

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ СМЕШАННОМ БРОЖЕНИИ У *ESCHERICHIA COLI* В ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОЙ ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЕ

Г.Р. КИРАКОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 375025

Escherichia coli MC4100 is able to grow in anaerobic conditions in hyper-osmotic media containing either 0.3 M or 0.5 M sodium chloride or with equivalent quantity sucrose at pH 9.0. In this case in the alkaline medium with glucose they implement mixed fermentation, during which occur decrease of oxidation-reduction potential (ORP) with produced of fermentative gas – molecular hydrogen. In the experimental conditions it also decreases of ORP from positive ($+140 \pm 10$ mV) to negative (-465 ± 52 mV) values. However sodium chloride decreased duration of bacterial growth rate and intensity of oxidation-reduction processes and production of molecular hydrogen has been reduced. Proline of 2mM is able to increase the growth rate but not intensity of oxidation-reduction processes and doesn't restore the production of molecular hydrogen.

Escherichia coli - гиперосмотический стресс - окислительно-восстановительный потенциал - производство H_2 - пролин

Escherichia coli могут расти в анаэробных и аэробных условиях, в гипер- и гипоосмотической, кислой и щелочной среде.

В анаэробных условиях в отсутствие внешних акцепторов электронов эти бактерии сбраживают сахара, в результате их окисления происходит образование H_2 и его выделение в среду [11]. Последний процесс осуществляется посредством мембранно-связанного фермента - формат водородлиазы (ФВЛ), включающей в себя формат дегидрогеназу H_2 , переносчики электронов и гидрогеназу 3 [11], или гидрогеназу 4 [4]. Предполагается, что ФВЛ (с гидрогеназой 4) взаимодействует с механизмом, образованным протонной F_0F_1 -АТФазой и TrkA системой поглощения K^+ и осуществляющим обмен $2H^+$ цитоплазмы на один K^+ среды [12], когда окислительно-восстановительные эквиваленты, отделяемые от продукта брожения формата, переходят на F_0F_1 и TrkA, обеспечивая дитиол-дисульфидное превращение на TrkA с высвобождением энергии, используемой для поглощения K^+ . Такой механизм $2H^+/K^+$ -обмена играет роль в регуляции внутриклеточного pH и тургора бактерий, поддержания $\Delta\mu_H^+$ и в других процессах [12]. Он имеет, возможно, первостепенное значение для роста

бактерий в гиперосмотических средах, содержащих хлорид натрия или другие соли и сахара.

При гиперосмотическом стрессе, создаваемом хлоридом натрия или несбраживаемыми сахарами, поглощение K^+ с высокой скоростью может осуществляться посредством TrkA [13] и через Kup [14], а в регуляции гургора бактерий важна роль не только глутамата [8], но и, как показано ранее [8], пролина или других осмотически активных веществ. Однако в щелочных средах, когда TrkA система, по-видимому, не взаимодействует с F_1F_0 -АТФазой с формированием механизма $2H^+/K^+$ -обмена [13] и Kup скорее всего неактивна [14], а ФВЛ, возможно, не индуцируется [11], особенности окислительно-восстановительных процессов и преодоление гиперосмотического стресса бактериями не изучены.

В настоящей работе показано, что в щелочной среде (рН 9,0) интенсивность окислительно-восстановительных процессов при росте *E. coli* в анаэробных условиях в гиперосмотических средах, содержащих NaCl, уменьшается, производство H_2 подавляется. Однако при таком рН пролин, увеличивая скорость роста бактерий в средах с высокой осмотичностью, не усиливает окислительно-восстановительные процессы и не восстанавливает производство H_2 .

Материал и методика. Бактерии и их выращивание. В работе использовали штамм *E. coli* MC4100 [2], который был получен от С. Андреса (Школа зоологии, микробиологии университета Рединга, Великобритания).

Выращивание бактерий в анаэробных условиях в пептонной или минимально солевой среде с глюкозой описано ранее [1]. Осмотичность среды увеличивали введением NaCl или сахарами, эквивалентность которых рассчитывали как ранее [9]. Удельную скорость роста определяли как частное от деления 0,693 ($\ln 2$) на время удвоения оптической плотности (при длине волны в 600 нм) в интервале, когда изменение логарифма оптической плотности во времени носило линейный характер [10], продолжительность лаг-фазы определяли как описано [2].

Измерение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). Величину ОВП суспензии бактерий измеряли с помощью пары окислительно-восстановительных электродов – платинового типа ЭПВ-01 (E_{H_2}) и титан-силикатного типа ЭО-01 (E_{Fe}^3/Fe^2), как описано ранее (завод измерительных приборов, г. Гомель, Беларусь) [1, 2, 5].

