

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ  
им. А.КИРХЕНШТЕЙНА АН Латв.ССР

На правах рукописи

КАЛЕНИЕКС Улдис Зандерович

УДК 576.8.095.23

ИЗУЧЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ЗАТРАТ  
ПОДДЕРЖАНИЯ ИОННЫХ ГРАДИЕНТОВ  
У БАКТЕРИЙ

03.00.04 биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
доктор биологических наук,  
вед. научный сотрудник  
Ю.Э.Швинка  
доктор технических наук,  
академик  
У.Э.Виестурс

Рига - 1988

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ .....	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
Глава 1. БАЛАНС МАССЫ И ЭНЕРГИИ В ПРОЦЕССЕ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ: НЕПРОДУКТИВНЫЕ ЭНЕРГО- ЗАТРАТЫ .....	12
1.1. Определение понятий выхода и непродук- тивных энергозатрат .....	12
1.2. Термодинамические ограничения величины $\gamma$ .....	13
1.3. Практическое определение величины не- продуктивных энергозатрат в метаболизме бактерий .....	14
1.4. Основные пути непродуктивного расхо- дания энергии у бактерий .....	17
1.5. Потребление энергии на поддержание про- тондвижущей силы и других трансмембран- ных ионных градиентов .....	19
Глава 2. ПРОТОНДВИЖУЩАЯ СИЛА И ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ГРАДИЕНТЫ КАТИОНОВ У БАКТЕРИЙ .....	22
2.1. Протондвижущая сила и ее энергетическая роль у аэробных и анаэробных бактерий	22
2.2. Регуляция величин внутриклеточного рН и $\Delta\psi$ .....	23
2.3. Методы измерения $\Delta\psi$ и $\Delta\text{pH}$ .....	27
2.4. Проблема "локальных" потоков $\text{H}^+$ в энер- госопряжении .....	30

	3.
2.5. Трансмембранные градиенты других катионов	32
Глава 3. ПАССИВНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ДЛЯ КАТИОНОВ	34
3.1. Модельные мембраны .....	34
3.2. Мембраны бактерий .....	36
Глава 4. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ БАКТЕРИЙ .....	37
4.1. Данные о величине $H^+/O$ стехиометрии ....	37
4.2. Методики измерения $H^+/O$ стехиометрии ...	38
Резюме обзора литературы .....	41
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
Глава 5. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	42
5.1. Характеристика объектов исследования ...	42
5.2. Культивирование бактерий .....	44
5.2.1. Состав питательных сред .....	44
5.2.2. Поддержание культур и выращивание бакте- рий в периодическом режиме .....	44
5.2.3. Культивирование бактерий в хемостатном режиме .....	45
5.2.4. Определение концентрации биомассы и субстрата в культуральной среде .....	46
5.3. Изучение скорости дыхания и трансмембран- ных потоков $H^+$ у отмытых клеток, инкуби- руемых в термостате .....	47
5.3.1. Контроль $pO_2$ и скорости дыхания .....	47
5.3.2. Определение коэффициента пассивной $H^+$ - проницаемости плазматической мембраны	48
5.3.3. Определение $H^+/O$ стехиометрии .....	49
5.4. Измерение протондвижущей силы .....	50

5.4.1. Измерение трансмембранного электрического потенциала .....	50
5.4.2. Измерение внутриклеточного pH распределительным методом .....	52
5.4.3. Счет радиоактивности .....	53
5.4.4. Измерение внутриклеточного pH методом $^{31}\text{P}$ -ЯМР .....	53
5.5. $^{23}\text{Na}$ -ЯМР спектроскопия .....	54
5.5.1. Измерение трансмембранного градиента $\text{Na}^+$ .....	54
5.5.2. Определение $\text{Na}^+$ -проницаемости мембраны .....	54
5.6. Определение АТФ .....	55
5.7. Математическая обработка результатов ...	56
Глава 6. ПРОТОНДВИЖУЩАЯ СИЛА У <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> .....	57
6.1. Зависимость $\Delta \text{pH}$ от pH среды культивирования .....	57
6.2. Зависимость $\Delta \psi$ от pH среды .....	61
6.3. Данные $^{31}\text{P}$ -ЯМР о внутриклеточном pH ...	61
6.4. Зависимость $\Delta \text{pH}$ и $\Delta \psi$ от концентрации биомассы и от наличия в среде инкубирования ионов $\text{Na}^+$ и $\text{K}^+$ .....	63
Глава 7. ПАССИВНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> ДЛЯ ПРОТОНОВ .....	66
7.1. Зависимость коэффициента пассивной $\text{H}^+$ проницаемости мембраны от pH среды ....	66
7.2. Влияние возрастания коэффициента пассивной $\text{H}^+$ проницаемости мембраны на $\Delta p$ , внутриклеточную концентрацию АТФ и скорость ды-	

хания .....	68
Глава 8. $\Delta p_{Na^+}$ И ПАССИВНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> ДЛЯ $Na^+$ .....	72
8.1. Трансмембранный концентрационный градиент $Na^+$ .....	72
8.2. Диссипация $\Delta p_{Na^+}$ , вызванная деполяризацией мембраны: электрогенный $H^+/Na^+$ антипорт .....	73
8.3. Влияние $Na^+$ на значение коэффициента пассивной $H^+$ проницаемости мембраны ...	77
8.4. Оценка пассивной проницаемости мембраны для $Na^+$ .....	78
Глава 9. СТЕХИОМЕТРИЯ $H^+/O$ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> .....	81
9.1. Метод определения стехиометрии $H^+/O$ по импульсному возмущению стационарного состояния хемостатной культуры добавлением кислоты .....	82
9.1.1. Влияние добавок кислоты и щелочи на дыхание культуры .....	82
9.1.2. Модель кинетики изменения рН среды после импульса кислоты .....	84
9.1.3. Результаты расчетов значений $H^+/O$ ...	87
9.2. Величина $H^+/O$ , определенная по методике Митчелла .....	89
9.3. Оценка значений $H^+/O$ по увеличению энергии на поддержание $\Delta p$ вследствие возрастания $C_{H^+}$ под воздействием разоб-	

чителей .....	90
Глава IО. ОЦЕНКА ЭНЕРГОЗАТРАТ НА ПОДДЕРЖАНИЕ ИОННЫХ ГРАДИЕНТОВ У <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> И <i>ZYMONONAS MOBILIS</i> .....	94
IО.1. Энергозатраты на поддержание ионных градиентов у <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> .....	94
IО.1.1. $\Delta p$ .....	94
IО.1.2. $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$ .....	96
IО.2. $\Delta p$ и энергозатраты на ее поддержа- ние у <i>ZYMONONAS MOBILIS</i> .....	98
IО.2.1. $\Delta pH$ и $\Delta \psi$ у <i>ZYMONONAS MOBILIS</i> ...	99
IО.2.2. Оценка энергозатрат на поддержание пу- тем ингибирования $H^+$ -АТФазы .....	101
Глава II. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	103
ВЫВОДЫ .....	128
ЛИТЕРАТУРА .....	131

## СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

- ДЦК - пицклогексилкарбодимид  
 ПХФ - пентахлорфенол  
 ХКФ - хлоркарбонилцианифенилгидразон  
 ТФФ<sup>+</sup> - тетрафенилфосфоний  
 ТФМФ<sup>+</sup> - трифенилметилфосфоний  
 ЭЦ - электронно-транспортная цепь  
 БВК - белково-витаминный концентрат  
 $Q_{O_2}$  - скорость потребления кислорода, ммоль.л<sup>-1</sup>.ч<sup>-1</sup>  
 $J_{O_2}$  - скорость потребления кислорода, моль.г<sup>-1</sup>.с<sup>-1</sup>  
 $q_s$  - скорость потребления субстрата, г.г<sup>-1</sup>.ч<sup>-1</sup>  
 $q$  - скорость потока воздуха через ферментатор, л.ч<sup>-1</sup>  
 $D$  - скорость разбавления, ч<sup>-1</sup>  
 $\mu$  - удельная скорость роста, ч<sup>-1</sup>  
 $Y_{x/s}$  - выход биомассы по субстрату, г.г<sup>-1</sup>  
 $Y_{x/O}$  - выход биомассы по кислороду, г.моль<sup>-1</sup>  
 $Y_{x/ATP}$  - выход биомассы по АТФ, г.моль<sup>-1</sup>  
 $\Delta p$  - протондвижущая сила, мВ  
 $\Delta \Psi$  - трансмембранный электрический потенциал, мВ  
 $\Delta pH$  - трансмембранный градиент рН, мВ  
 $\Delta pNa^+$  - трансмембранный градиент Na<sup>+</sup>, мВ  
 $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}/F$  - трансмембранный электрохимический потенциал Na<sup>+</sup>, мВ  
 $C_{H^+}$  - коэффициент пассивной проницаемости мембраны для протонов,  $\mu\text{моль } H^+ \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \Delta p_{H^+}$  (единицы)  
 $C_{Na^+}$  - коэффициент пассивной проницаемости мембраны для Na<sup>+</sup>,  $\mu\text{моль } Na^+ \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \Delta p_{Na^+}$  (единицы)  
 $N$  - стехиометрическое отношение H<sup>+</sup>/O дыхательной цепи  
 $L_{Na^+}$  - коэффициент Na<sup>+</sup>-проводимости H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> антипортера,

- $\mu\text{моль Na}^+ \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \Delta \text{pNa}^+^{-1}$  (единицы)
- $L$  - коэффициент общей  $\text{H}^+$ -проводимости мембраны,  $\mu\text{моль H}^+ \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \Delta \text{pH}^{-1}$  (единицы)
- $V_{\text{H}^+ \text{внутр}}$  - буферная емкость для  $\text{H}^+$  внутриклеточной фазы,  $\mu\text{моль H}^+ \cdot \Delta \text{pH}^{-1}$  (единицы)
- $V_{\text{H}^+ \text{среда}}$  - буферная емкость для  $\text{H}^+$  среды,  $\mu\text{моль H}^+ \cdot \Delta \text{pH}^{-1}$  (ед.)
- $V_{\text{Na}^+ \text{внутр}}$  - буферная емкость для  $\text{Na}^+$  внутриклеточной фазы,  $\mu\text{моль Na}^+ \cdot \Delta \text{pNa}^+^{-1}$  (единицы)
- $V_{\text{Na}^+ \text{среда}}$  - буферная емкость для  $\text{Na}^+$  среды,  $\mu\text{моль Na}^+ \cdot \Delta \text{pNa}^+^{-1}$  (ед.)
- $V$  - рабочий объем ферментатора
- $V_{\text{H}}$  -  $V_{\text{H}^+ \text{среда}} \cdot V_{\text{H}^+ \text{внутр}} / (V_{\text{H}^+ \text{среда}} + V_{\text{H}^+ \text{внутр}})$
- $V_{\text{X}}$  - то же, что  $V_{\text{H}}$ , но относительно противоиона(ов) X, электрически компенсирующего трансмембранные движения  $\text{H}^+$
- $J_{\text{H}^+}$  - трансмембранный поток  $\text{H}^+$ ,  $\mu\text{моль H}^+ \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$
- $\eta$  - энергетический выход роста, %
- $\beta$  - непродуктивные энергозатраты, %
- $\beta'$  - часть непродуктивных энергозатрат, обусловленная неполной сопряженностью метаболизма, %



## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Для повышения эффективности биотехнологического производства важно добиваться приближения значения выхода продукта к максимальной теоретически достижимой величине. Одним из путей решения этой задачи является минимизация непродуктивных энергозатрат в метаболизме продуцентов, в том числе затрат на поддержание трансмембранных ионных градиентов.

Роль трансмембранных градиентов  $H^+$ ,  $K^+$  и  $Na^+$  в энергетике бактерий общеизвестна. За последние годы в биохимии достигнуты значительные успехи как в расшифровке механизмов энергосопряжения, так и в выяснении путей регуляции внутриклеточного ионного гомеостаза с участием этих ионов. Гораздо менее исследованной областью остается количественный аспект затрат на поддержание ионных градиентов. Вместе с тем, величина энергозатрат на поддержание градиентов энергосопрягающих ионов представляет значительный теоретический интерес, так как исследования в этом направлении ведут к слиянию идей хемиосмотической теории с феноменологическим подходом метода материально-энергетического баланса. С поддержанием упомянутых градиентов также непосредственно связана регуляция внутриклеточного pH, представляющая собой одну из центральных проблем современной физиологии бактерий.

С практической точки зрения знание зависимостей энергии на поддержание ионных градиентов от условий культивирования и физиологического состояния бактерий необходимо для более целенаправленной оптимизации условий роста продуцента с целью минимизации непродуктивных энергозатрат.

В этой связи целью данной работы являлось количественное определение затрат энергии, расходуемых на поддержание ионных градиентов у бактерий. Внимание сосредотачивалось на изучение градиентов основных энергосопрягающих ионов  $H^+$  и  $Na^+$  с возможно

полным учетом физиологических факторов и выбирая в качестве объектов широко используемые в биотехнологии продуценты – представители бактерий родов *Brevibacterium* и *Zygomonas*.

Достижение поставленной цели требовало решения следующих задач:

- изучение величин трансмембранных электрохимических градиентов  $\Delta p$  и  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$  в зависимости от физиологического состояния и условий культивирования бактерий;
- измерение пассивной проницаемости мембраны для  $H^+$  и  $Na^+$ ;
- определение эффективности генерирования энергии в физиологических условиях;
- разработка подходов и методов количественной оценки затрат энергии на поддержание градиентов  $H^+$  и  $Na^+$ .

#### Научная новизна работы

1. Впервые у бактерий на примере *B. flavum* показано возрастание пассивной  $H^+$ -проницаемости мембраны при низких значениях pH среды.

2. Охарактеризована протондвижущая сила и ее составляющие у *B. flavum*. Обнаружено, что у *B. flavum* свойствен нетипично широкий (для аэробных бактерий) интервал изменений внутриклеточного pH в зависимости от значений pH среды.

