

УДК 582.232: 577.352: 54-128.4

СКОЛЬЗЯЩЕЕ ДВИЖЕНИЕ ПРЕСНОВОДНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ *PHORMIDIUM UNCINATUM* В УСЛОВИЯХ НИЗКОГО ΔpH^+

Ишмухаметов Р. Р., Чабан Ю. Л.

На сегодняшний день считается, что прокариотические организмы обладают как протонным, так и альтернативным (натриевым [1,2], хлорным [3]) сопрягающими циклами. Было также высказано предположение о существовании кальциевого цикла [4]. Индукция того или иного цикла определяется изменением параметров среды обитания, например, «цветением» воды и повышением pH в ходе бурного роста автотрофных организмов при эвтрофикации или изменением ионного состава воды в период паводков или засухи. Подпадающими под эти условия являются небольшие пресные водоемы со слабым перемешиванием воды либо же эстуарии с их нестабильным гидрологическим режимом.

Часто именно цианобактерии являются группой прокариот, наибольшей по биомассе и определяющих первичную продукцию биоценоза в таких условиях. Поэтому понимание принципиальных биоэнергетических механизмов адаптации цианобактерий к изменяющимся условиям может позволить как ограничивать, так и интенсифицировать их рост.

Ранее было показано, что морские, галофильные и алкалофильные цианобактерии [5] претендуют на обладание натриевым сопрягающим циклом, тогда как пресноводные – нет. Однако, исходя из вышеизложенного, было бы логично предположить наличие аналогичных механизмов и у пресноводных цианобактерий.

Нитчатая цианобактерия *Phormidium uncinatum* (сем. Oscillatoriaceae) была использована в качестве модельного объекта пресноводной цианобактерии. Целью данной работы было изучить влияние катионного состава и pH среды инкубации на такой показатель энергизации клетки как скорость движения цианобактерии по поверхности субстрата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на альгологически чистой культуре цианобактерии *Phormidium uncinatum* ODESU-9. Культуру выращивали в условиях непрерывного освещения лампами дневного света (освещенность 1,5 – 2 кЛк) при температуре 26–28°C в плоскодонных колбах емкостью 100 мл³. Для выращивания культур использовали среду BG-11, состав которой в зависимости от целей опыта модифицировали, заменяя натрийсодержащие соли калиевыми или кальциевыми.

Для постановки экспериментов использовали среду следующего состава: 20 мМ буфера MOPS (pK 7.2) или CAPS (pK 10.4), хлорид катиона (KCl, NaCl, CaCl₂

соответственно для калиевых, натриевых и кальциевых сред) в разных концентрациях. Если количество NaCl или CaCl₂ было меньше 5 мМ, то молярность среды доводили с помощью KCl до 5 мМ. pH среды доводили до нужного значения с помощью KOH или HCl.

Среды готовили на деионизованной воде, полученной с помощью аппарата «Milli-Q» (Millipore, США). В ходе работы использовали хлориды, нитраты, буферы и ионофоры производства SIGMA, остальные реактивы категории не ниже «хч» – производства СНГ. pH и содержание катионов определяли с помощью ионметра «Corning pH/ion analyzer 350» (Corning, Великобритания), комбинированного pH-электрода E 5634 (Sigma), и ионселективных мини-электродов (Fluka).

Препараты для изучения движения трихомов готовили, как было описано ранее [5]. Измерение скорости движения проводили при 28°C с помощью микроскопа «Люмам – ИЗ», при увеличении X 600. Трихомы экспонировали в присутствии ионофоров не менее 40 мин. Скорость движения трихомов определяли с помощью окулярной линейки, измеряя расстояние, пройденное трихомом за 10 сек.

При анализе результатов учитывали среднее значение показателя и доверительный интервал (для выборки из двадцати трихомов).

При математической обработке данных использовали пакет анализа данных программы «Microsoft Excel 97» (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты опыта по измерению скорости движения трихомов в нейтральных и щелочных калиевой, кальциевой и натриевой средах представлены на рис. 1.