Определение производства H_2 . Выделение ферментативного газа при росте бактерий наблюдали в тест-трубках [6]. Производство H_2 бактериями в экспериментальной среде определяли по разности значений электродных (платинового и титан-силикатного) потенциалов [1, 2, 6], когда в отличие от платинового титан-силикатный электрод был нечувствителен к H_2 и O_2 , и его показания не “искажались” последними. При рН 7,5 разность и скорости падения электродных потенциалов составляли в 4,7–6,7 мВ/мин.мг сухого веса в суспензии *E. coli* MC4100 указывала на производство H_2 [1, 5]. При рН 9,0 эта же разность составляла 2,0 мВ/мин.мг сухого веса (табл.). Образование H_2 подтверждали и химическим методом, основанным на обесцвечивании раствора перманганата в присутствии H_2 [2, 5].

Другие методы и реактивы. Подготовка бактерий к измерениям не отличалась от ранее описанной [1, 2, 6]; в качестве экспериментальной среды использовали 200 мМ фосфатно-триосового буфера (рН 9,0), содержащего 0,1 мМ сульфата магния, 1 мМ KCl. Количество бактерий в единице объема определяли подсчетом колоний после высева клеток на твердые питательные среды, а сухой вес – взвешиванием после высушивания суспензии [3]. Приводятся средние арифметические величины двух-трех независимых измерений, стандартная ошибка которых не превышает 5%.

Применяли глюкозу от Борисовского завода медицинских препаратов (Беларусь), бактериальный агар, пептон, пролин от фирмы “Sigma” (г. Сент-Луис, США) и другие реактивы аналитической чистоты.

Результаты и обсуждение. Бактерии *E. coli* в гиперосмотической щелочной среде. Рост *E. coli* в гиперосмотической среде в анаэробных или аэробных условиях, в слабощелочных и кислых средах показан во многих работах [1, 9]. Весьма интересным является то, что эти бактерии способны расти в такой среде, но достаточно чувствительны к присутствию ионов натрия. Возможно, это связано с низкой активностью Na^+/H^+ -антипортеров [15], недостаточной для выведения накапливающихся в цитоплазме ионов натрия, оказывающих токсичный эффект.

На самом деле рост *E. coli* MC4100 подавляется в присутствии 0,3 М NaCl и еще более - 0,5 М NaCl при росте бактерий в среде с pH 9,0 (рис. 1А). При этом значительно увеличивается (в 2 раза) продолжительность лаг-фазы (рис. 1Б). Интересно, что при таком pH скорость роста *E. coli* в гиперосмотической среде, содержащей 0,5 М NaCl, значительно ниже, чем в слабощелочной среде [15].

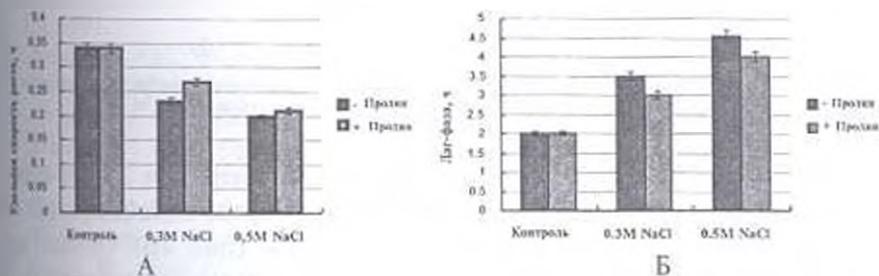


Рис. 1. Влияние NaCl на ростовые характеристики *E. coli* MC4100 в щелочной среде в отсутствие и в присутствии пролина. А - удельная скорость роста, Б - продолжительность лаг-фазы роста. Протин добавляли в концентрации 2 мМ, в остальном см. Материалы и методика.

С падением скорости роста бактерий в среде с NaCl при pH 9,0 уменьшается и интенсивность окислительно-восстановительных процессов: значение E_h снижается до -205 ± 15 мВ (рис. 2А и 2Б), а производство H_2 практически отсутствует (табл.). Подобные эффекты не наблюдаются в гиперосмотической среде, содержащей 0,75 М сахарозы, когда E_h падает до 570 ± 10 мВ (не показано). Вместе с гем, разность в падении значений E_h и E_h^0 (табл.) может свидетельствовать о выделении H_2 . Этот результат указывает на то, что ФВЛ, ответственная за образование H_2 [4, 5, 11], чувствительна к осмотичности и pH среды. При щелочном pH нельзя исключить и возможность выделения H_2 через другой путь.

Влияние пролина на интенсивность окислительно-восстановительных процессов и производство H_2 бактериями. Протин, как было показано ранее [1], увеличивает скорость роста *E. coli* в анаэробных условиях в гиперосмотической среде. Такое действие он может оказывать, по-видимому, за счет прохождения во внутрь клетки с участием ProP системы, катализирующей сопряженный с ионами натрия транспорт пролина [16], или же с участием второй, ProU системы, активируемой при гиперосмотическом стрессе посредством K^+ или глутамата [8]. Активность

этих транспортных систем в щелочной среде мало изучена. Затем пролин, возможно, взаимодействует с белками, приводя к замене ионов в окружении белков и снимая ингибирующее действие Na^+ на их активность [7]. В то же время показано, что накопление пролина повышает внутриклеточное содержание K^+ и глутамата, что сопровождается или определяет значительным увеличением объема воды в цитоплазме [6]. Здесь нельзя исключить и включение пролина в метаболические пути с образованием соединений, воздействующих на отмеченные процессы.

