

ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ АНАЭРОБНОГО РОСТА БАКТЕРИЙ

А.П. ЗАХАРЯН, Э.А. КАРАГУЛЯН, А.А. ТРЧУНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 375049

Показано, что в процессе анаэробного роста *Escherichia coli* К 12 (λ) рН и окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) среды резко падают, достигая минимальных значений в середине логарифмической фазы, и затем медленно возрастают, далеко не доходя до исходных значений. В процессе роста мутанта *E.coli* AN 718 с неработающим H^+ - АТФазным комплексом F_1F_0 минимальные значения рН и ОВП среды наблюдаются значительно позднее, после перехода культуры в стационарную фазу. Предполагается, что резкое падение этих параметров среды в процессе анаэробного роста бактерий обуславливается не одними и теми же, а различными транспортными механизмами мембран бактерий, зависит от работы F_1F_0 и не определяет переход в стационарную фазу.

Ցույ է տրված, որ *E.coli* К 12 (λ) -ի անտրոք աճի ընթացքում միջավայրի рН-ն և օքսիդա-վերականգնման պոտենցիալը կտրուկ ընկնում են, հասնելով մինիմալ արժեքների լոգարիթմական փուլի միջին ժամանակահատվածում, և այնուհետև դանդաղ աճում, չհասնելով սկզբնական արժեքներին: Օգործող H^+ - ԱՏՖազային F_1F_0 կոմպլեքսով *E.coli* AN 718 մուտանտի աճման ժամանակ միջավայրի рН-ի և օքսիդա-վերականգնման պոտենցիալի մինիմալ արժեքները դիտվում են ավելի ուշ՝ ստացիոնար փուլ անցնելուց հետո: Ենթադրվում է, որ բակտերիաների անտրոք աճի ընթացքում միջավայրի այդ պարամետրերի կտրուկ անկումը պայմանավորված է բակտերիաների մեմբրանների ոչ թե միևնույն, այլ տարբեր տրանսպորտային մեխանիզմներով, կախված F_1F_0 -ի աշխատանքից և չի որոշում անցումը ստացիոնար փուլ:

The medium pH and redox potential decrease at the anaerobic growth of *E.coli* К 12 (λ), achieving minimal values at the middle of log-phase, and then increase but not achieving initial values. The minimal values of pH and redox potential at the growth of mutant *E.coli* AN 718 with the unfunctioning H^+ - ATPase complex F_1F_0 are observed considerably later after transition into state-phase. The abrupt decrease of these parameters of medium at the anaerobic growth of bacteria conditioned by different mechanisms of bacterial membranes, depends on operation of F_1F_0 and does not determine the transition into state-phase which is supposed.

Бактериальные мембраны - анаэробный рост - окислительно-восстановительный потенциал - рН - оптическая плотность

В последние годы достигнуты успехи в изучении действия физико-химических факторов, важных для регуляции микробного метаболизма, на функционирование бактериальных мембран. Большое внимание уделяется, например, ОВП среды [8-9], по крайней мере по двум причинам: во-первых, в процессе роста бактерий наблюдается его резкое падение [3,5,8], что является результатом выброса окислительно-восстановительных эквивалентов в среду, связано с деэнергизацией мембраны и снятием ионных градиентов между клеткой и средой [4] и определяет переход культуры в стационарную фазу роста; во-вторых, этот параметр среды играет, по-видимому, важную роль в регуляции транспортных механизмов мембраны [11,14,16,23].

Обнаружив способность анаэробно выращенных *E.coli* и других бактерий

обменивать 2Н⁺ клетки на один К⁺ среды с участием F₁F₀ и Trk системы поглощения К⁺ и создавать высокое распределение К⁺ между клеткой и средой [10,20], мы предложили принцип прямого внутримембранного взаимодействия транспортных систем (F₁F₀ и Trk системы) с образованием белок-белковых суперкомплексов для совместного использования конвертируемой энергии [18-21]. В последующем было показано, что при обмене 2Н⁺ клетки на один К⁺ среды с участием F₁F₀ и Trk системы у анаэробно выращенных бактерий в условиях отсутствия нитратов происходит выделение Н₂, которое задерживалось окислителем (феррицианидом) и ускорялось сульфидрильным реагентом (дигидротейтолом): постулирована роль формиат-водородлиазы, участвующей в производстве Н₂, во взаимодействии F₁F₀ с Trk системой с осуществлением реакции 2 SH → S-S + H₂, при этом часть энергии гидролиза АТФ тратится на перенос восстановительных эквивалентов от муравьиной кислоты к дисульфидным группам между транспортными белками [11]. Сложность модели заключается и в том, что окисление формиата с выделением Н₂ нуждается в стимуляторе - в электрохимическом протонном градиенте (ΔрН) или, может быть, в ОВП.

