мембранного потенциала, так как в его присутствии блокируется шунтирующий ток ионов водорода через комплекс VF_0F_1 , работающий

в режиме синтеза АТФ. У клеток, выращенных без принудительной аэрации с глюкозой, ДЦКД, наоборот, снижает $\Delta\psi$, так как в этом случае подавляется работа H^+ -АТФ-азы, транспортирующей H^+ из клетки в среду и генерирующей мембранный потенциал за счет гидролиза АТФ. Роль дыхательной цепи в данном случае у анаэробных клеток, по-видимому, заключается в стабилизации величины мембранного потенциала, так как ДЦКД снижает $\Delta\psi$ у них всего на 25–30 мВ, в то время как у строго анаэробных клеток ДЦКД полностью блокирует его. Совместное присутствие KCN + ДЦКД почти полностью снижает величину мембранного потенциала у клеток обоих типов (рис. 2 б). Как видно из рис. 2, отличие анаэробных клеток от аэробных проявляется и в более низких значениях мембранного потенциала, как у *E. coli* [22]. Для *S. marcescens* это соответственно 130 и 175 мВ.

На рис. 3 приведены данные о внутриклеточной концентрации АТФ, АДФ и фосфата у *S. marcescens* в различных условиях опыта. Обращает на себя внимание тот факт, что аэробные и анаэробные клетки резко различаются по внутриклеточному содержанию нуклеотидов. У первых пул АТФ в среде роста значительно выше, чем у анаэробных, хотя разница во внутриклеточной концентрации АДФ у них значительно меньше. Аэробные и анаэробные клетки по-разному реагируют и на внесение в экспериментальный раствор источника энергии глюкозы и увеличение осмотического давления с помощью арабинозы. Аэробные клетки намного чувствительней анаэробных: пул АТФ в этих условиях у них возрастает быстрее. В модельном опыте, когда изучались потоки ионов, анаэробные клетки практически все это время сохраняли пул АТФ на уровне 5–7 мМ, а у аэробных клеток в течение всего эксперимента не прекращался рост внутриклеточной концентрации АТФ (от 2 до 8 мМ) (рис. 3). Эти результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными о том, что пул АТФ у отмытых клеток *E. coli* составляет

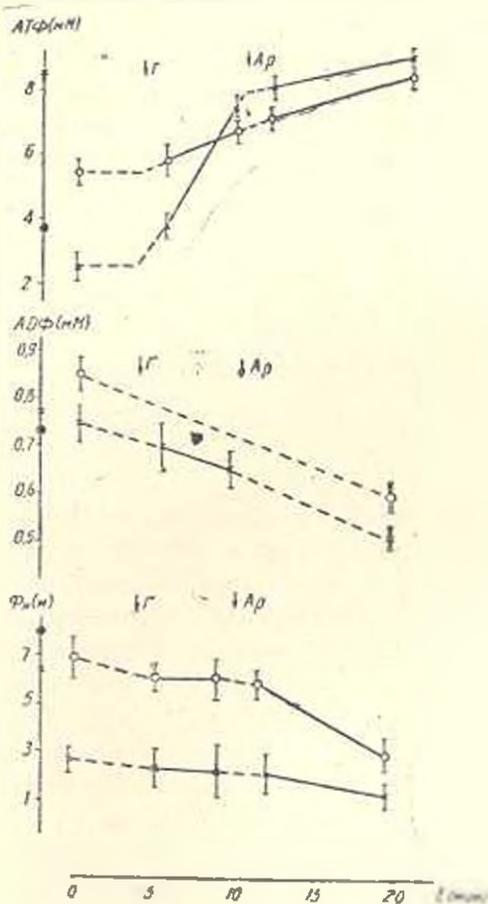


Рис. 3. Изменение внутриклеточных концентраций АТФ, АДФ и неорганического фосфата у *S. marcescens*. Гл—глюкоза, 10 мМ; Ар—арабиноза, 200 мМ. х—аэробные, о—анаэробные клетки.

3 мМ [18]. В отличие от аэробов, у которых энергия АТФ поставляется главным образом за счет окислительного фосфорилирования, у анаэробных клеток, хотя и функционирует дыхательная цепь (рис. 1 и 2), основным ее назначением в условиях нашего опыта, по-видимому, является не накопление АТФ, а стабилизация мембранного потенциала.

По формуле (2) нами рассчитан аденилатный заряд клеток *S. marcescens*. В бактериальной суспензии он равен 0,5 и 1,7 для анаэробов и аэробов соответственно, в чем проявляется еще одно различие между ними. После перенесения бактерий в экспериментальный раствор, содержащий глюкозу, аденилатный заряд возрастает в течение 5 мин до 3,3 у анаэробов и 4,8 — у аэробов. В точке максимального накопления ионов калия, вызванного в присутствии глюкозы положительным осмотическим шоком, аденилатный заряд достигает 7,3 и 5,9 у анаэробов и аэробов соответственно. Таким образом, возрастание аденилатного заряда в обоих случаях коррелирует с поглощением ионов калия.