3. Впервые на примере *B. flavum* показана зависимость величин  $\Delta pH$  и  $\Delta \Psi$  от концентрации биомассы и от буферной емкости среды инкубирования бактерий.

4. У *B. flavum* обнаружен трансмембранный градиент  $Na^+$  и исследован механизм его генерирования. Впервые оценена величина пассивной проницаемости бактериальной мембраны для ионов  $Na^+$ .

5. Разработан оригинальный метод оценки стехиометрии  $H^+/O$

в дыхательной цепи у культуры аэробных бактерий непосредственно в физиологических условиях культивирования.

6. Впервые охарактеризована протондвижущая сила у *Zygomonas mobilis* в зависимости от pH среды.

7. Предложены методические подходы для оценки энергозатрат на поддержание трансмембранных ионных градиентов.

Оценена величина энергозатрат на поддержание  $\Delta p$  и  $\Delta \tilde{\mu}_{\text{NO}_2^-}$  у *Brevibacterium flavum*. Определена величина энергозатрат на поддержание зависимой от АТФазы компоненты  $\Delta p$  у *Z. mobilis*.

### Практическое значение работы

1. В работе представлена методика количественной оценки непродуктивных затрат энергии на поддержание ионных градиентов в метаболизме бактерий. Полученные результаты относительно *B. flavum* дают возможность минимизировать непродуктивные энергозатраты на поддержание  $\Delta p$ . Обнаруженные закономерности зависимости пассивной  $\text{H}^+$ -проницаемости и компонент  $\Delta p$  от условий среды позволяют находить такой режим культивирования *B. flavum*, при котором трансмембранный пассивный поток  $\text{H}^+$  имеет минимальное значение.

2. Разработанный метод определения коэффициента  $\text{H}^+/\text{O}$  по кислотным импульсам дает возможность контролировать эффективность энергетического метаболизма у аэробных гетеротрофов в процессе их культивирования непосредственно в ферментаторе.

3. На примере бактерий *Zygomonas mobilis* показано, что непродуктивные затраты на генерирование  $\Delta p$  частично могут быть использованы продуктивно: ингибирование АТФазного генератора  $\Delta p$  приводит к более эффективному образованию биомассы.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава I. БАЛАНС МАССЫ И ЭНЕРГИИ В ПРОЦЕССЕ  
РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ: НЕПРОДУКТИВНЫЕ  
ЭНЕРГОЗАТРАТЫ

I.I. Определение понятий выхода и  
непродуктивных энергозатрат

Процесс роста микроорганизмов можно рассматривать как сложную химическую реакцию, которая подчиняется законам неравновесной термодинамики [214, 255]. Стехиометрию этой реакции отражают экономические коэффициенты - выход биомассы или продукта на единицу потребленного источника углерода, энергии, азота и т.д. [13, 17, 18, 32]. Выход обычно обозначают буквой  $Y$  с соответствующим индексом. Например, выход биомассы на единицу потребленного источника углерода выражается как отношение прироста биомассы к соответствующему количеству потребленного субстрата:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (I.1)$$

или (в стационарных процессах)

$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_s} \quad (I.2)$$

где  $\mu$  - удельная скорость роста микроорганизмов,

а  $q_s$  - удельная скорость потребления субстрата.

Экспериментально измеряемое значение  $Y$  эксп. в некотором диапазоне может изменяться в зависимости от величины непродуктивных энергозатрат в метаболизме бактерий.

Непродуктивными называются такие затраты субстрата и

содержащейся в нем энергии, которые не проявляются в приросте клеточной массы и/или синтезе целевого продукта /92,227/. Если непродуктивные затраты равны нулю, то  $Y$  достигает некоторого максимального значения, соответствующего ситуации, когда вся энергия, содержащаяся в субстрате переходит в биомассу и/или продукт.

## 1.2. Термодинамические ограничения величины $Y$

Максимальная теоретически представляемая величина  $Y$  обозначается как теоретический выход  $Y_{\text{теор.}}$  и описывает идеальный случай, при котором вся химическая энергия, содержащаяся в субстрате, переходит в биомассу (продукт). Очевидно, что значения  $Y$  выше  $Y_{\text{теор.}}$  "запрещены" первым законом термодинамики. Теоретический выход можно рассчитать на основе баланса массы и энергии микробиологического процесса /14,90, 91,205/. Для расчета баланса энергии широко используется метод, основанный на разработанной В.К.Ерошиным и И.Г.Минкевичем теории редоксонов /14,25,26,92,177/, где энергосодержание органических веществ выражается в эквивалентах доступных электронов.

Для характеристики эффективности некоторого процесса можно ввести величину отношения  $Y_{\text{жсл.}}/Y_{\text{теор.}}$ , которая называется энергетическим выходом процесса роста (или биосинтеза) и обозначается буквой  $\eta$  /17,92,214/:

$$\eta = \frac{Y_{\text{экл.}}}{Y_{\text{теор.}}} \quad (1.3)$$

С помощью  $\eta$  легко выразить непродуктивные энергозатраты (обозначаемые буквой  $\beta$ ):

$$\beta = 1 - \eta = 1 - \frac{\gamma_{\text{экср.}}}{\gamma_{\text{теор.}}} \quad (\text{I.4})$$

Следует отметить, что на величину реального выхода  $\gamma_{\text{экср.}}$  ограничения накладывает также 2 закон термодинамики. В необратимых процессах (каким является микробный рост) превращение энергии не происходит со 100 % эффективностью: часть свободной энергии субстрата "приносится в жертву" для обеспечения нужной скорости протекания всего процесса /24,255/. Известно, что 100 % эффективность соответствует равносному, бесконечно медленному процессу /24/. В работах по применению линейной необратимой термодинамики к энергетике митохондрий и бактерий /238,254/ показано, что оптимальная эффективность метаболизма для обеспечения максимальной скорости роста (бактерий) или образования АТФ (митохондрии) значительно ниже 100 %. Следовательно, значение  $\gamma_{\text{теор}}$  в принципе не достижимо и может рассматриваться как идеализация, удобная для технологических расчетов /43,214/.

### 1.3. Практическое определение величины непродуктивных энергозатрат в метаболизме бактерий

При превращении энергии субстрата в энергию биомассы часть потерь обусловлены неэффективным функционированием метаболической системы бактерий, а часть - самой природой биохимических механизмов, осуществляющих превращения энергии.

Пределному случаю, когда метаболическая система функционирует с максимально возможной эффективностью и первая часть потерей равна нулю, соответствует выход  $Y^{\text{макс}}$ . Такое состояние обозначается как полностью сопряженный метаболизм [16, 31], при котором в катаболизме энергия образуется с максимальной эффективностью и строго в соответствии потребностям анаболизма. Отношение  $Y^{\text{экс.}}/Y^{\text{макс}}$  может служить мерой сопряженности метаболизма [16]. Соответственно, величина  $1 - Y^{\text{экс.}}/Y^{\text{макс}}$  выражает ту часть непродуктивных энергозатрат, которая есть следствие несопряженности метаболизма и которая может меняться при изменении физиологического состояния и условий роста культуры. Обозначим эти энергозатраты буквой  $\beta'$ :

$$\beta' = 1 - \frac{Y^{\text{экс.}}}{Y^{\text{макс}}} \quad (1.5)$$

Величина  $\beta'$  имеет более четкий биологический смысл, так как по сравнению с  $\beta$  из рассмотрения исключается биологически недоступная часть свободной энергии субстрата (например, та доля свободной энергии глюкозы, которая не переходит в энергию АТФ, образуемого в процессе катаболизма в условиях максимальной сопряженности энергетики).

Значение  $Y^{\text{макс}}$  количественно определяется по стехиометрии всех биохимических реакций катаболизма и анаболизма. Когда это сделать трудно или невозможно, применяются некоторые приближенные методы [23, 169, 214].

Так как нас интересуют энергозатраты на поддержание ионных градиентов, то, очевидно, правильнее пользоваться не  $Y_{x/s}$ , т.е. выходом биомассы на единицу суммарного потребленного субстрата, а неким показателем, характеризующим выход биомассы на единицу субстрата, потребленного исключительно для генерирования энергии. Таким показателем в аэробном процессе может

служить выход биомассы на единицу потребленного кислорода -

$Y_{X/O}$ , который для наших целей имеет несколько преимуществ перед  $Y_{X/S}$  /25,169/:

1) более непосредственное отражение эффективности энергетического метаболизма;

2) возможность более точно измерить и непосредственно контролировать значение  $Y_{X/O}^{эксп.}$  в процессе хемостатного культивирования бактерий /67/;

3) возможность связать полученные данные с балансовым уравнением роста культуры в культуральной среде любого состава /25,77/.

Необходимо отметить, что значения  $Y_{X/S}^{эксп.}$  и  $Y_{X/O}^{эксп.}$ , а также их зависимость от ряда условий могут различаться. Например, у хемостатной культуры *Brevibacterium flavum* отношение  $Y_{X/S}^{эксп.}/Y_{X/S}^{макс.}$  при низких скоростях потока существенно ниже  $Y_{X/O}^{эксп.}/Y_{X/O}^{макс.}$  /53/, что можно объяснить усиленным образованием продуктов метаболизма, влияющим на значение  $Y_{X/S}^{эксп.}$ . В случае *B. flavum* оказывается, что непродуктивные энергозатраты  $\beta$ , полученные с помощью разработанного в нашей лаборатории импульсного метода /3,53/ по величине хорошо совпадают с  $\beta'$  /53/, рассчитанным по формуле:

$$\beta' = 1 - \frac{Y_{X/O}^{эксп.}}{Y_{X/O}^{макс.}} \quad (I.6)$$

Это обстоятельство повышает достоверность оценки непродуктивных энергозатрат на основании баланса кислорода и указывает на близость значения  $Y_{X/O}^{макс.}$  к  $Y_{X/O}^{теор.}$ .

Для анаэробных бактерий  $\beta'$  удобно рассчитать на основании данных о величине выхода биомассы на единицу АТФ. На уровне субстратного фосфорилирования более строго соблюдается стехио-



метрическое отношение выхода АТФ на единицу катаболизируемого субстрата и, следовательно,  $\frac{Y_{\text{эксп.}}}{X/\text{АТФ}}$  у анаэробов легче определить, чем у аэробных бактерий с их непостоянной эффективностью окислительного фосфорилирования /47, 109, 169/. Наибольшую неопределенность при этом вносит несовершенство методов измерения  $\frac{Y_{\text{Х/АТФ}}^{\text{макс.}}}{X/\text{АТФ}}$  /16, 17, 234, 235/. То же относится и к определению  $\frac{Y_{\text{Х/О}}^{\text{макс.}}}{X/\text{О}}$  /187, 193, 194/.

Полученные значения  $\beta'$  отражают целый набор различных путей непродуктивного расходования энергии в метаболизме. К краткой их характеристике и классификации нам необходимо остановиться подробнее.

#### 1.4. Основные пути непродуктивного расходования энергии у бактерий

Непродуктивные затраты субстрата и энергии в метаболизме петеротрофных микроорганизмов можно разделить на три группы /40/, и каждую группу по некоторой аналогии связать с определенной стратегией жизнедеятельности бактерий. Первая группа – затраты энергии, связанные с быстрым ростом – становится доминирующей при осуществлении микроорганизмами  $\gamma$ -тактики /240/ и включают затраты на компенсацию ошибок в трансляции и транскрипции, а также затраты, связанные с дисбалансом метаболизма. Вторую группу составляют затраты, доминирующие у  $\kappa$ -тактиков – поддержание активного катаболизма при разобщенном росте /254/. С экологической точки зрения это связано с поддержанием стабильной численности популяции в заполненной экологической среде, благодаря высокой конкурентноспособности. К данной группе затрат относятся диссипация энергии в футильных циклах, сниже-

ние эффективности генерирования энергии, а также выброс непольностью окисленных метаболитов ("overflow"). Наконец, третья группа непродуктивных затрат связана с поддержанием клеточной целостности и соответствует характерной для  $L$ -тактиков стратегии выживания /10/. Наряду с затратами на ресинтез макромолекул, на реакции репарации и реактивации и на подвижность, сюда входят также затраты энергии на поддержание трансмембранных ионных градиентов. Затраты на поддержание клеточной целостности наиболее хорошо соответствуют первоначальному классическому определению независимых от скорости роста "затрат на поддержание метаболизма" /80,209/. Необходимо, однако, отметить, что классическое понятие не имеет достаточно четкой интерпретации и, вероятно, "затраты на поддержание метаболизма" включают в себя часть из остальных вышеупомянутых путей непродуктивных энергозатрат. Нет также удовлетворительной методики измерения "затрат на поддержание". Во многих случаях их невозможно описывать постоянным коэффициентом поддержания и приходится постулировать зависимую от скорости роста компоненту затрат с неясным физиологическим смыслом /193,194/. Поэтому в настоящей работе мы не пользовались коэффициентом поддержания для количественной характеристики энергозатрат.

### 1.5. Потребление энергии на поддержание протондвижущей силы и других трансмембранных ионных градиентов

Затраты на поддержание трансмембранных ионных градиентов составляют часть от непродуктивных энергозатрат, расходуемых на поддержание клеточной целостности. О том, насколько велика эта часть, надежных данных в литературе найти не удалось. Это связано с тем, что не существуют прямых методов измерения данной компоненты непродуктивных затрат и все оценки делаются на основании некоторых косвенных данных или априорных допущений.

Большой интерес исследователей привлекает величина затрат энергии на поддержание протондвижущей силы бактерий. Вместе с тем, определить эту величину весьма сложно, учитывая центральную роль протондвижущей силы в энергетике / 35 , 107, 178 /. Сложность состоит в вычленении компоненты непродуктивных энергозатрат среди общих затрат энергии на поддержание стационарного уровня протондвижущей силы. Очевидно, что большая часть энергии, расходуемой на поддержание стационарной протондвижущей силы, в итоге потребляется для синтеза АТФ в процессе транспорта субстрата и не может причисляться к непродуктивным затратам. К непродуктивным энергозатратам относятся только 2 вида затрат: компенсирование пассивного потока протонов по градиенту протондвижущей силы и расход энергии на подвижность бактерий (зависящую от протондвижущей силы). В дальнейшем под термином "энергозатраты на поддержание протондвижущей силы" мы будем подразумевать исключительно непродуктивную компоненту.