Вместе с тем, при изучении транспортных процессов необходимо большее внимание уделять физиологии бактерий с выявлением роли физико-химических факторов в совокупности [9], ибо здесь могут быть найдены новые возможности в раскрытии механизмов регуляции микробного метаболизма и поиске путей повышения эффективности использования бактерий в биотехнологии.

Мы задались целью изучить особенности изменения рН и ОВП среды в процессе анаэробного роста *E.coli* и попытаться выявить определяющие эти изменения мембранные механизмы бактерий.

Материал и методика. Бактерии и их выращивание. В работе использовали граммотрицательные факультативно анаэробные бактерии: дикий тип *E.coli* К 12(λ) и мутанты *E.coli* AN 718 и ТК 509.

Бактерии выращивали в анаэробных условиях в питательной среде с глюкозой [13] в колбах

Краткое описание мутантов *Escherichia coli*, использованных в работе.

Мутант	Получен	Генотип	Дефектный белок	Литература
AN 718	от В.Бахманн (Генетический центр, Нью-Хейвен, США)	F ⁺ arg11 catA403 pyrE41 uncA401 rpsL109 supE44	α-субъединица F ₁	[15]
TK 509	от Э.Ваккера (Оснабрюкский университет, ФРГ)	F ⁺ lac mal tha nadA trkA405 trkD1	TrkA	[22]

(отношение объемов среды и колбы 1:1,25) без встряхивания при 37°, при этом бактерии инокулировали в ростовые среды с чашек с твердой средой или из почной культуры, выращенной в той же среде. Характер секреции лактата и генерации мембранного потенциала у этих бактерий, показанный нами ранее [17,20], соотношение количества секретируемых бактериями Н⁺ с количеством утилизированной глюкозы, определяемое для малого промежутка времени, равное 2,0, и другие факты также говорят об анаэробных условиях выращивания бактерий.

Титр бактерий определяли подсчетом колоний после высева разведенной суспензии на твердые среды и фотометрически с помощью фотометра КФК-3 при длине волны 560 нм.

Определение физико-химических параметров среды. рН среды определяли потенциометрическим методом с помощью иономера ЭВ-74 со стеклянным электродом типа ЭСЛ-

63-07 [13], ОВП - с платиновым электродом типа ЭПВ-1 после установления значения в течение 15 мин [1]. Определение ОВП в нашей лаборатории с помощью титаново-силикатного электрода, чувствительного к H_2 [11], воспроизводило кинетику ОВП, определяемого с помощью платинового электрода, в среде с бактериями при $H^+ - K^+$ - обмене [1]. О количественном изменении активности H^+ в среде судили по результатам титрования соляной кислотой в малых концентрациях для диапазона изменений рН. Концентрацию глюкозы в среде определяли фотоэлектроколориметрически с помощью О-толуидина [12].

Приведенные кривые построены по средним арифметическим значениям определяемых параметров, стандартная ошибка которых не превышает 5%.

В работе использовали пептон (Фармахим, Болгария), глюкозу (Московский химфармзавод), трис (Реапал, Венгрия), стандартные буферные растворы (Радиометер, Дания) и другие реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение. 1) *Изменение рН и ОВП среды в процессе анаэробного роста E.coli.* Ряд авторов [3-7] наблюдали изменения рН и ОВП среды в процессе роста *E.coli* и других бактерий в солевых средах в аэробных условиях в режиме периодического культивирования. Мы же изучали изменения этих параметров в процессе анаэробного роста *E.coli* в пептонной среде с глюкозой [13], когда была обнаружена их способность обменивать $2H^+$ клетки на один K^+ среды с участием F_1F_0 и Trk системы и создавать высокое распределение K^+ между клеткой и средой [10,20]. При этом, бактерии, выращенные в таких условиях, обладают $\Delta\psi$ независимо от наличия экзогенного источника энергии [17] и отрицательным поверхностным зарядом, отражающим характер обмена H^+ клетки на K^+ среды [2].