Принимая в формуле (3) $\Delta G_p^0 = 30,6$, по данным рис. 3, рассчитываем фосфатный потенциал ΔG_p , равный 46,7 кДж/моль для аэробных клеток *S. marcescens* в присутствии глюкозы и арабинозы. Отношение ΔG_p к протондвижущей силе $\Delta \mu_{H^+}$ определяет стехиометрию $H^+ / \text{АТФ-насоса}$. Так как в условиях нашего эксперимента измеренное салициловым электродом значение $\Delta pH = 0$, то $\Delta \mu_{H^+} = F \cdot \Delta \Psi$. Таким образом, число протонов n , переносимых через мембрану *S. marcescens* при гидролизе одной молекулы АТФ, равно:

$$n = \frac{\Delta G_p \text{ АТФ}}{\Delta \mu_{H^+}} = \frac{\Delta G_p \text{ АТФ}}{F \cdot \Delta \Psi} = 3,0, \quad (5)$$

где значение $\Delta \Psi$ для аэробных клеток в присутствии глюкозы и арабинозы принято равным 160 мВ [4]. Значение $H^+ / \text{АТФ} = 3$, полученное нами для *S. marcescens*, хорошо согласуется со значениями, приводимыми в литературе для хлоропластов, митохондрий и бактериальных везикул [2]. С помощью различных методов для целого ряда микроорганизмов было установлено, что значения стехиометрии $H^+ / \text{АТФ}$ лежат в области от 2 до 5 [8, 13, 23]. Оценка $H^+ / \text{АТФ}$ стехиометрии ранее проводилась для молочнокислых бактерий *St. lactis* [19].

Было показано, что это соотношение равно 2 в условиях искусственной энергизации мембраны либо с помощью индуцированного калиево-мицином калиевого потенциала, либо искусственно созданным трансмембранным рН градиентом [20, 21]. Для гликолизующих клеток *St. lactis* при рН 5 стехиометрия $H^+ / \text{АТФ} = 3$ [19]. На клетках *E. coli* стехиометрия $H^+ / \text{АТФ}$ определялась при различных рН: при рН 6,25 $H^+ / \text{АТФ} = 2,5$, а при рН 8,25 $H^+ / \text{АТФ} = 4$ [14]. Позже тот же автор показал, что при нейтральных значениях рН среды у анаэробных *E. coli* $H^+ / \text{АТФ} = 3$ [15]. Аналогичные исследования на клетках *Streptococcus cremoris* показали, что стехиометрия $H^+ / \text{АТФ}$ близка к 2, но может достигать 5 у растущих клеток [7, 24].

Мы оценили также стехиометрию предполагаемого K^+ -насоса у анаэробных клеток. Равновесный калиевый потенциал E_{K^+} , рассчитанный по калиевому градиенту, определяемому толуольным методом, оказался равным 200 мВ. Таким образом, $K^+ / \text{АТФ} = \frac{\Delta Q_{K^+}}{F \cdot E_{K^+}} = 2,2$.

Нами показано, что ионы калия поглощаются против градиента концентраций, используя либо энергию электрического поля, либо АТФ [4]. На основании приведенных данных следует предположить, что в бактериях *S. marcescens* оперирует электрогенный конститутивный насос, трансформирующий энергию гидролиза АТФ в работу по транспорту калия, со стехиометрией переноса $K^+ / \text{АТФ}$ близкой к 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левинджер А., Биохимия, М., 1974.
2. Николс Д. Дж. Биоэнергетика, М., 1985.
3. Хачатрян А. Ж. Биолог. ж. Армении, 39, 3, 1986.
4. Хачатрян А. Ж., Дургарьян С. С., Мартиросов С. М. Биофизика, 1986 (в печати).
5. Bakker E. P., Mangerich W. E. Biochem. Biophys. Acta, 730, 379, 1983.
6. Berenblum J., Chain E. Biochem. J., 32, 295, 1938.
7. Brink B., Konig W. N. J. Bacteriol., 152, 2, 682, 1982.
8. Dawson M. J., Jones C. W. Arch. Microbiol., 133, 55, 1982.
9. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 554, 1978.
10. Ereclinska M., Wilson D. F. Trends in Biochem. Sci., 8, 219, 1978.
11. Eisenstadt E. J. Bacteriol., 12, 264, 1982.
12. Grinluulene B., Chmelianskaite V., Grintus J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 206, 1974.
13. Guffanti A. A., Susman P., Blanc R., Krulwich T. A. J. Biol. Chem., 253, 708, 1978.
14. Kashket E. R. Biochemistry, 21, 22, 5534, 1982.
15. Kashket E. R. FEBS Lett., 154, 2, 343, 1983.
16. Liberman E. R., Topuly V. P. Biochem. Biophys. Acta, 103, 125, 1968.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
18. Maloney P. C., Kashket E. R., Wilson T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3896, 1974.
19. Maloney P. C. J. Bacteriol., 153, 3, 1461, 1983.
20. Maloney P. C. J. Bacteriol., 132, 3, 564, 1977.
21. Maloney P. C., Hansen F. C. J. Membran. Biol., 66, 63, 1982.
22. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 12, 25, 1985.
23. Mitchell H., Osterhoff D. Biochemistry, 19, 4507, 1980.
24. Otto R., Klont B., von Brink B., Konings W. N. Arch. Microbiol., 139, 4, 338, 1984.
25. Slater E. C. Methods in Enzymology, 55, 235, 1979.
26. Weil-Matherbe H., Green K. Biochem. J., 49, 286, 1951.
27. Zech H. J. Appl. Biochem., 3, 473, 1981.

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, г. Пушкино,
Научно-исследовательский технологический институт
аминокислот, Ереван

Поступило 5.XI 1985 г.