Известно, что неоптимальные значения рН среды и концентраций  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  приводит к значительному снижению  $Y_{x/s}^{\text{эксн.}}$  и  $Y_{x/o}^{\text{эксн.}}$  /110,192,253/, что, очевидно, свидетельствует о возросших энергозатратах на поддержание соответствующих градиентов. Однако, количественных данных об энергии на поддержание каждого из этих ионных градиентов в зависимости от условий культивирования бактерий, к тому же выраженных в процентах от общего потребления энергии (или же от общих непродуктивных энергозатрат) практически не имеется. Можно отметить работу Стутхомера и Бетенхауссена /236/, где оценивается доля энергии, затрачиваемая *E. coli* на поддержание протондвижущей силы в анаэробных условиях. Полученное значение, более 50 % от общего потребления энергии, вероятно, превышает истинную величину энергии поддержания протондвижущей силы, так как кроме непродуктивных затрат включает в себя компоненту активного транспорта.

Своеобразный нижний порог энергии на поддержание градиентов ряда катионов и анионов приведен в теоретическом расчете в работе Иванова /15/. На основе баланса макроэргических соединений рассчитаны энергозатраты на аккумуляцию минеральных компонентов среды в биомассе без учета возможности их многократной циркуляции через мембрану вследствие пассивной диффузии по градиенту. Оказывается, что суммарный расход энергии на транспорт ряда катионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) и анионов (сульфатов, фосфатов) в таком приближении не превышает 1 % от общих энергозатрат на синтез биомассы.

Имеются также сообщения об усилении дыхания и возрастании коэффициента поддержания у разных бактерий в средах с низким содержанием  $\text{K}^+$  /114,237/ или высоким содержанием  $\text{Na}^+$  /194,251/.

В работе /186/ обнаружен интересный фотильный цикл у *E. coli*, который обусловлен одновременным функционированием 2 транспортных систем  $K^+$  – с низкой и высокой специфичностью.

Приведенные выше данные, однако, носят во многом феноменологический характер и не могут дать информации о величине той доли энергии, которая затрачивается на компенсацию пассивных потоков ионов. Естественно, что в рамках одного макроскопического подхода в принципе нельзя выяснить величину энергозатрат в каждом конкретном пути непродуктивного энергопотребления. Для этой цели необходимо привлечь также некоторые микропараметры, характеризующие рассматриваемый путь (механизм). В частности, в нашем случае это: величины трансмембранных электрохимических градиентов, пассивных проницаемостей соответствующих ионов, а также параметр, характеризующий эффективность работы энергетики на этапе генерирования протондвижущей силы – например, стехиометрическое отношение  $H^+/O$  дыхательной цепи. Упомянутые параметры позволяют нам рассчитать величины пассивных потоков отдельных ионов и выразить их в единицах метаболической энергии – т.е. фактически находить непродуктивные энергозатраты на поддержание соответствующих ионных градиентов.

В последующих 3 главах мы кратко рассмотрим имеющиеся литературные данные о значениях этих параметров у бактерий, а также коснемся некоторых вопросов методики их измерения.

## Глава 2. ПРОТОНДВИЖУЩАЯ СИЛА И ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ГРАДИЕНТЫ КАТИОНОВ У БАКТЕРИЙ

### 2.1. Протондвижущая сила и ее энергетическая роль у аэробных и анаэробных бактерий

Согласно хемиосмотической теории, предложенной Митчеллом / 178 , 179 /, трансмембранный электрохимический градиент протонов или "протондвижущая сила" на энергосопрягающих мембранах занимает центральную роль в окислительном фосфорилировании. Протондвижущую силу образует электрическая и концентрационная составляющие:

$$\Delta p = \Delta \psi - \frac{RT}{F} \cdot \Delta pH \quad (2.1)$$

где  $\Delta p$  - протондвижущая сила (в милливольтках),  $\Delta \psi$  - трансмембранный электрический потенциал,  $\Delta pH$  - трансмембранная разность pH, а  $R$ ,  $T$  и  $F$  - имеет свои обычные значения. Показано, что у митохондрий и аэробных бактерий активность дыхательной цепи сопровождается транспортом  $H^+$  из внутреннего пространства в среду с образованием  $\Delta p$  / 35 , 64 , 107 /. АТФ синтезируется обратимой  $H^+$ -зависимой АТФазой за счет энергии образованного таким путем  $\Delta p$  / 94 , 159 , 183 /, при этом  $\Delta \psi$  и  $\Delta pH$  энергетически полностью эквивалентны / 162 /. Показано также, что, в подтверждении хемиосмотической теории, сопрягающие мембраны являются относительно хорошими изоляторами с низкой (хотя и измеримой)  $H^+$ -проводимостью / 35 , 158, 182 /.

У аэробных бактерий энергия  $\Delta p$  используется для синтеза АТФ / 157 , 206 /, для трансмембранного транспорта

ионов, молекул и макромолекул / II, 62, 66 / и для движения жгутиков / I63, I64, I81 /. Поддержание  $\Delta \text{pH}$  необходимо также для обеспечения постоянства внутриклеточного pH / 203, 204 /. У анаэробных бактерий и у факультативных аэробов в анаэробных условиях  $\text{H}^+$ -АТФаза работает в обратном направлении и поддерживает  $\Delta \rho$  (несколько меньшую по абсолютной величине, чем в аэробных условиях) за счет энергии субстратного фосфорилирования / I08, I34 /. В условиях, когда pH среды близок к оптимальному значению  $\text{pH}_{\text{внутр.}}$ , а для накопления субстратов не требуется энергии  $\Delta \rho$  (богатая ростовая среда), как *E. coli*, так и *S. lactis* способны расти за счет энергии субстратного фосфорилирования без поддержания протондвижущей силы / I08, I32 /. Этим подтверждается, что у  $\Delta \rho$ , кроме вышеуказанных, нет других функций в жизнедеятельности бактерий / 203 /.

## 2.2. Регуляция величин внутриклеточного pH и $\Delta \psi$

У разных групп бактерий компонентный состав сильно различается. Так, у нейтрофильных аэробных бактерий, например, *E. coli*, *S. aureus*, *M. lysodeikticus* и др., в основном преобладает  $\Delta \psi$  / I2, 45, 95, I23, 248 / (со знаком "-" внутри клетки), а градиент pH – сравнительно небольшой (с повышенным значением  $\text{pH}_{\text{внутр.}}$ ). Алкалофилы поддерживают обратный  $\Delta \text{pH}$  – более кислый  $\text{pH}_{\text{внутр.}}$ . Для целого ряда бактерий, как аэробных, так и анаэробных, компоненты  $\Delta \rho$  характерным образом зависят от pH среды: при понижении pH среды возрастает  $\Delta \text{pH}$  и снижается  $\Delta \psi$  / 95, I22, I23, I26, 242, 266 /.

Ясно, что возрастание  $\Delta \text{pH}$  в кислой области  $\text{pH}$  среды обеспечивает поддержание постоянства внутриклеточного  $\text{pH}$ . Как показано на *E. coli*, используя несколько независимых методик измерения, внутриклеточное значение  $\text{pH}$  изменяется в интервале не более, чем  $0,6 \pm 0,8$  единиц при изменении  $\text{pH}$  среды в интервале до 4 единиц /45, 191, 231/.

Первичным актом генерирования  $\Delta \psi$  является образование  $\Delta \psi$  путем электрогенного выброса  $\text{H}^+$  из клеток. Учитывая низкую электрическую емкость сопрягающих мембран /179/, ясно, что при этом не образуется реально измеряемый градиент  $\text{pH}$ . Для образования  $\Delta \text{pH}$  необходим транспорт противоионов, которые обеспечивают электронейтральность потока  $\text{H}^+$ . Известно, что у *E. coli* в образовании градиента  $\text{pH}$  участвует электрогенный транспорт ионов  $\text{K}^+$  из среды в клетку /54, 142, 143/, в результате чего наблюдается снижение  $\Delta \psi$  наряду с возрастанием  $\Delta \text{pH}$ .

Считается, что у большинства нейтрофильных бактерий оптимальное значение  $\text{pH}_{\text{внутр.}}$  - около  $7,5 \div 7,6$  и что поддержание внутриклеточного  $\text{pH}$  гомеостаза является фундаментальным свойством физиологии бактериальной клетки /204/. Вероятно, поддержание постоянного значения  $\text{pH}_{\text{внутр.}}$  была эволюционно первой функцией протонных насосов, предшествующей синтезу АТФ /212/.

Некоторые бактерии, как *Streptococcus faecalis* неспособны расти при кислых  $\text{pH}$  среды, если у них нарушена регуляция внутриклеточного  $\text{pH}$  /135/. Эта закономерность наглядно подтверждается также опытами с мутантами алкалофильных бацилл /136/, у которых нарушена регуляция внутриклеточного  $\text{pH}$ . Эти мутанты теряют способность расти при щелочных  $\text{pH}$  среды. Показано, что те же мутанты лишены специфической транспортной системы -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортера /136/. Ионный антипорт можно



считать универсальной и широко распространенной системой, предназначенной для поддержания ионного гомеостаза внутри бактерий или отдельных компартментов эукариотических клеток /144,199/. В частности, системы  $K^+/H^+$  и/или  $Na^+/H^+$  антипорта участвуют в регуляции внутриклеточного рН при щелочных рН среды как у нейтрофилов /66,116,148,210,264,268/, так и у алкалофилов /96,137,146,166,190/.

Кроме активных механизмов поддержания постоянства  $pH_{\text{внутр.}}$  следует учесть и пассивные. Так, для ацидофильных бактерий, в отличие от нейтрофилов, характерен большой градиент рН (более 3 ед.) /75, 170/ и нулевое или даже отрицательное значение  $\Delta\psi$ . Показано, что поддержание  $\Delta pH$  частично независит от метаболической энергии /271/. Возможно, что благодаря большому  $\Delta pH$  при дезэнергизации мембраны образуется диффузионный потенциал  $H^+$ , который предотвращает коллапс  $\Delta pH$ . Другая интересная возможность — "нейтрализация" небольших отклонений  $pH_{\text{внутр.}}$  от оптимума за счет повышения внутриклеточной буферной емкости. Есть данные /145,272/ о резком возрастании буферной емкости внутриклеточного пространства как в области кислых рН среды (у нейтрофилов и ацидофилов), так и при щелочных рН среды (у алкалофилов).

С другой стороны, для ряда анаэробов, а также факультативно аэробных бактерий в анаэробных условиях, не характерна столь четкая регуляция внутриклеточного рН /101,113,124,126, 168/. На фоне сравнительно более низкого значения  $\Delta p$   $pH_{\text{внутр.}}$  меняется в широких пределах в зависимости от рН среды, что

вероятно, обусловлено как усиленной продукцией кислых метаболитов /168/, так и относительно меньшей энергетической эффективностью анаэробного метаболизма.

В последнее время накапливаются данные о регуляторной роли изменений внутриклеточного pH: при прорастании спор бактерий /203,226/, в хемотаксисе /131,213/ и в некоторых других физиологических процессах бактериальной клетки /203/. Почти ничего неизвестно о конкретных механизмах регуляторного действия внутриклеточного pH. До сих пор недостаточно раскрыто также влияние различных факторов среды и, в особенности, физиологического состояния культуры на поддержание внутриклеточного pH. Большинство экспериментального материала получено на отмытых клетках в стандартных буферных средах, часто неучитывая "предысторию" их культивирования и физиологическое состояние в момент измерений. Таким образом, представляется, что концепция о внутриклеточном pH гомеостазе и о роли  $pH_{\text{внутр.}}$  в регуляции требует дальнейшей разработки и расширения.

Относительно причин зависимости  $\Delta \psi$  от pH среды нет полной ясности /125/. В принципе в настоящий момент следует рассматривать несколько возможных механизмов. Во-первых, это может быть изменение  $\Delta \psi$  как следствие регуляции  $\Delta pH$  с помощью упомянутого выше электрогенного транспорта  $K^+$ . Во-вторых, при повышении pH среды возрастание  $\Delta \psi$  можно объяснить работой  $H^+$ -АТФазы /171/ (или работой дыхательной цепи), которая "компенсирует" общее снижение  $\Delta p$  электрогенным транспортом протонов, и, соответственно, увеличением  $\Delta \psi$ . И, наконец, можно пытаться объяснить изменения  $\Delta \psi$  pH-зависимыми изменениями стехиометрии  $H^+$ /катионных антипортеров

/138/. В силу сложности вопроса о рН-зависимости  $\Delta\psi$ , в настоящее время интерпретация некоторых экспериментальных данных (например, в работе /125/) представляет очевидные трудности.

Изменения  $\Delta\psi$  также имеют некоторую регуляторную функцию /203/, в частности, в процессах трансформации и трансдукции. Исследования в этом направлении бурно развиваются.

Необходимо отметить, что измерение  $\Delta\psi$  является слабым местом при количественной оценке величины  $\Delta p$ . Для выбора условий эксперимента, при которых достоверность полученных данных о  $\Delta p$  являются приемлемой, следует вкратце рассмотреть методические проблемы измерения  $\Delta\psi$  и  $\Delta p$ .

### 2.3. Методы измерения $\Delta\psi$ и $\Delta p$

В настоящее время основной методикой количественного измерения  $\Delta\psi$  служит регистрация распределения липофильных катионов (в основном  $\text{Tm}^+$  и  $\text{Tm}^+$ ) между внутриклеточным пространством и средой /45,56,99/. Наряду с этим, для качественного исследования динамики  $\Delta\psi$  иногда используют флуоресцентные зонды /8,250/.