В процессе анаэробного роста *E.coli* К 12 (λ) в пептонной среде с глюкозой при увеличении оптической плотности суспензии и убыли концентрации глюкозы в среде наблюдаются изменения рН и ОВП среды. При этом в течение 3ч после инокуляции среды бактериями как с чашек с твердой средой (рис. 1), так и из ночной культуры (не показано) оптическая плотность возрастает незначительно, титр бактерий не

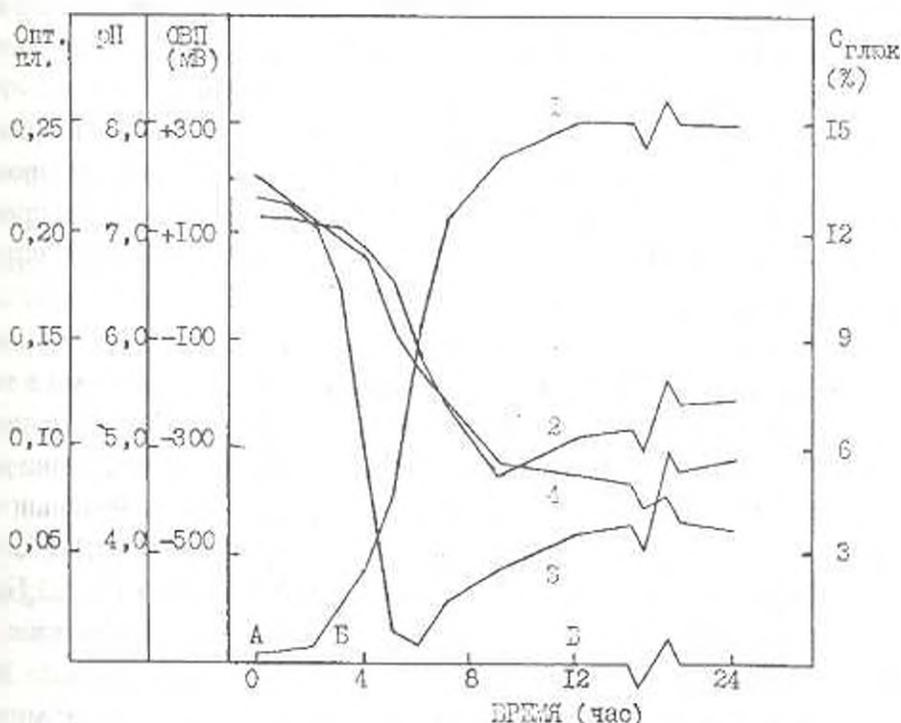


Рис. 1. Изменения оптической плотности (1), рН (2), ОВП (3) и концентрации глюкозы (4) в процессе анаэробного роста *E.coli* К 12 (λ) в пептонной среде с глюкозой.

превышает 10^5 , рН не претерпевает существенных изменений, а ОВП переходит от положительных значений к отрицательным до $-50-65$ мВ (рис.1,А). С четвертого часа с переходом в логарифмическую фазу роста оптическая плотность суспензии резко увеличивается и к девятому часу выходит на максимальный уровень, рН начинает постепенно падать, а ОВП претерпевает резкое падение до $-600-620$ мВ к пятому-шестому часу (рис.1,Б). Далее, после девятого часа с переходом в стационарную фазу роста продолжается утилизация глюкозы, но наблюдается некоторое повышение рН и ОВП среды (рис.1,В). В процессе анаэробного роста бактерий в петитной среде без глюкозы логарифмическая фаза роста значительно растягивается во времени, к девятому часу оптическая плотность не доходит даже до половины значений, наблюдаемых в процессе роста бактерий в среде с глюкозой, рН уменьшается незначительно, а ОВП падает лишь до -210 мВ (не показано).

Характер изменений рН и ОВП среды в процессе анаэробного роста *E.coli* в петитной среде с глюкозой указывает, скорее всего, на определенную связь между изменениями этих параметров. Вместе с тем, эти изменения позволяют допустить, что физиологическое состояние бактерий в разные фазы роста различно, что важно при изучении и, особенно, интерпретации транспортных процессов у них.

2) К механизму изменений рН и ОВП среды в процессе анаэробного роста *E.coli*. Выявленные изменения некоторых физико-химических параметров среды в процессе анаэробного роста бактерий поставили ряд вопросов, некоторые из которых были в центре нашего внимания (какими процессами обусловлены наблюдаемые изменения; взаимосвязаны ли они между собой; могут ли характеризовать физиологическое состояние бактерий?).