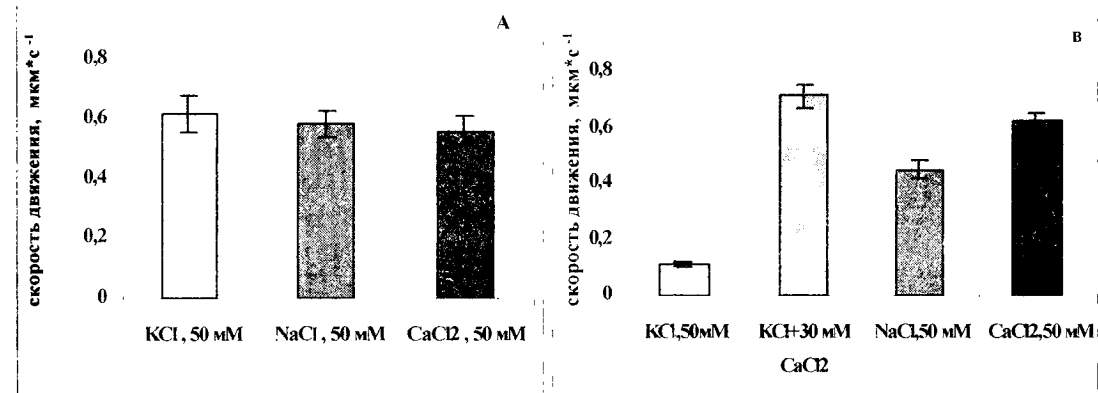


Рис. 1. Зависимость скорости движения трихомов *Ph. uncinatum* от ионного состава в нейтральной (А) и щелочной (В) средах. Состав среды: 20 мМ хлорида катиона и 20 мМ буфера (см. «Материалы и методы»)

Концентрация катионов – 20 мМ. Как свидетельствует рисунок 1А, в нейтральной среде скорость движения бактерий фактически не зависит от катионного состава среды. Но при pH 9.5 наблюдается четкая зависимость скорости движения трихомов от катионного состава среды (рис.1Б). С одной стороны, скорость движения трихомов в средах, содержащих кальций и натрий, существенно не отличается и не

уступает таковой в нейтральной среде, а с другой стороны, налицо потеря подвижности в щелочной калиевой среде. Добавка 30 мМ Ca^{2+} в калиевую среду восстановила подвижность бактерий.

Обработка трихомов протонифором ХКФ (3 – хлорфенилкарбонилцианид гидразон) и неэлектрогенными ионофорами моненсином (Na/H обменником) и кальцимицином A_{23187} (Ca/2H обменником) в щелочных средах выявила следующую закономерность (рис. 2). 4 мкМ ХКФ фактически полностью лишали подвижности бактерии в калиевой среде, тогда как в натриевой и кальциевой средах протонифор не был эффективен в этой концентрации. Применение 4 мкМ каждого из ионофоров в соответствующих средах (моненсина – в натриевой и кальцимицина – в кальциевой) по отдельности так же не привело к существенному изменению скорости движения бактерий. (Моненсин не был эффективен в кальциевой и кальцимицин – в натриевой среде, данные не приведены). Однако трихомы фактически полностью были обездвижены после совместного применения пары протонифор – ионофор в соответствующих средах (моненсин – ХКФ в натриевой и кальцимицин – ХКФ – в кальциевой среде). Необходимо отметить, что пара кальцимицин – ХКФ была неэффективна в натриевой среде.

Зависимость скорости движения бактерий от концентрации кальция в среде представлена на рис. 3. По мере возрастания $[\text{Ca}^{2+}]$ скорость движения бактерий в щелочной среде также возрастала вплоть до 1 мМ кальция в среде. Дальнейшее увеличение Ca^{2+} не изменило скорости движения. В нейтральной среде не было обнаружено зависимости скорости движения от концентрации кальция.

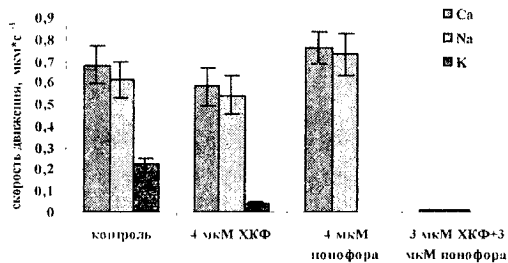


Рис. 2. Действие различных ионофоров на скорость движения трихомов *Ph. uncinatum* в щелочной среде (pH 9.5, состав среды: 10 мМ CAPS и 20 мМ хлорида катиона) Моненсин и кальцимицин использовали соответственно в натриевой и кальциевой средах.