Катионы, применяемые в распределительных методиках должны быть неинвазивными (т.е. не влиять на величину  $\Delta\psi$ ), а их распределение - по возможности адекватно отражать измеряемую величину  $\Delta\psi$  согласно уравнению Нернста /155,219/. Для контроля соответствия "поведения" катионов уравнению Нернста проводится сравнение их распределения с распределением  $\text{K}^+$  или

$Rb^+$  в присутствии валиномицина, а также сопоставление с данными прямого измерения  $\Delta\psi$  микроэлектродами. Применяемость последнего подхода ограничена размерами клеток, например, у гигантских *E. coli* /93/ удалось продемонстрировать хорошее совпадение полученных результатов с данными распределения  $T_{\Phi\Phi}^+$  и  $T_{\Phi M\Phi}^+$ . Несколько работ посвящено сравнению распределения липофильных катионов с распределением  $K^+$  и  $Rb^+$  у *E. coli* /45,56,265/. Результаты этих исследований не вполне однозначны. Так, в работе /45/ получено хорошее совпадение распределения  $T_{\Phi\Phi}^+$  с распределением  $Rb^+$  в присутствии валиномицина в широком диапазоне значений  $\Delta\psi$  и лишь при низких  $\Delta\psi$  ( $< 50 \div 60$  мВ) данные  $T_{\Phi\Phi}^+$  оказались несколько завышенными. Наоборот, в работе /56/ утверждается, что  $T_{\Phi\Phi}^+$  дает существенно завышенные значения  $\Delta\psi$  при  $\Delta\psi$  ниже  $80 \div 100$  мВ и заниженные – при  $\Delta\psi > 100$  мВ. При этом показано, что полученные значения  $\Delta\psi$  по неясным причинам зависят от концентрации добавленного катиона и что эта зависимость имеет характер кривой с максимумом /56,121,265/. Следовательно, распределение катионов  $T_{\Phi\Phi}^+$  и  $T_{\Phi M\Phi}^+$  не вполне соответствует идеальному, что необходимо учитывать при количественной оценке  $\Delta\psi$ . Особенно это относится к измерению малых  $\Delta\psi$ .

Причин неидеального распределения липофильных катионов несколько, но основной из них представляется неспецифическое связывание /155,219/. Необходимо отметить, что в клетках бактерий связывается относительно большая фракция липофильных катионов, которая при  $\Delta\psi \geq 100$  мВ сравнима по порядку с фракцией свободных ионов. При низких  $\Delta\psi$  доля связанных катионов превосходит долю свободных примерно на порядок /98/,

снижая достоверность данных о низких  $\Delta\psi$ . Ясно, что любая недооценка степени связывания катионов приведет к преувеличению значения  $\Delta\psi$ .

К недооценке  $\Delta\psi$ , в свою очередь, могут привести недавно обнаруженные в некоторых бактериях (в т.ч. *E. coli*) системы выброса липофильных катионов /173, 174, 175/, а также кинетические препятствия проникновения  $\text{Tb}^{2+}$  в клетку (низкая проницаемость внешней мембраны грамотрицательных бактерий, возможное влияние  $\text{Tb}^{2+}$  на поверхностный заряд клеток и др.) /56, 121, 265/.

Тем не менее, приемлемое совпадение данных по распределению  $\text{Tb}^{2+}$  с данными других методик дает право считать, что перечисленные недостатки этого катиона не приводят к слишком большой фактической ошибке в определении  $\Delta\psi$  (кроме, конечно, измерений при низких значениях  $\Delta\psi$ ).

Для измерения  $\Delta\text{pH}$  существует большее разнообразие методик и полученные результаты считаются более надежными. Наиболее часто применяется распределительная методика с использованием слабых кислот или оснований /44, 83, 215/, а также  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектроскопия /52, 191/. Метод  $^{31}\text{P}$ -ЯМР выделяется своей неинвазивностью, а также возможностью регистрации  $\text{pH}$  в отдельных компартментах эукариотических клеток, однако серьезным недостатком являются трудности обеспечения адекватных физиологических условий для клеток во время измерения /71/. В ряде работ значение внутриклеточного  $\text{pH}$  регистрируется с помощью флуоресцентных зондов /211, 220/. Эта методика в последнее время усовершенствуется. В качестве контроля можно применять также методики, основанные на регистрации  $\text{pH}$  среды во время лизиса клеток /20, 76/. Нами

этим методом получены данные о внутриклеточном рН у *Brevibacterium flavum* при кислом рН среды, в основном согласующиеся с данными по распределению бензойной кислоты /19/. Недостатком распределительной методики /46/, как и остальных подходов является (подобно  $\Delta\psi$ ) большая ошибка данных при измерении низких значений  $\Delta\text{pH}$ .

#### 2.4. Проблема "локальных" потоков $\text{H}^+$ в энергосопряжении

Рассмотренные выше методики измерения  $\Delta p$  позволяют количественно проверить основные постулаты хемиосмотической теории. Теория Митчелла предусматривает соблюдение некоторых количественных соотношений между потоками (скорость дыхания, синтеза АТФ, транспорта) и силами ( $\Delta p$ , потенциал фосфорилирования). В литературе накапливаются данные о количественных несоответствиях постулатом "делокализованной" хемиосмотической теории /128,229,257/. Эти данные заставляют допускать возможность по крайней мере частичного участия "локальных"  $\text{H}^+$  в процессах энергосопряжения как в митохондриях, так и в бактериях (гипотеза, выдвинутая Уильямсом /262/). Основные группы данных, которых трудно объяснить с позиций классической хемиосмотической теории, следующие:

- количественные отношения между  $\Delta p$  и скоростью дыхания, а также между  $\Delta p$  и скоростью фосфорилирования зависят от способа варьирования  $\Delta p$  (протонофором, валиномицином, ингибитором дыхания или добавкой АДФ) /98,165, 172,220,269,270/;

- наблюдается большая вариабельность отношения  $\Delta p$  к потенциалу фосфорилирования /256,259/;
- обнаружены непротонофорные разобщители (локальные анестетики /218/;
- у бактерий наблюдается прямая корреляция процессов транспорта со скоростью дыхания независимо от величины  $\Delta p$  /88/;
- показано наличие процесса окислительного фосфорилирования в незамкнутых бактериальных везикулах /36/.

Хотя этот перечень не исчерпывает всех известных сложностей классической теории, тем не менее "локальное" сопряжение нельзя считать окончательно доказанным фактом.

Изучая одну и ту же модель в этой области, разные группы исследователей приходят к противоположным выводам по одному и тому же вопросу. Так, имеются работы, подтверждающие независимость отношений потоков и сил от способа варьирования  $\Delta p$  /86,263/ в митохондриях. Не исключено, что часть доводов основаны на экспериментальных артефактах или же на неправильной теоретической интерпретации данных, как и в случае двойного титрования ингибиторами /79,207/.

*A priori* не отвергая возможность "локального" сопряжения, нам представляется необходимым ограничить свои исследования энергии на поддержание "делокализованным"  $\Delta p$  ввиду отсутствия адекватных методов контроля "локальных" потоков  $H^+$ .

## 2.5. Трансмембранные градиенты других катионов

Наиболее изученными в бактериях концентрационными градиентами катионов (кроме  $\Delta \text{pH}$ ) можно считать градиенты  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Известно, что  $\text{K}^+$  накапливается внутри клеток, тогда как  $\text{Na}^+$  выбрасывается в среду /114,120,197,260/. К основным функциям градиента  $\text{K}^+$  относят осморегуляцию /89,102/, создание и регуляцию  $\Delta \text{pH}$  (см. гл. 2.2) /54,135,142,143/, а также необходимость внутриклеточного  $\text{K}^+$  для функционирования некоторых метаболических путей /89/. Градиент  $\text{Na}^+$  также участвует в регуляции  $\Delta \text{pH}$ , особенно при щелочных  $\text{pH}$  среды /96,137,146,166,268/. Существует ряд систем транспорта веществ в симпорте с  $\text{Na}^+$  /85,104,133/. Для некоторых бактерий показано участие  $\text{Na}^+$  в энергосопряжении вместо  $\text{H}^+$  /228,244,245,246/. Кроме того, в условиях энергетического лимита градиенты  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  могут функционировать в роли буферов, поддерживающих соответственно  $\Delta \Psi$  и  $\Delta \text{pH}$  /51,87/. Измерение их величин возможно с помощью атомной абсорбционной фотометрии /252/, используя меченные ионы /185,260/, а также последнее время – методом ЯМР спектроскопии /73,197/.

Если вместо концентрационных градиентов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  рассматривать соответствующие электрохимические градиенты, то видно, что  $\Delta \tilde{\mu}_{\text{K}^+}$  ненамного превышает 0, так как  $\Delta \text{pK}^+$  и  $\Delta \Psi$  имеют противоположное направление, а по абсолютным величинам в оптимальных условиях они близки /38,55,233/. Остается  $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$  который по направлению своих компонент подобен протондвижущей силе. Данных о величине  $\Delta \text{pNa}^+$  в различных группах микроорганизмов пока недостаточно, но отдельные работы свидетельствуют, что эта величина сравнима или даже превосходит значения



$\Delta pH$  /73,246/. Можно сделать вывод, что  $\Delta p$  наряду с  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$  представляют наибольший интерес для исследований в отношении энергии на поддержание, поскольку оба потенциала достаточно большие по величине, выполняют важные энергетические функции и для обоих существуют адекватные методы измерения. Конечно, окончательно судить об этом невозможно, не имея информации о пассивной проницаемости мембраны для соответствующих ионов.

## Глава 3. ПАССИВНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ДЛЯ КАТИОНОВ

### 3.1. Модельные мембраны

Липосомы представляют собой удобную модель изучения пассивной проницаемости различных ионов через липидный бислой, так как заранее исключаются мешающие эффекты систем активного транспорта биомембран. На этой модели изучаются вопросы об относительной проницаемости липидных бислоев для  $H^+$  и других катионов, а также о возможных механизмах ионной проводимости (в частности,  $H^+$ -проводимости) /9,60,65,82,196/.

В работах /78/ на основании упрощенных квантовомеханических расчетов показано, что проницаемость ионов через липидный бислой должна падать экспоненциально по мере возрастания массы иона. Делается предсказание, что отношение проницаемостей  $H^+$  и  $Na^+$  составляет примерно  $10^6$ . Это в основном согласуется с данными ряда экспериментальных работ /9,60/. С этих позиций удивительным кажется факт, что именно  $H^+$  функционирует в качестве сопрягающего иона, так как один из постулатов хемиосмотической теории требует низкую проницаемость сопрягающих мембран для сопрягающего иона /182/. Очевидно, по абсолютному значению  $H^+$ -проницаемость энергетически приемлема для метаболизма, несмотря на то, что для биомембран этот показатель даже выше, чем у липосом (примерно на порядок) /82/.

Ввиду важности  $H^+$  как сопрягающего иона в литературе больше уделено внимания возможным механизмам его проницае-

мости через мембрану. Постулируются механизмы проводимости по цепочкам водородных связей, образуемых из боковых остатков аминокислот мембранных пептидов / 188, 189 / или кластерами воды в местах дефектов в бислое (проводимость Гротхуса) / 9, 65 /. Неисключено, что механизм  $H^+$ -проводимости по цепям водородных связей в белках играет определенную роль также в процессах активного транспорта / 189 /. Возможен и другой механизм – диффузия протонов в составе нейтральных молекул слабых кислот / 63, 65 /.

Исследуя кинетику диссипации  $\Delta pH$  в везикулах лецитина, Брамхалл / 65 / различил оба возможных механизма по их температурной зависимости: "электронейтральная" компонента  $H^+$ -проницаемости напоминает поток небольших нейтральных молекул, а "электрически нескомпенсированная" компонента обнаруживает 12-кратный перепад в области температуры фазового перехода, характерный также для потока  $H_2O$ . Поэтому делается заключение, что наиболее вероятный механизм, лежащий в основе второй компоненты – проводимость Гротхуса в кластерах воды. В работе / 9 / допускается комбинация из этих двух механизмов: проводимость  $H^+$  по водородным связям кластеров воды, электрически компенсируемая потоком некоторых анионов. К сожалению, относительно механизмов пассивной проводимости остальных катионов, столь интересных и плодотворных гипотез не выдвигалось.

### 3.2. Мембраны бактерий

Для изучения пассивной  $H^+$ -проницаемости бактериальных мембран используется метод кислотных пульсов, впервые примененный Митчеллом /182/ (см. гл. 5.3.2). Исследован ряд бактерий /103, 134, 158, 244/ и установлено, что коэффициент пассивной  $H^+$ -проницаемости для всех имеет один и тот же порядок (около  $1 \mu M H^+ / г.сек. \Delta pH$ ), включая даже ацидофилов, поддерживающих большой трансмембранный  $\Delta pH$  /103/. Прямых данных о пассивной проницаемости бактериальных мембран для  $Na^+$  или других катионов в литературе найти не удалось.

Мало до сих пор изучен вопрос о зависимости катионной неспецифической проницаемости, в частности,  $H^+$ -проницаемости мембран микроорганизмов от факторов среды и физиологического состояния культуры. В качестве примера влияния факторов среды на  $H^+$ -проницаемость можно упомянуть эффект возрастания проницаемости плазмолеммы дрожжей в присутствии высоких концентраций этанола /29/. Очевидно, что изучение пассивной проницаемости мембраны непосредственно в физиологических условиях лимитируется возможностями соответствующих методик.

## Глава 4. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ БАКТЕРИИ

Под термином "эффективность работы дыхательной цепи" предлагается понимать количество транспортируемых через мембрану протонов на единицу потребленного кислорода, т.е. стехиометрию  $H^+/O$ , определяющую "энергетическую стоимость" образования  $\Delta p$ . Эффективность работы дыхательной цепи влияет на величину непродуктивных энергозатрат в целом /109,119/, а также, разумеется, на каждый  $\Delta p$  - зависимый путь непродуктивных затрат в отдельности.