Падение рН в процессе роста бактерий может быть обусловлено не только выбросом кислых продуктов метаболизма глюкозы [3-5,8], например, молочной кислоты, но и секрецией H^+ из клеток с помощью протонных насосов мембраны, например, H^+ -АТФазного комплекса. Последующее его увеличение же может быть связано с утилизацией кислых продуктов метаболизма глюкозы, выброшенных клетками в среду, или со входом H^+ в клетку через протонные каналы.

Изменение же ОВП суспензии определяется скорее всего не выбросом веществ из клеток в среду, как предполагают одни авторы [3,4,8], а процессами, происходящими на поверхности мембраны бактерий, как это было показано нами [1] и предполагается другими авторами [5-7]. Здесь, возможно, играют роль генерация $\Delta\psi$ и перенос зарядов через мембраны бактерий [5-7].

С этой точки зрения было интересно изучить изменение тех же параметров в процессе роста в аналогичных условиях мутантов *E.coli* с дефектами в мембранных транспортных белках (рис.2). В процессе роста *E.coli* AN 718 с дефектом по α -субъединице F_1 и с неработающим H^+ -АТФазным комплексом падение рН в течение шести часов практически не наблюдается, затем он падает незначительно лишь до 6,1 (в процессе роста *E.coli* К 12 (λ) рН падает до 4,8) (ср. рис.2 и 1,Б). Скачок ОВП до -540 мВ запаздывает на 5-6ч по сравнению с *E.coli* К 12 (λ) (рис.2,Б). При этом минимальные значения рН и ОВП среды наблюдаются практически в одно и то же время. В процессе же анаэробного роста *E.coli* ТК 509 с дефектом по TrkA белку и с неработающей Trk системой поглощения K^+ запаздывает логарифмическая фаза роста, изменение рН с минимальным значением к девятому часу не отличается от

такового в процессе роста *E.coli* К 12 (λ) (ср. рис.2 и 1,Б). Быстрее начинается падение ОВП, но минимальное значение в -550-565 мВ наблюдается также к шестому часу, как в процессе роста *E.coli* К 12 (λ) (рис.2, Б).

Совокупность полученных данных указывает на то, что изменения рН и ОВП

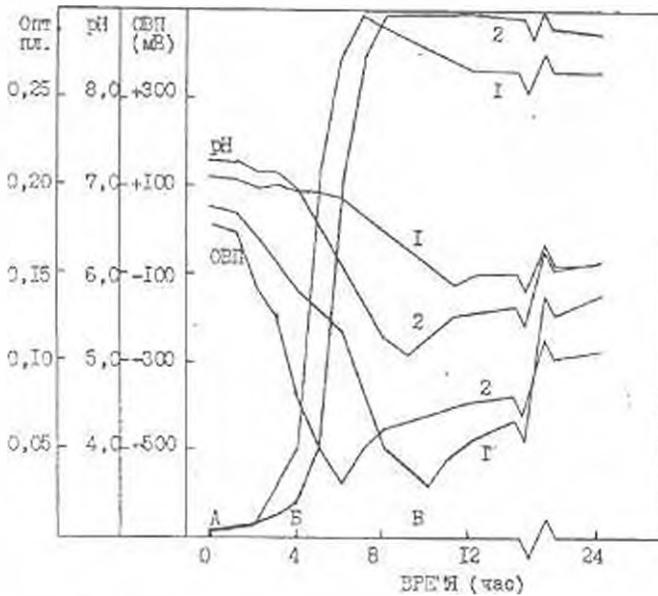


Рис.2. Изменения оптической плотности, рН и ОВП в процессе анаэробного роста мутантов *E.coli* AN 718 (1) и TK 509 (2) в питательной среде с глюкозой.

среды в процессе анаэробного роста *E.coli*, расходящиеся во времени, определяются разными механизмами, между которыми, по-видимому, не всегда существует однозначная связь. Далее, скачки этих параметров скорее всего не определяют переход культуры в стационарную фазу роста, ибо у мутанта *E.coli* AN 718 они наблюдаются значительно позднее, чем кривая роста оптической плотности выходит на стационарный уровень. Наконец, транспортные системы мембраны бактерий, а именно скорее всего F_1F_0 , нежели Tgk система, осуществляющие перенос H^+ и K^+ и участвующие в генерации и использовании ΔpH [17,19], влияют на изменения параметров среды в процессе анаэробного роста *E.coli*.