Зависимость резистентности трихомов к действию 2 мкМ протонифора ХКФ от концентрации ионов кальция в щелочной среде представлена на рис. 4. Она возрастает по мере увеличения концентрации Ca^{2+} в среде, будучи минимальной в

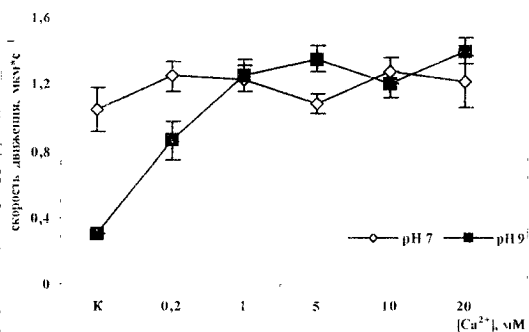


Рис. 3. Зависимость скорости движения трихомов *Ph. uncinatum* от $[\text{Ca}^{2+}]$ в среде при разном pH. (Состав среды – см. «Материалы и методы»)

калиевой среде. Добавка протонофора в таких условиях практически полностью обездвиживает бактерий. Наиболее четко эффект действия разобщителя проявляется при малых (меньше 1 мМ) концентрациях кальция.

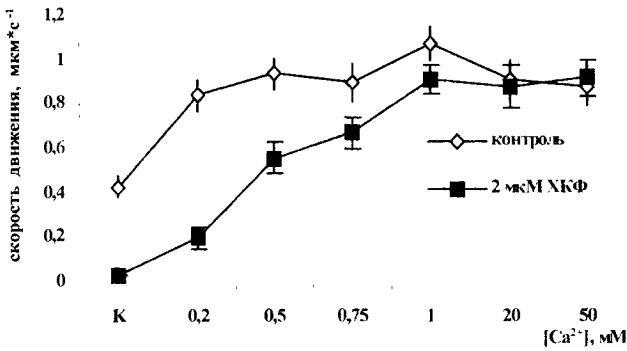


Рис. 4. Действие протонофора ХКФ на скорость движения трихомов *Ph. uncinatum* в зависимости от $[Ca^{2+}]$ в щелочной (pH 9.5) среде.

остановку движения как в калиевой, так и в кальциевой средах (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ

Не смотря на различия в строении флагеллярного аппарата эубактерий и секреторного аппарата трихомных цианобактерий [6], общая зависимость скорости движения прокариотических объектов пропорциональна степени энергизации клетки и определяется суммарной величиной $\Delta\mu_i$, где i – сопрягающий ион [5, 8]. Поэтому уменьшение величины $\Delta\mu_{H^+}$ на плазматической мембране клетки по мере возрастания внешнего pH вызовет уменьшение скорости движения бактерии и в дальнейшем – её остановку. Наличие в среде катионов, градиент которых клетка может использовать в качестве дополнительного источника энергии, позволяет клетке сохранить подвижность при высоком pH.

Если исходить из вышеизложенных представлений, то в нейтральной среде вклад $\Delta\mu_{H^+}$ в энергизацию клетки достаточен для обеспечения движения трихома, и скорость движения цианобактерий не будет зависеть от катионного состава среды (рис. 1, А). При повышении pH среды величина $\Delta\mu_{H^+}$ уменьшается и при величине pH 9.5 она недостаточна для энергизации клеток. Поэтому трихомы в калиевой среде (рис. 1, В) имеют незначительную скорость движения, которая постепенно уменьшается до нуля [7, с. 370 – 374]. Но в присутствии ионов Na^+ трихомы сохраняли подвижность, что свидетельствует в пользу предположения о возможном вкладе ионов натрия в энергизацию клетки. Аналогичным образом объясняется роль катионов Ca^{2+} . Рассеивание градиента ионов Na^+ [8] и аналогично -- Ca^{2+} [9] в условиях низкого $\Delta\mu_{H^+}$ должно вызвать остановку бактерий. Именно это и произошло после применения пары протонофор – обменник, когда пара ХКФ –

Скорость движения трихомов, экспонируемых в 200 – 500 мкМ Ca^{2+} , уменьшилась в два – три раза после добавки протонофора. 750 мкМ кальция в среде уже достаточно, чтобы значительно повысить резистентность трихомов. Начиная с 1 мМ кальция в среде, протонофор не был эффективен в данной концентрации.