### 4.1. Данные о величине $H^+/O$ стехиометрии

В литературе накоплен большой массив данных о значениях  $H^+/O$  стехиометрии у разных бактерий /81,105,112,141,150,154/. У большинства  $H^+/O$  стехиометрия оказалась близка к 4, хотя известны исключения - денитрифицирующие бактерии /141/ с  $H^+/O$  около 8, а также алкалофильный *Bacillus firmus* /154/ с  $H^+/O$  между 9 и 13. Высокие значения  $H^+/O$  у последнего, предположительно, связаны с адаптацией энергетики к существованию в щелочной среде. Удаётся связать наблюдаемые величины  $H^+/O$  со строением дыхательной цепи различных бактерий /118/. В частности, бактерии, имеющие в составе своей ЭЦ цитохром с, проявляют повышенные значения  $H^+/O$  (5-6) /81, 118/.  $H^+/O$  можно измерять прямым путем или рассчитать косвенно из данных о  $P:O$  и  $H^+/AT\Phi$ . В большинстве бактерий отношение  $H^+/AT\Phi$  близко к 2 /100,161,201,249/, хотя сообщаются также более высокие значения /124,160/.  $P:O$ , вы-

численный из материально энергетического баланса /61/ или определяемый по данным прямых измерений скоростей дыхания и фосфорилирования /118/ оказывается близким к 2+3. Сопоставление этих стехиометрий с непосредственно измеренным отношением  $H^+/O$  имеет существенное значение для количественной проверки хемиосмотической теории /180,261/. С другой стороны, существующие методики прямого измерения  $H^+/O$  нельзя считать совершенными и сравнение полученных результатов с косвенным расчетом, а также с оценками с позиций неравновесной термодинамики /153,247/ может помочь избежать грубых ошибок.

На некоторые вопросы методики непосредственного определения  $H^+/O$  следует остановиться более детально.

#### 4.2. Методики измерения $H^+/O$ стехиометрии

Наиболее распространены 2 метода измерения  $H^+/O$  стехиометрии – метод "пульса"  $O_2$  /223,224/ и метод одновременной регистрации начальных скоростей дыхания и транслокации протонов /69/. Первый метод чаще всего использовался для исследования  $H^+/O$  у различных бактерий. Метод заключается в регистрации количества транспортируемых в среду  $H^+$  в ответ на добавление небольшого известного количества  $O_2$  к анаэробной суспензии бактерий или митохондрий в условиях деполяризации  $\Delta\psi$  (добавлением  $K^+$ -валиномицина и/или  $SCN^-$ ). Вторым подход вместо поиска общего количества транслоцируемых  $H^+$  предусматривает одновременную регистрацию кинетик потребления  $O_2$  и подкисления среды с тем, чтобы найти соотношение начальных скоростей этих процессов. На *Methylophilus methylot-*

trophus продемонстрировано совпадение данных обоих методов /81/.

Основная сложность этих методик состоит в необходимости учета обратного потока  $H^+$  в клетку во время опыта /180, 223, 224, 261/. Фактически требуется провести экстраполяцию кинетики обратного потока в клетку  $H^+$  к начальному моменту  $t = 0$ , несмотря на то, что процессы, протекающие в течение  $\sim 1$ -ой секунды после добавления к суспензии  $O_2$  (или субстрата - в некоторой модификации второго метода) включают фазу перемешивания и не поддаются контролю /III, 139, 152, 261/. В рамках второго метода это приводит к неопределенности начальных скоростей как дыхания, так и выброса  $H^+$ . Дискутируется вопрос о влиянии отношения времен ответа кислородного и рН электродов, а также процедуры экстраполяции, на достоверность метода начальных скоростей /139, 152/. В работе /49/ предложен другой метод - определение "стационарной стехиометрии"  $H^+/O$  или отношения стационарной скорости дыхания перед добавлением ингибитора дыхания к начальной скорости потока  $H^+$  в клетку после добавления ингибитора. И хотя метод снимает проблемы определения начальной скорости дыхания и позволяет определять  $H^+/O$  в более физиологичных условиях (аэробность, наличие  $\Delta p$  на сопрягающей мембране), неопределенность начальной скорости потока  $H^+$  не снимается. Теоретически показано /III/, что метод  $O_2$  пульса может дать занижение результатов  $H^+/O$  на величину от 5 % до 25 % ввиду того, что кинетика обратного потока  $H^+$  в клетку имеет двухфазный характер с быстрой фазой в районе первой секунды после начала опыта.

В последнее время группой Митчелла разработан "гибрид-

ный" метод "скоростей/пульса", позволяющий обойти сложности экстраполяции к начальным скоростям тем, что скорость дыхания задается регулируемой подачей  $O_2$  в суспензию, а вместо начальной скорости выброса  $H^+$  регистрируется стационарная кинетика подкисления среды /184/.

Кроме изложенных источников неопределенности в существующих методиках, в исследовании энергетики бактерий мы сталкиваемся с дополнительными сложностями. Рассмотренные методики, особенно в их комбинации, вполне подходят для изучения препаратов митохондрий с целью добывания достоверной информации о механизмах транслокации  $H^+$ . Однако, подобно измерению  $C_{H^+}$ , эти методики требуют работать с клетками в условиях, далеких от физиологических. Для подготовки бактерий к определению  $H^+/O$  требуется голодание клеток, и это мешает отнести результаты к исходному физиологическому состоянию культуры. В работе /105/ на факультативных метилотрофах показано влияние режима голодания, хранения на холоду исходного материала, а также концентраций валиномицина и  $SCN^-$  в среде инкубирования на наблюдаемую стехиометрию  $H^+/O$ . Ясно, что для получения адекватной информации о  $H^+/O$  в бактериях, наряду с применением имеющихся методик, следует изыскать возможности определения этого показателя в физиологических условиях.



## РЕЗЮМЕ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ

Таким образом, можно предположить, что поддержание трансмембранных ионных градиентов представляет собой важный, но мало исследованный вид непродуктивных затрат энергии метаболизма. В литературе нет прямых экспериментальных данных о величинах энергии на поддержание протондвижущей силы и других градиентов у бактерий. Исследователями ранее не проводились расчеты энергии на компенсацию пассивных потоков ионов на основе величин мембранной энергетики – ионных градиентов, пассивных проницаемостей и транспортных стехиометрий соответствующих ионов. Нет также работ, в которых бы делалась попытка оценить величину энергии на поддержание ионных градиентов путем отключения соответствующих генераторов.


Анализ данных литературы показывает, что:

- 1) при выяснении величины энергии на поддержание ионных градиентов в первую очередь следует обратить внимание на градиенты и потоки ионов  $H^+$  и  $Na^+$ , участвующих в процессах энергосопряжения и активного транспорта у бактерий;
- 2) важно при этом учитывать влияние условий культивирования и физиологического состояния клеток на энергетические параметры.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 5. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 5.1. Характеристика объектов исследования

Продуценты лизина из рода *Brevibacterium* относятся к группе коринеформных бактерий / 23 , 59 , 127 /, являются грамположительными факультативными анаэробами и не образуют спор. Клетки овальные, диаметром 0,6–1,0 мкм и в длину – 1–3 мкм /  / (рис. 5.1.). При выращивании на мясо-пептонном агаре колонии круглые, с гладкой, слегка возвышающейся поверхностью, окрашенные в желтый цвет.

Исследования проводились с ауксотрофным по гомосерину и витаминам – биотину и тиамину – лизинсинтезирующим штаммом RC-II5, а также прототрофными ревертантами RC-II5-II и 22 ЛД-II. Прототрофные ревертанты не нуждаются в добавках аминокислот в среду культивирования, что облегчает балансовые расчеты.

*B. flavum* обладает широким спектром ассимилируемых источников углерода, в особенности штамм RC-II5, который ассимилирует гексозы, пентозы, этиловый спирт, сорбит и целый ряд органических кислот.

Этанолпродуцирующие бактерии *Zyomonas mobilis* занимают особое таксономическое положение /72/. *Z. mobilis* является грамотрицательным азотолерантным анаэробом. Нами исследовался штамм *Z. mobilis* II3, представляющий собой палочки длиной до 1,7–2,0 мкм (рис. 5.2.). Часть клеток в популяции подвижны и обладают 1–4 полярно размещенными жгутиками. Штамм II3 нуждается в пантотенате и биотине, которые обычно вносят в среду с дрожжевым экстрактом.

Эти бактерии плохо растут на твердых агаризованных сре-

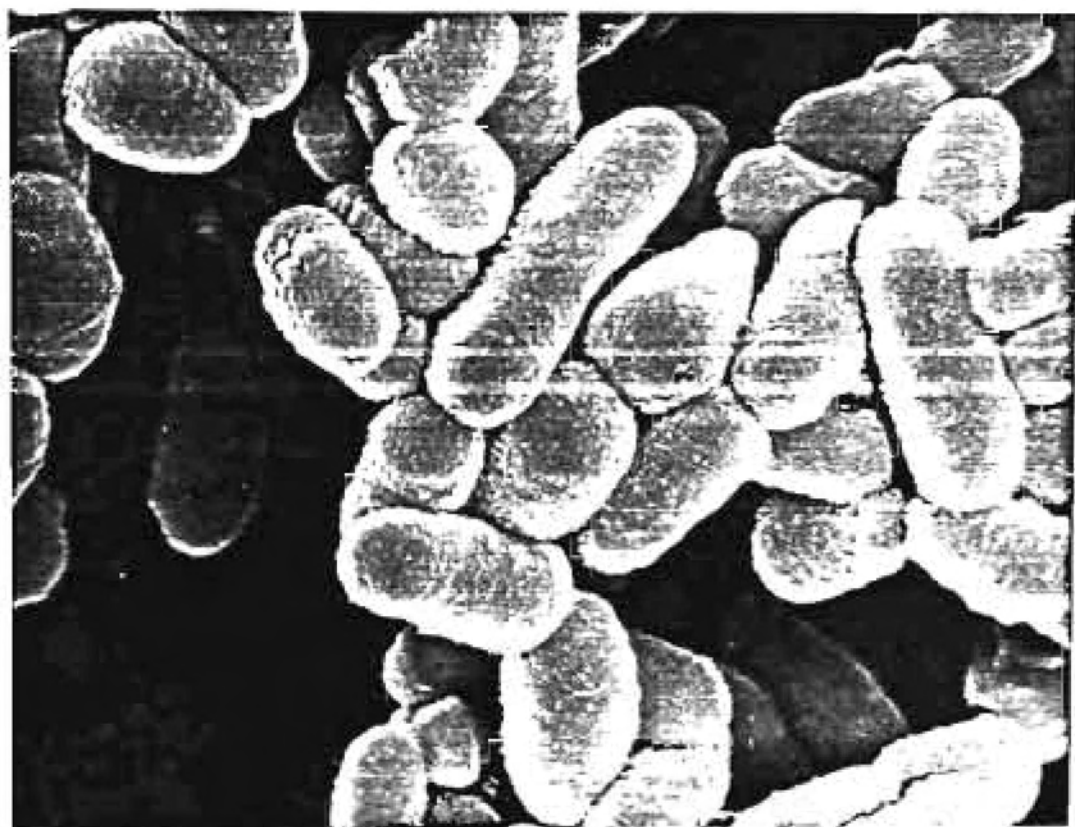


Рис. 5.1. Электронная микрофотография клеток *Brevibacterium flavum*. Увеличение 18000x

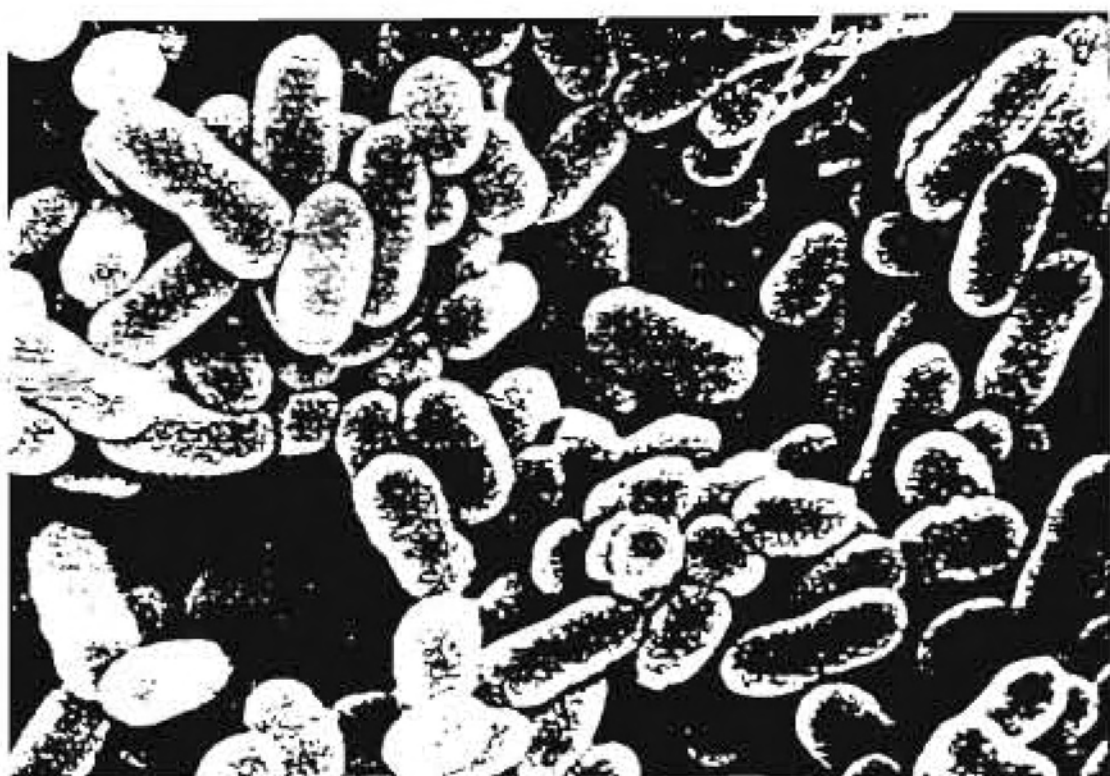


Рис. 5.2. Электронная микрофотография клеток *Zymomonas mobilis*. Увеличение 10000x

цах, образуя мелкие, округлые колонии серого цвета. *Z. mobilis* способны утилизировать ограниченное количество источников углерода. Штамм ИЗ ассимилирует глюкозу, фруктозу и сахарозу. Особенностью этих бактерий является их толерантность к высокой концентрации углеводов (до 40 %) и этанола (до 13 %) /4/.