Остаются сложности в объяснении изменений ОВП в процессе роста бактерий. Резкое падение ОВП среды с последующим его возрастанием трудно объяснить, как полагают некоторые авторы [5-7], изменением ΔpH у бактерий, остановкой его генераторов. Необходимо учесть, что, во-первых, дикий тип и мутанты *E.coli*, выращенные в питательной среде с глюкозой, обладают ΔpH в -125-140 мВ независимо от наличия экзогенного источника энергии, который при введении глюкозы возрастает кратковременно на 20 мВ [17]; во-вторых, у мутантов наблюдается резкое падение ОВП среды до -540-565 мВ, как и у дикого типа, но ΔpH при введении глюкозы не возрастает [17]. Объяснение наблюдаемых изменений рН и ОВП среды в процессе анаэробного роста *E.coli* переносом зарядов через мембраны бактерий с изменением их концентраций в околоклеточном пространстве, отражающимся на ОВП среды [6-7], также вряд ли может быть однозначным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баграмян К.А., Карагулян Э.А., Трчунян А.А. и др. Биолог. журн. Армении, 41, 393-397, 1988.
2. Карагулян Э.А., Гонян С.А., Трчунян А.А. Биофизика, 29, 319-320, 1984.
3. Октябрьский О.Н., Пшеничнов Р.А., Ткаченко А.Г. и др. Микробиология, 50, 467-472, 1981.
4. Октябрьский О.Н., Пшеничнов Р.А. Микробиология, 51, 515-519, 1982.
5. Октябрьский О.Н., Смирнова Т.В., Зеленин Е.Н. Биофизика, 29, 831-834, 1984.
6. Октябрьский О.Н., Смирнова Т.В. Биофизика, 31, 459-463, 1986.
7. Октябрьский О.Н., Смирнова Т.В. Изв. АН СССР. Сер. биол., 4, 616-620, 1986.
8. Работнова И.Л. Роль физико-химических условий (рН и γH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов. М., 1957.
9. Работнова И.Л. Микробиология, 52, 166-168, 1983.
10. Трчунян А.А., Дургарьян С.С., Оганджян Е.С. и др. Биол. науки, 12, 82-88, 1986.
11. Bagratyan K.A., Martirosou S.M. FEBS Lett., 246, 149-152, 1989.
12. Bergmeyer H.U. Herausgegeben von Methoden der Enzymatischen Analyse, 1, 624-626, 1974.
13. Durgaryan S.S., Martirosou S.M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554-560, 1978.
14. Elferink M.G.L., Hellingwerf K.J., Nano F.E., et al. FEBS Lett., 167, 185-190, 1983.
15. Gibson F., Cox G.B., Downie J.A., et al. J. Biochem., 162, 665-670, 1977.
16. Konings W.N., Elferink M.G.L., Hellingwerf K.J., et al. Environmental Regulation of Microbial Metabolism. N.Y., London, 1984.
17. Martirosou S.M., Petrosian L.S., Trchounian A.A., et al. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 613-620, 1981.
18. Martirosou S.M., Trchounian A.A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 605-611, 1981.
19. Martirosou S.M., Trchounian A.A. Bioelectrochem. Bioenerg., 11, 29-36, 1983.
20. Martirosou S.M., Trchounian A.A. Bioelectrochem. Bioenerg., 15, 417-426, 1986.
21. Martirosou S.M., Ogandjanian E.S., Trchounian A.A. Bioelectrochem. Bioenerg., 19, 353-357, 1988.
22. Rhoads D.B., Epstein W. J. Biol. Chem., 252, 1394-1401, 1977.
23. Robillard G.T., Konings W.N. Eur. J. Biochem., 127, 597-603, 1982.

Поступила 30.1.1991

Биолог. журн. Армении, 1-2 (49), 1996

УДК 612.017.4-006.6

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ
НЕКОТОРЫХ БИОПОЛИМЕРОВ

А.С. АГАБЯН, Р.А. ЗАХАРЯН, О.Я. ДАВТЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375044, Ереван

В работе проведено сравнительное изучение противоопухолевой активности ряда интерферон-индуцирующих биополимеров. Показано, что двухспиральная РНК, используемая в виде кальциевого преципитата, в отличие от официального препарата нуклеината натрия обладает выраженным противоопухолевым действием. Значительное противоопухолевое действие обнаружено также у эндогенного, выделенного из *Bacillus thuringiensis*. Предполагается, что оба биополимера осуществляют свое противоопухолевое действие посредством стимуляции синтеза эндогенного интерферона.