В нейтральной среде протонофор в этой концентрации вызывал полную

моненсин и ХКФ – кальцимицин в соответствующих средах остановила трихомы, что свидетельствует о значительной деэнергизации клеток (рис. 2), тогда как для остановки бактерий в щелочной калиевой среде было достаточно протонофора.

Энергизация бактерий при pH 9.5 пропорциональна количеству Ca^{2+} в среде (рис. 3) на фоне низкого (80 – 100 мкМ в виде примесей) содержания Na^+ , что становится особенно заметным на фоне разобщающего действия ХКФ. Такой эффект можно объяснить следующим образом. При низких концентрациях Ca^{2+} в среде энергизация движения определяется преобладающим вкладом электрического потенциала ($\Delta\psi$). Поэтому движение менее резистентно к протонофору при малом (менее 1 мМ) содержании Ca^{2+} в среде. По мере возрастания концентрации Ca^{2+} в среде вклад концентрационной составляющей ($\Delta p\text{Ca}$) в энергизацию клеток увеличивается, поэтому действие протонофора становится менее эффективным. Отсутствие зависимости скорости движения от концентрации Ca^{2+} при нейтральном pH также свидетельствует в пользу этого предположения.

Полученные результаты могут быть интерпретированы в рамках представлений о вкладе градиентов ионов Na^+ или Ca^{2+} в энергизацию клеток пресноводных цианобактерий на фоне низкого значения протондвижущей силы. Градиент этих ионов клетки могут использовать для выполнения полезной работы различного рода – движения, транспорта метаболитов и т. п.

Авторы искренне благодарны И. И. Броуну за постоянное внимание и ценные замечания в период проведения опытов.

Список литературы

1. Dimroth P. Primary sodium ion translocating enzymes. Review // *Biochem. Biophys. Acta* – 1997. – 1318. – P. 11-57.
2. Efiok B., Webster D. A cytochrome that can pump sodium ion // *Bioph. and Bioch. Research comm.* – 1990 – 173, 1. – P. 370-375.
3. Аветисян А. В., Каулен. А. Д., Скулачев В. П., Фенюк Б. А. Фотофосфорилирование в клетках щелочелюбивой галобактерии, содержащей галородоксиин: хлорный пикл? // *Биохимия.* – 1998. – 63, 6. – С. 744-749.
4. Броун И. И. Кальций – третий сопрягающий ион? (Гипотеза) // *Биохимия.* – 1994. – 59. – С. 1321-1323.
5. Brown I. I., Fadeyev S. I., Gerasimenko L. M., Kirik I. I., Pushenko M. Ya, Severina I. I. Sodium ions are necessary for growth and energy transduction in the marine cyanobacterium *Oscillatoria brevis* // *Arch. Microbiol.* – 1990. – 153. – С. 409-411.
6. Hoiczuk E., Baumeister W. The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria // *Curr. Biol.* – 1998. – 8. – P. 1161-1168.
7. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран // М.: Наука, 1989 – 256 с.
8. Dibrov P. A., Kostyrko V. A., Lazarova R. L., Skulachev V. P., Smirnova I. A. The sodium cycle. Na^+ -dependent motility and modes of membrane energisation in the marine alkalotolerant *Vibrio alginolyticus* // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1986. – 850. – P. 449-457.
9. Brown I. I., Chaban Yu., Ishmukhametov R., Lovenchuk I., Karakis S., Pogorelov D. «The peculiarities of bioenergetics coupling in cyanobacteria under low $\Delta\mu\text{H}^+$ and μNa^+ » in «Marine cyanobacteria», Charpy L & Larkum AWD (eds.). *Bulletin de l'Institut Oceanographique, Monaco, special issue.* – 1999. – P. 229 – 235.