## 5.2. Культивирование бактерий

### 5.2.1. Состав питательных сред

Прототрофные ревертанты *B. flavum* 22 ЛД-П и РС-ИИ5-П культивировали на среде со следующим составом (г/л) : сахароза или ацетат калия - 15, ростовые факторы (кукурузный экстракт или гидролизат БВК) - 5,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  - 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,5. Культивирование ауксотрофного лизинпродуцирующего штамма РС-ИИ5 проводили в средах с 2-4 раза большим содержанием ростовых факторов.

*Zygomonas mobilis* культивировали на среде следующего состава (г/л) : глюкоза - 100, дрожжевой экстракт (Олайне) - 7,0,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  - 1,6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  - 1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,5.

### 5.2.2. Поддержание культур и выращивание бактерий в периодическом режиме

Культуру штаммов *B. flavum* поддерживали, регулярно пересеивая их на твердой среде с мясо-пептонным агаром. Колонии выращивались в термостате при температуре  $31^\circ\text{C}$  в течение суток, а затем хранились при  $+4^\circ\text{C}$  в холодильнике до 2-3 не-

дель.

В периодическом режиме *V. flavum* культивировали в колбах Эрленмейера (750 мл), куда вносили культурную среду (с pH = 7,2) и инокулят с расчета, чтобы общий объем культуры не превышал 50 мл (при больших объемах культуры трудно обеспечить достаточно интенсивную аэрацию). Клетки выращивали в термостатируемых условиях на качалке и скоростью качания 240 об/мин.

Для поддержания культуры *Z. mobilis* ИИЗ использовали частые пересевы (раз в 2 недели) в жидкую питательную среду следующего состава (г/л) : глюкоза - 50, дрожжевой экстракт - 7,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5. Бактерии выращивались в пробирках при температуре 30°C в течение 20 часов, а затем хранились при +4°C в холодильнике.

Периодическая культура *Z. mobilis* выращивалась в термостатируемых условиях в колбах емкостью 250 мл, содержащих 200 мл среды (pH = 5,8).

### 5.2.3. Культивирование бактерий

#### в хемостатном режиме

Наряду с периодическим культивированием в колбах при изучении *V. flavum* было применено также культивирование в хемостатном режиме.

Бактерии культивировали на лабораторных установках АНКУМ-2 (СКБІ ВП АН СССР, Пущино) или MBR (Швейцария). Рабочий объем аппарата в обоих случаях составлял 1,5 л. Обе ус-

тановки были доукомплектованы оригинальным пультом газового анализа ПГА-1 или ПГА-2 (ЭЭМЗ АН Латв.ССР). В аппарате АНКУМ-2 было усовершенствовано термостатирование и установлена система измерения тепловыделения /27 /, а подача титрантов и питательных сред осуществлялась с помощью перистальтических насосов взамен оригинальных пневматических дозаторов.

Во время культивирования регистрировали следующие параметры: температуру и давление в аппарате, рН, еН, рO<sub>2</sub> среды культивирования, скорость оборотов мешалки, расход аэрируемой газовой смеси, концентрацию O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> на входе и выходе из ферментатора. Скорость дыхания хемостатной культуры находили методом газового баланса по разности концентраций O<sub>2</sub> во входящем и выходящем потоке газа / 2 / согласно формуле:

$$Q_{O_2} = \frac{\Delta C_{O_2} \cdot q_{нч}}{22,4 \cdot V} \quad \text{моль/л.час} \quad (5.1)$$

где  $\Delta C_{O_2}$  - разница концентраций O<sub>2</sub> во входящем и выходящем аэрируемом воздухе,

$q_{нч}$  - скорость потока проходящего через ферментатор воздуха, приведенная к нормальным условиям,

$V$  - объем ферментатора.

#### 5.2.4. Определение концентрации биомассы и субстрата в культуральной среде

Содержание биомассы определяли по весу клеток, высушенных в течение 24 час. при 105°C. Практически концентрацию биомассы измеряли по оптической плотности разбавленной клеточной суспензии. Единицы оптической плотности преобразовали

в единицы массы по соответствующим калибровочным кривым.

Количество углеводных субстратов в среде определяли эбулиостатически / 7 / или с 3,5-динитросалициловой кислотой /176 /. В отдельных случаях в работе с *Z.mobilis* содержание углеводов анализировали хроматографически на анализаторе углеводов Biotronic ZA 2000 (ФРГ).

В ряде случаев концентрацию источника углерода в культуральной жидкости определяли по разработанному нами методу, основанному на измерении разности между начальной концентрацией и потребленной частью источника углерода /42 /. При этом, потребленную часть источника углерода в периодическом процессе определяли интегрированием произведения скорости потребления кислорода на стехиометрический коэффициент биологического окисления, а в непрерывном процессе – по отношению произведения скорости потребления кислорода на стехиометрический коэффициент биологического окисления к скорости разбавления среды.

### 5.3. Изучение скорости дыхания и транс- мембранных потоков $H^+$ у отмытых клеток, инкубируемых в термостате

#### 5.3.1. Контроль $pO_2$ и скорости дыхания

$pO_2$  в клеточной суспензии регистрировали электродом Кларка с помощью  $pO_2$  анализатора фирмы "Beckman" (модель 0260). Инкубирование клеток проводилось в открытом стеклянном стакане объемом 50 мл при непрерывном перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 1000 об./мин. Перед началом измерения скорости дыхания снизили обороты мешалки до 70

об./мин. Принималось, что наблюдаемое постепенное снижение  $pO_2$  суспензии отражает скорость дыхания, так как в этих условиях скорость диффузии  $O_2$  из атмосферы в суспензию пренебрежимо мала по сравнению со скоростью его потребления клетками /225/. Такое предположение подтверждалось следующим контрольным опытом: к суспензии активно дышащих клеток, понижающих  $pO_2$  до 0 в теч. 1+2 мин. добавляли  $NaCN$  в ингибирующей концентрации. При скорости перемешивания 70 об./мин. возрастания  $pO_2$  в течение последующих несколько минут не наблюдалось. Электрод калибровали с помощью сульфита натрия.

В опытах по влиянию протонифоров на протондвижущую силу, пассивную  $H^+$ -проницаемость мембраны и дыхание *S. flavum* скорость дыхания измеряли в аппарате Варбурга, как описано в /37/.

### 5.3.2. Определение коэффициента пассивной

#### $H^+$ -проницаемости плазматической мембраны

Проницаемость мембраны для  $H^+$  измеряли по методике Митчелла /158, 182/: добавлением небольших известных доз  $HCl$  к бактериальной суспензии с последующей регистрацией кинетики диффузии протонов внутрь клеток.

К суспензии бактерий добавляли валиномицин ( $1-5 \mu M$  конечная концентрация) и  $NaSCN$  (50 мМ конечная концентрация) для обеспечения электронейтральности потока  $H^+$  в клетку. 8 мл суспензии поместили в термостат при  $31^\circ C$  в закрытой кювете или в открытой кювете, через которую продували  $N_2$ . В кювете поместили комбинированный стеклянный рН электрод типа



ГК 235I С фирмы "Radiometer" для непрерывного контроля рН. Суспензию перемешивали магнитной мешалкой со скоростью 300 об./мин. рН обычно стабилизировался в течение 0,5±1,5 часа. Необходимое рН в суспензии установили постепенными добавками 1N KOH или 1N HCl в течение этого периода.

Для измерения  $C_{H^+}$  к анаэробной суспензии клеток (анаэробность в закрытой кювете устанавливалась в результате цыхания самих клеток, а в открытой кювете - продуванием  $N_2$ ) добавляли 10±100  $\mu$ м анаэробной 0,1N HCl, с расчетом, чтобы начальное снижение рН не превышало 0,2 единицы. Величина скачка рН сразу после добавления кислоты позволяет рассчитать буферную емкость среды + клеточных поверхностей -  $V_{\text{внешн.}}^{H^+} = [H^+] / \Delta \text{pH}$  начальное. Разница между значениями рН до добавления HCl и после уравнивания отражает общую буферную емкость внутри- и внеклеточной фаз -  $V_{\text{общ.}}^{H^+}$ . Буферная емкость внутриклеточной фазы рассчитывается как разность  $V_{\text{внутр.}}^{H^+} = V_{\text{общ.}}^{H^+} - V_{\text{внешн.}}^{H^+}$ . Коэффициент проницаемости находится по формуле:

$$C_{H^+} = \frac{V_{\text{внутр.}}^{H^+} \cdot V_{\text{внешн.}}^{H^+}}{V_{\text{общ.}}^{H^+}} \cdot \frac{\ln 2}{\tau_{1/2} \cdot m}, \quad (5.2)$$

где  $m$  - биомасса (г), а  $\tau_{1/2}$  - время полувозрастания рН после кислотного импульса.

### 5.3.3. Определение $H^+/O$ стехиометрии

Применялась классическая методика определения  $H^+/O$  стехиометрии дыхательной цепи, предложенная Митчеллом /224/. К анаэробной суспензии бактерий добавляли малое количество  $O_2$

(300  $\mu$  л или 500  $\mu$  л насыщенной воздухом воды) и регистрировали кинетику подкисления среды. Условия инкубирования клеток и аппаратура для измерения рН среды – те же, что в случае исследования пассивной  $H^+$ -проницаемости мембраны (см. выше). Учитывая буферную емкость среды, из данных об изменении рН рассчитывали количество выброшенных из внутриклеточного пространства протонов. На основании кинетики изменения рН среды делалась соответствующая коррекция на пассивный поток выброшенных  $H^+$  обратно в клетку /224/.

#### 5.4. Измерение протондвижущей силы

В ряде случаев перед процедурой измерения протондвижущей силы клетки отделяли от среды и отмывали для получения суспензии эндогенно дышащих бактерий. Для этого культуру центрифугировали, один раз отмывали в 40 мМ KCl и ресуспендировали в 200 мМ растворе KCl или 100 мМ Na/K фосфатном буфере (в опытах по концентрационной зависимости  $\Delta$  рН и для  $^{31}P$  ЯМР). рН среды по необходимости регулировали добавками 0,2 N HCl.

##### 5.4.1. Измерение трансмембранного электрического потенциала

После инкубирования 30 мл суспензии *V. flavus* в течение 5 мин. при  $31^{\circ}C$  добавляли 10  $\mu$ л  $^3H$ -тетрафенилфосфония ( $TPP^+$ ) ("Amersham"), (0,3±0,5  $\mu$  Ci), 10  $\mu$ л немеченного  $TPP^+$  (в конечной концентрации примерно 10 ÷ 12 микромолей)

и продолжали инкубирование еще 15 мин. После этого 1 мл суспензии внесли в 1,5 мл центрифужную пробирку и центрифугировали 1 мин. при 8000 об./мин. 100  $\mu$ л надосадочной жидкости вносили в бутылочку для жидкостно-сцинтилляционного счета. Осадок ресуспендировали в 200  $\mu$ л  $H_2O$  и 100  $\mu$ л от этой суспензии также вносили в бутылочку для счета радиоактивности. Концентрация клеток в суспензии во время инкубирования с  $TFF^+$  не превышала 3 мг сухого веса на мл среды (кроме опытов по изучению зависимости компонентов протондвижущей силы от концентрации биомассы). Во время инкубирования в суспензии контролировали pH и  $pO_2$ .

Перед центрифугированием измеряли скорость потребления  $O_2$ . Оказалось, что в данных условиях весь растворенный кислород полностью потребляется за 2-3 мин. Из этого следует, что в закрытой центрифужной пробирке за 1 мин. не наступает аноксия и, поэтому нет оснований опасаться о получении заниженного значения  $\Delta\psi$ .

Деэнергизацию клеток вызывали добавлением протонофорного разобщителя ХКФ (60  $\mu$ М конечная концентрация) или 1-2 каплями ( $\sim 10 \mu$ л) толуола с последующим диспергированием на вибраторе в теч. 45 сек. При кислых значениях pH среды количество связанного  $^3H-TFF^+$  образцов, обработанных обоими способами, оказалось близким. При нейтральных pH количество связанного  $^3H-TFF^+$  у образцов с ХКФ увеличилось незначительно ( $\sim 2$  раза), а у образцов с толуолом - 5-6 раз. Поэтому для коррекции на связывание  $TFF^+$  применяли обработку ХКФ. Однако, обработка 60  $\mu$ М ХКФ не полностью снимала  $\Delta$  pH, что видно также по данным  $^{31}P$ -ЯМР (табл. I). В случае измерения  $\Delta$  pH эффективнее оказался толуол или

меньшая концентрация ХФ ( $\sim 0,3 \mu\text{M}$ ).

Внутриклеточный объем измеряли по стандартной методике посредством  $^{14}\text{C}$ -гидроксиметилинулина и  $^3\text{H}_2\text{O}$  /233/ и получили значение около  $1,6 \mu\text{л} / \text{мг}$  сухого веса. Значение  $\Delta\psi$  рассчитали по уравнению Нернста.