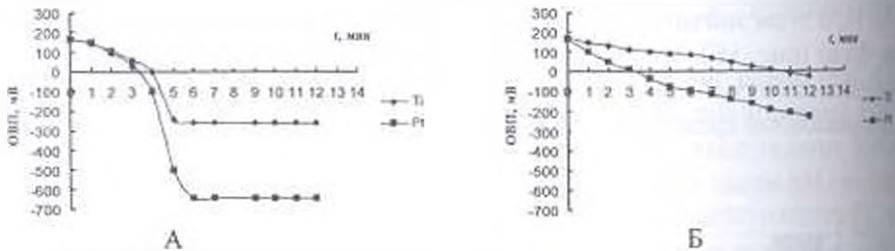


Рис. 2. Кинетика изменения ОВП в суспензии *E. coli* MC4100, выращенных в анаэробных условиях при pH 9,0 в срезах с различной осмотичностью в отсутствие (А) и в присутствии (Б) 0,5 М NaCl.

Нам удалось показать, что пролин (в концентрации 2 мМ) может стимулировать рост *E. coli* в гиперосмотической среде с NaCl при pH 9,0 (рис. 1А) и снижать продолжительность лаг-фазы (рис. 1Б). Однако при pH 9,0 он не увеличивает интенсивность окислительно-восстановительных процессов в анаэробной суспензии *E. coli* и не восстанавливает производство H_2 (табл.), как это происходило при pH 7,5 [1]. Такой результат может указывать на изменения в PtoP и PtoU транспортных системах, либо на роль внутриклеточного K^+ , содержание которого за счет отличной работы TtkA системы ниже в щелочной среде.

Таблица. Влияние пролина на интенсивность окислительно-восстановительных процессов и производство H_2 у *E. coli* MC4100, выращенных в анаэробных условиях в гиперосмотической среде при pH 9,0.

Условия роста и эксперимента	Изменение ОВП, мВ/мин.мг сухого веса		Производство H_2
	E_b	E'_b	
без NaCl или сахарозы	3,7	1,8	+ (1,9)
без NaCl, пролин	3,8	2,0	+ (1,8)
0,3 М NaCl	2,2	1,6	- (0,6)
0,5 М NaCl	1,2	1,1	- (0,1)
0,75 М сахарозы	3,0	1,4	+ (1,6)
0,3 М NaCl, пролин	2,1	1,8	- (0,3)
0,5 М NaCl, пролин	1,5	1,1	- (0,4)

В скобках приводится разность начальных скоростей падения этих электродных потенциалов в среде, содержащей 22 мМ глюкозы.

Автор выражает благодарность проф. А. Трчуняну за ценные советы и замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киракосян Г., Баграмян К., Трчунян А. Биофизика. 46, 245, 2001.
2. Киракосян Г., Баграмян К., Трчунян А.А. Биофизика. 50, 1097, 2005.
3. Трчунян А.А., Василян А.В. Биохимия. 58, 1064, 1993.
4. Andrews S.C., Berks B.C., McClay J., Amhler A., Qiaill A.M., Golby P., Guest R.G. Microbiology. 143, 3633, 1997.
5. Bagramyan K., Mnatsakanyan N., Poladian A., Vassilian A., Trchounian A. FEBS Lett. 516, 172, 2002.
6. Cayley S., Lewis B.A., Record M.T. J. Bacteriol. 174, 1586, 1992.
7. Csonku L.N., Epstein W. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Molecular and Cell Biology. C. Neinhart (Editor-in-Chief). ASM Press, Washington DC. 1, 1210, 1996.
8. Gowrishankar J.M.D. Genetica. 97, 363, 1996.
9. Houssin C., Eynard N., Schechter E., Ghazi A. Biochim. Biophys. Acta. 1056, 76, 1991.
10. Neidhardt F.C., Bloch P.L., Smith D.F. J. Bacteriol. 119, 736, 1974.
11. Sauter M., Bohm R., Bock A. Mol. Microbiol. 6, 1523, 1992.
12. Trchounian A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 315, 1051, 2004.
13. Trchounian A.A., Ogandjanian E.S., Vanian P.A. Curr. Microbiol. 29, 187, 1994.
14. Trchounian A., Kobayashi H. FEBS Lett. 447, 144, 1999.
15. Trchounian A., Kobayashi H. Curr. Microbiol. 39, 109, 1999.
16. Quick M., Jung H. Biochemistry. 36, 4631, 1997.

Поступила 19.IV.2006