#### 5.4.2. Измерение внутриклеточного pH распределительным методом

Внутриклеточное значение pH рассчитывали по распределению  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты согласно уравнению:

$$\text{pH}_{\text{внутр.}} = \text{pK}_a + \left[ \frac{T_{\text{внутр.}}}{T_{\text{внешн.}}} (10^{\text{pH}_{\text{внешн.}} - \text{pK}_a} + 1) - 1 \right] \quad (5.3)$$

где:  $T_{\text{внутр.}}$  - количество зонда в водной фазе клетки и в среде, соответственно;  $\text{pK}_a$  - отрицательный логарифм константы диссоциации бензойной кислоты /83/.

К суспензии клеток добавляли  $10 \mu\text{л}$  ( $2 \mu\text{Ci}$ )  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты ("Amersham"),  $10 \mu\text{л}$  немеченной бензойной кислоты ("Sigma"), ( $10 \mu\text{M}$  конечная конц.) и поступали, как описано выше (см. 5.4.1). При pH среды выше 8 вместо бензойной кислоты применяли  $^{14}\text{C}$ -метиламин и  $\text{pH}_{\text{внутр.}}$  рассчитали по формуле:

$$\text{pH}_{\text{внутр.}} = \text{pK}_b - \left[ \frac{T_{\text{внутр.}}}{T_{\text{внутр.}}} (10^{\text{pK}_b - \text{pH}_{\text{внешн.}}} + 1) - 1 \right] \quad (5.4)$$

где  $\text{pK}_b$  - отрицательный логарифм константы диссоциации метиламина.

У *Z. mobilis*  $\Delta$  pH измеряли по аналогичной процедуре, но без аэрации (во время инкубирования суспензии не перемешивали).

### 5.4.3. Счет радиоактивности

К 100  $\mu$ л суспензии осажденных клеток (см. "определение  $\Delta\psi$ ") добавляли 100  $\mu$ л растворителя "Protosol" и инкубировали при температуре 55 $^{\circ}$ С в течение 20–24 часов. Потом добавляли 10 мл сцинтиллятора (8 частей диоксана, 2 части толуола и 5 г ППО, 1 г ПОПОП, 80 г нафталина на 1 л). Активность образцов подсчитали в режиме счета двойной метки с внешней стандартизацией. Результаты выражали в распады в минуту на 1  $\mu$ л внутри- или внеклеточной среды и использовали для расчетов  $\Delta\psi$  и  $pH_{\text{внутр}}$ .

### 5.4.4. Измерение внутриклеточного pH методом $^{31}\text{P}$ -ЯМР

Внеклеточное и внутриклеточное значение pH регистрировали также по химическим сдвигам сигналов вне- и внутриклеточного неорганического фосфата в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР получены на спектрометре «М-360 Вушер» (ФРГ) с резонансной частотой для ядер  $^{31}\text{P}$  145,8 МГц.  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектры суспензии клеток в 100 мМ К/Na фосфатном буфере получали в 10 мм ампуле, приспособленной для аэрирования, как показано в работе /222/. В ампулу вносили 4 мл суспензии с концентрацией биомассы 65 мг/мл. При аэрировании через суспензию прощували воздух со скоростью 10 мл/сек. Спектры получали 70 $^{\circ}$  радиочастотным импульсом (30  $\mu$ сек длины), с 2500-кратным накоплением (время накопления – 20 мин.). Временной интервал между последующими импульсами – 0,5 сек. Ширина спектров – 10 кГц, а цифровое разрешение – 2,4 Гц/точка. Химические сдвиги сигналов  $^{31}\text{P}$ -ЯМР измерялись относительно внешнего

стандарта – 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Отнесение сигналов проведено по литературным данным /231/.

### 5.5. $^{23}\text{Na}$ -ЯМР спектроскопия

#### 5.5.1. Измерение трансмембранного градиента $\text{Na}^+$

Спектры  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР получены на том же спектрометре с резонансной частотой 95,26 МГц. Спектры получали  $45^\circ$  радиочастотным импульсом с 1000-кратным накоплением (время накопления – 50 сек.). При исследовании кинетики изменения градиента, накопление спектра проводилось раз в 3 минуты. Сигналы внутриклеточного и внеклеточного  $\text{Na}^+$  можно наблюдать одновременно после добавления в среду 6 мМ анионного парамагнитного реагента сдвига  $\text{Dy}(\text{P}_3\text{O}_{10})_2^-$  как в работе /117/. Площади под спектральными линиями калибровали, используя раствор  $\text{NaCl}$  с известной концентрацией. Спектроскопическую "видимость" ("visibility") определяли, добавляя к суспензии клеток грамицидин D и сравнивая абсолютные значения изменений сигналов внутриклеточного и внеклеточного  $\text{Na}^+$ , как в /197/. Количество суспензии клеток и концентрация биомассы – те же (гл. 5.4.4).

#### 5.5.2. Определение $\text{Na}^+$ -проницаемости мембраны

Из данных о кинетике диссипации  $\Delta p\text{Na}^+$  находили время полуснижения градиента –  $\tau_{1/2}$ , за нулевой уровень принимая конечное стационарное значение  $\Delta p\text{Na}^+$ . Буферную емкость  $\text{Na}^+$  в среде рассчитали по формуле:

$$V_{\text{среды}}^{\text{Na}^+} = \frac{d([\text{Na}^+]_{\text{среды}})}{d(\Delta p\text{Na}^+_{\text{среды}})} = \frac{[\text{Na}^+]_{\text{среды}}}{0,434} \quad (5.4)$$

допуская, что весь  $\text{Na}^+$  находится в свободном состоянии. Буферную емкость внутриклеточного  $\text{Na}^+$  определяли аналогично, но, кроме того, полученную по формуле (5.5) величину делили на спектроскопическую видимость. Принималось, что спектроскопическая видимость отражает отношение [количество свободного  $\text{Na}^+$  / общее количество  $\text{Na}^+$ ] внутри клетки / 73,197 / и что буферная емкость растет пропорционально количеству связанного иона.

Коэффициент проницаемости  $L_{\text{Na}^+}$  рассчитали аналогично коэффициенту пассивной  $\text{H}^+$ -проницаемости мембраны (гл. 5.3.2).

### 5.6. Определение АТФ

Содержание внутриклеточного АТФ измеряли стандартной люциферин – люциферазной методикой /156/. Образцы фиксировали, добавляя 1,5 мл клеточной суспензии к 0,5 мл 20 % трихлоруксусной кислоты. После этого образец разводили в ТРИС-ацетатном буфере стократно. Добавление люциферин – люциферазной системы и регистрация биолюминесценции производилась автоматически в люминометре 1251 фирмы "LKB Wallac". В работе пользовались стандартными наборами реактивов для измерения АТФ, представляемых упомянутой фирмой.

### 5.7. Математическая обработка результатов

Данные в таблицах, где специально не указано число повторностей, представляют собой среднее арифметическое от 2–3 повторов. В тех случаях, когда наблюдается относительно большой разброс результатов измерений (как в случае определения  $C_{H^+}$  или  $H^+/O$ ), приводится двойное значение стандартного отклонения среднего арифметического.

Для калибровки измерительных приборов (нахождение эмпирической зависимости оптической плотности суспензии от концентрации биомассы бактерий, нахождение зависимости эффективности счета от степени тушения для жидкостно-сцинтилляционного счетчика) пользовались стандартными программами линейной и нелинейной регрессии для персонального компьютера "Apple II e". Эмпирическая зависимость внутриклеточного pH от pH среды у *V. flavum* (гл. 6) также получена методом линейного регрессионного анализа.

При определении стехиометрии  $H^+/O$  методом кислотных пульсов (гл. 9) степень соответствия результатов расчета экспериментальным данным оценивали методом наименьших квадратов. Была создана специальная программа для нахождения набора параметров, соответствующих этому критерию.

На графиках, как правило, точкам соответствуют результаты отдельных измерений.



## Глава 6. ПРОТОНДВИЖУЩАЯ СИЛА у *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

Зависимость величин  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$  у *B. flavum* от  $pH$  среды и некоторых других факторов изучали у культуры бактерий в двух физиологических состояниях: в состоянии дыхательного контроля и в состоянии без дыхательного контроля. Эти состояния обозначены соответственно как "состояние 4" и "состояние 3" /74/, как это принято в работах с митохондриями. Состояние культуры зависит от источника углерода и энергии. Клетки в состоянии 4 легко получить, выращивая бактерии на богатой среде, содержащей сахарозу и кукурузный экстракт. На среде, содержащей ацетат и БВК, растущие клетки обычно находятся в состоянии 3, также как и эндогенно дышащие *B. flavum*. Перед каждым опытом специально определяли состояние популяции *B. flavum*. Контролем для этого служило влияние разбавителя ХКФ или небольшой дозы кислоты (непосредственно в ферментатор к хемотратной культуре) на скорость дыхания.

### 6.1. Зависимость $\Delta pH$ от $pH$ среды культивирования

Данные о  $\Delta pH$  у хемотратной культуры *B. flavum* в состоянии 3 представлены на рис. 6.1.В. В данном случае клетки культивировали на среде с ацетатом.  $\Delta pH$  снижается в сторону щелочных  $pH$  среды, при этом даже в кислой области  $pH$  по абсолютному значению не превышал 50 мВ (кроме при  $pH$  среды = 4). При  $pH$  среды выше 8  $\Delta pH$  отсутствует или имеет обратный знак. В силу того, что во всем диапазоне значений  $pH$  среды градиент  $\Delta pH$  по абсолютному значению невелик, распределительная методика с применением  $^{14}C$ -бензойной кислоты или  $^{14}C$ -метиламина (при  $pH > 8$ ) дает большой разброс результатов /125/.

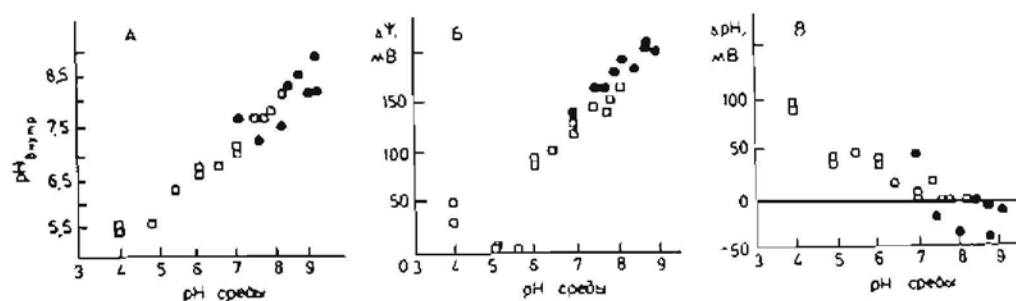


Рис. 6.1. Зависимость внутриклеточно рН (А),  $\Delta\psi$  (Б) и  $\Delta\text{рН}$  (В) у хемотратной культуры *V. flavum* 22 ЛД-П в состоянии 3 от стационарного значения рН среды. Источник углерода и энергии:  $\square$  - БВК+ацетат,  $\bullet$  - кукурузный экстракт + ацетат.

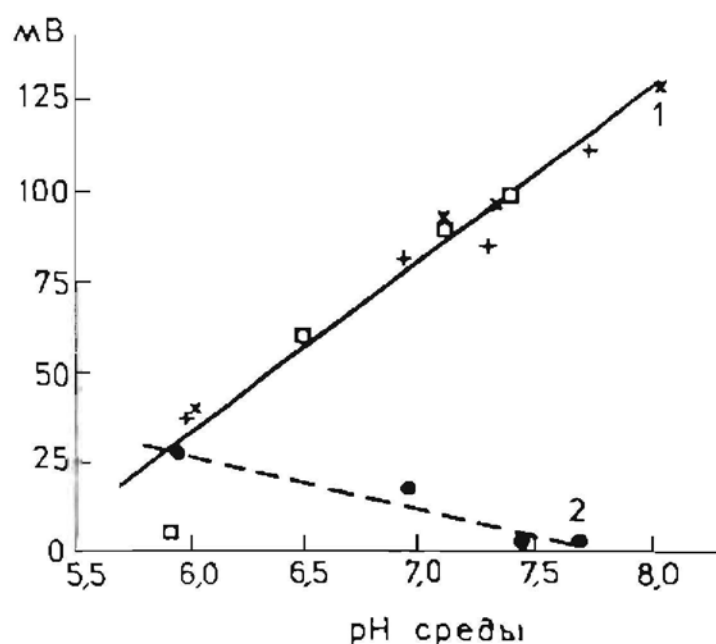


Рис. 6.2.  $\Delta\psi$  после 1 ( $\times$ ), 3 ( $+$ ) и 5 ( $\square$ ) часов голодания и  $\Delta\text{рН}$  после 3 ( $\bullet$ ) часов голодания *V. flavum* 22 ЛД-П в 200 мМ КСІ.

Внутриклеточный рН, соответственно, изменяется в широких пределах: от рН = 8,9 до рН = 5,5 (рис. 6.1А). Зависимость рН<sub>внутр.</sub> от рН среды хорошо описывается уравнением:

$$\text{pH}_{\text{внутр.}} = 0,66 \cdot \text{pH}_{\text{среды}} + 2,61.$$

В литературе имеются данные, что наличие в среде роста слабых кислот, в т.ч. ацетата, вызывает коллапс  $\Delta \text{pH} / 130,221 /$ . Однако, оказалось, что весьма сходная зависимость

$\Delta \text{pH}$  от рН среды наблюдается у клеток, утилизирующих эндогенный субстрат в 200 мМ растворе КСІ (рис. 6.2). Данные относятся к концу 3 часа голодания. Следовательно, добавленный ацетат не является главной причиной, вызывающей "аномальное" поведение  $\Delta \text{pH}$  при низких рН среды у *Brevibacterium flavum*.

Одновременно на среде с ацетатом в области кислых рН среды резко падает скорость дыхания и при рН около 5 клеток перестают дышать (рис. 6.3). Поэтому труднее понять причину некоторого возрастания  $\Delta \text{pH}$  при снижении рН среды до 4,0 (рис. 6.1), когда дыхание прекращено. Предположительно в таких экстремальных условиях  $\Delta \text{pH}$  поддерживается за счет градиентов других ионов  $/51/$  и независимо от работы дыхательной цепи.

В процессе периодического роста бактерий на среде с сахарозой культура понижает рН среды от нейтрального значения до значений около 5,0±5,2 (рис. 6.4Б). Клетки находятся в состоянии 4. При достижении рН среды 5,0±5,2 значение  $\Delta \text{pH}$  составляет около 1 ед. (рис. 6.4А). Внутриклеточное значение рН стабильнее, чем у клеток в состоянии 3 и меняется в пределах около 1,2 единиц при изменении рН среды на 2 ед. Конечно, и в этом случае нельзя говорить о "полноценном" гомеостазе внутриклеточного рН. Зависимость внутриклеточного рН от рН среды в этом случае описывается уравнением:  $\text{pH}_{\text{внутр.}} = 0,59 \cdot \text{pH}_{\text{среды}} + 3,25.$

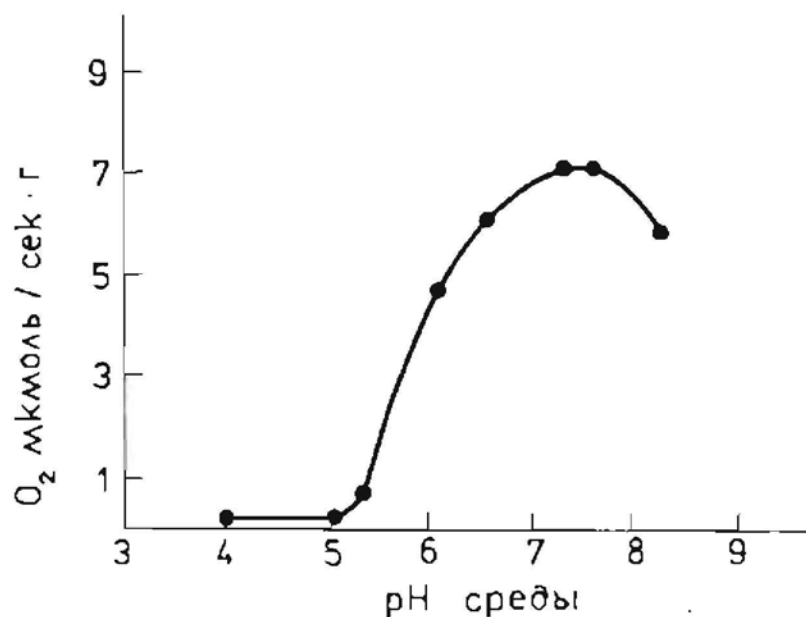


Рис. 6.3. Влияние pH среды на скорость дыхания у клеток *V. flavum* 22 ЛД-П в состоянии 3, инкубируемых в среде, содержащей 200 мМ КСI+0,5 % ацетат калия.

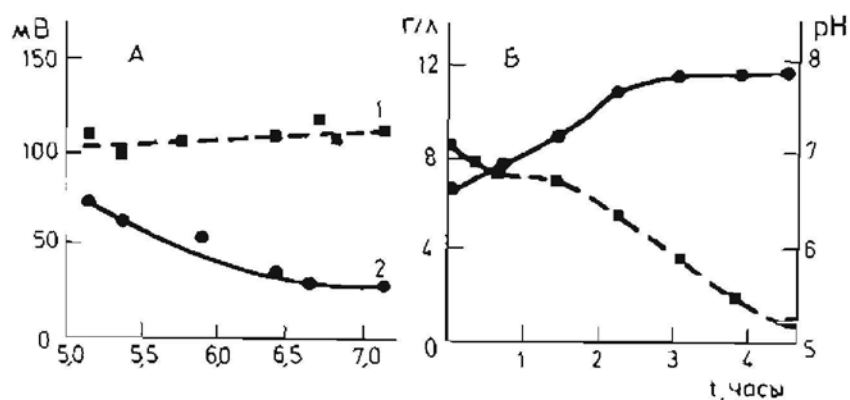


Рис. 6.4. Протондвижущая сила у периодической культуры *V. flavum* 22 ЛД-П в состоянии 4 на среде с кукурузным экстрактом и сахарозой. А – зависимость  $\Delta\psi$  (I) и  $\Delta\text{pH}$  (2) от pH среды (значения pH среды снижались в результате роста и метаболизма самой культуры), Б – динамика роста биомассы (●) и подкисления среды (■).

## 6.2. Зависимость $\Delta\psi$ от pH среды

У хемостатной культуры *V. flavum* на среде с ацетатом  $\Delta\psi$  сильно зависит от pH среды: в направлении кислых значений pH среды наблюдается крутое снижение  $\Delta\psi$  и при pH около 5,0±5,5  $\Delta\psi$  приближается к 0 (рис. 6.1.). Некоторое возрастание  $\Delta\psi$ , аналогично  $\Delta$  pH, наблюдается при pH среды = 4. Очень сходная зависимость  $\Delta\psi$  от pH среды наблюдается у клеток в 200 мМ растворе KCl без добавления экзогенного субстрата (рис. 6.2.).

С другой стороны, стабильное значение  $\Delta\psi$  около 100±120 мВ, которое практически не зависит от pH среды, наблюдается у периодической культуры в состоянии 4 на среде с сахарозой (рис. 6.4.).

## 6.3. Данные $^{31}\text{P}$ -ЯМР о внутриклеточном pH

Наряду с опытами с  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислотой внутриклеточный pH *V. flavum* исследовался методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (рис. 6.5.). Изучали влияние аэрации, добавки субстрата, валиномицина и разбавителя ХКФ на значение внутриклеточного pH у клеток в 100 мМ K/Na фосфатном буфере (табл. 6.1.). Установлено, что при аэрации у клеток, утилизирующих эндогенный субстрат, внутриклеточный pH возрастает. После добавления субстрата – сахарозы pH<sub>внутр.</sub> резко падает, вероятно, в связи с тем, что система аэрации в ампуле ЯМР спектрометра не в состоянии обеспечить аэробные условия после сильного увеличения скорости дыхания.

Добавление валиномицина (3 мкМ конечн. конц.) к анаэробной суспензии клеток приводило к возрастанию  $\Delta$  pH примерно на 1 единицу. Добавление ХКФ (60 мкМ конечн. конц.) сразу после добавления валиномицина снизило  $\Delta$  pH, но не полностью (табл. 6.1.), что соответствует наблюдениям в опытах с  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислотой (см. гл. 5.4.1.).

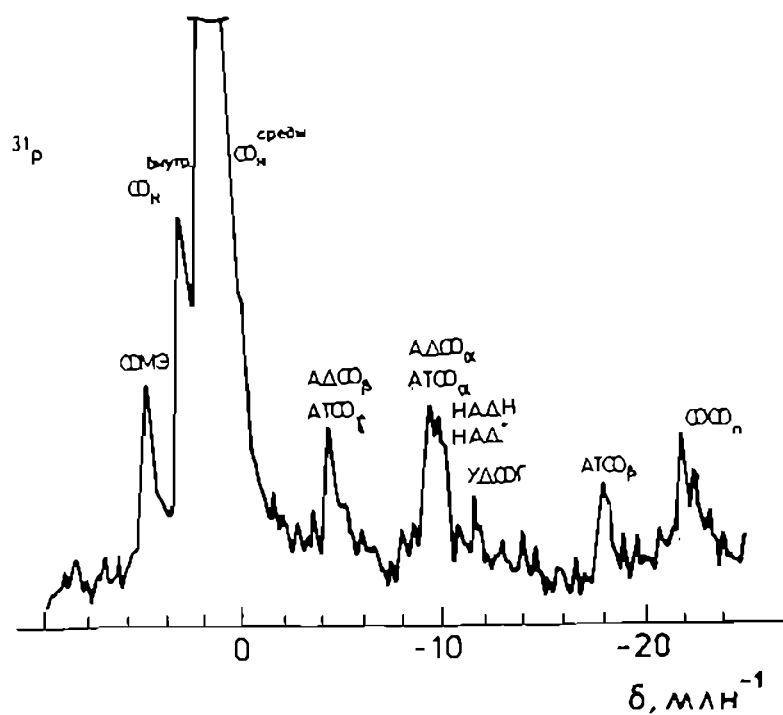


Рис. 6.5. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР аэрированных клеток *B. flavum* 22 ЛД-П в K/Na фосфатном буфере при pH среды 5,6 без добавления субстрата.

$\text{ФМЗ}$  - фосфомоноэфиры, УДФГ - уридиндифосфоглюкоза,  
 $\text{ФФ}_n$  - полифосфаты,  $\text{Ф}_n$  - неорганический фосфат.

Таблица 6.1  
Внутриклеточное значение pH у *V. flavum* по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР

pH среды	Ионофор	Аэрация	Экзогенный субстрат	pH внутр.
5,6	-	-	-	6,70
5,6	-	+	-	7,25
5,5	-	-	сахароза	6,10
5,5	-	+	сахароза	6,15
5,5	валиномиц. 3 $\mu\text{M}$	-	сахароза	7,05
5,5	валиномиц. 3 $\mu\text{M}$ + ХКФ 60 $\mu\text{M}$	+	сахароза	~ 6,0

#### 6.4. Зависимость $\Delta\text{pH}$ и $\Delta\psi$ от концентрации биомассы и от наличия в среде инкубирования ионов $\text{Na}^+$ и $\text{K}^+$

Полученные значения  $\Delta\text{pH}$  с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР у клеток без добавления субстрата – источника углерода и энергии заметно превышают данные опытов по изучению распределения  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты. Наиболее очевидное различие между условиями эксперимента в этих методиках является различие в концентрациях биомассы, которая в ампуле спектрометра ЯМР примерно на 2 порядка превышает концентрацию биомассы в клетке с мечеными  $\text{TFF}^+$  и бензойной кислотой. Мы поставили контрольный опыт по распределению  $\text{TFF}^+$  и бензойной кислоты в густой суспензии *Brevibacterium* ( $\sim \frac{1}{3}$  концентрации в опытах ЯМР) при 2 значениях pH среды в Na/K фосфатном буфере, а также отдельно Na фосфатном или K фосфатном буферах при pH среды около нейтральности (табл. 6.2). Оказалось, что клетки в суспензиях с высокой концентрацией биомассы в Na/K фосфатном буфере имеют

заниженные значения  $\Delta \psi$  и повышенные значения  $\Delta \text{pH}$ . При этом, повышение  $\Delta \text{pH}$  в концентрированной суспензии имеет место только при наличии  $\text{K}^+$  в среде. Очевидно транспорт  $\text{K}^+$  необходим для генерирования  $\Delta \text{pH}$ , как это было показано для ряда бактерий /54,135,142/. Снижение  $\Delta \psi$  в концентрированной суспензии клеток наблюдается всегда, но в присутствии  $\text{K}^+$   $\Delta \psi$ , как правило, ниже, чем в среде с  $\text{Na}^+$ .

Возрастание  $\Delta \text{pH}$  полностью не компенсирует спад  $\Delta \psi$ , поэтому  $\Delta p$  в концентрированной суспензии оказывается ниже. Снижение  $\Delta p$  трудно объяснить возможными анаэробными условиями в процессе измерения  $\Delta \psi$  и  $\Delta \text{pH}$  (см. гл. 5.4.1, 5.4.2), причина этого явления пока неясна.

Повышенное  $\Delta \text{pH}$  наблюдается не только в суспензиях клеток с большой концентрацией биомассы, а также в разбавленных суспензиях, если уменьшена буферная сила среды. Видно (табл. 6.2), что клетки *B. flavum* в концентрации 1 г сух.веса/л в среде 10 мМ К фосфатного буфера поддерживают существенно более высокое значение  $\Delta \text{pH}$ , чем клетки в среде 100 мМ К фосфатного буфера. Это позволяет высказать предположение, что на величину  $\Delta \text{pH}$  влияет не столько концентрация биомассы сама по себе, сколько отношение буферных емкостей среды и внутриклеточного пространства. При возрастании концентрации биомассы или при снижении буферной силы среды возрастает отношение "буферная емкость внутриклеточного пространства / буферная емкость среды", что влечет за собой увеличение  $\Delta \text{pH}$ .

Таким образом, у *B. flavum* нельзя говорить о строгом гомеостазе внутриклеточного pH. Поддержание  $\Delta p$  зависит от энергетических возможностей клетки: у клеток в состоянии 3



как  $pH_{\text{внутр.}}$ , так и  $\Delta\psi$  сильно зависят от  $pH$  среды, в особенности при  $pH < 5,6$ . Помимо  $pH$ , составляющие  $\Delta p$  существенно зависят от ионного состава и буферной емкости среды, а также от концентрации биомассы.

Таблица 6.2

Зависимость  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$  у *Brevibacterium flavum* 22 ЛД-П от концентрации биомассы и ионов  $K^+$  и  $Na^+$  в среде

Состав среды	$pH$ среды	Биомасса (мг/мл)	$\Delta\psi$ (мВ)	$\Delta pH$ (ед.)	
100 мМ	5,76	20	69	0,80	
K/Na фосфатный буфер	5,96	2	113	0	
	6,80	20	97	0,20	
	6,95	2	160	0	
	100 мМ	6,47	26	65	0,42
K фосфатный буфер	6,53	1	76	0	
	100 мМ	6,56	26	98	0,10
Na фосфатный буфер	6,56	1	159	0	
	10 мМ	6,70	1	139	0,73
K фосфатный буфер	10 мМ	6,66	1	167	0
	Na фосфатный буфер				

Глава 7. ПАССИВНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ  
 МЕМБРАНЫ *BREVIBACTERIUM FLAVUM*  
 ДЛЯ ПРОТОНОВ

Энергозатраты на поддержание протондвижущей силы пропорциональны величине пассивного потока протонов по градиенту  $\Delta p$  из среды в клетку, который должен компенсироваться за счет энергозависимого транспорта  $H^+$  из клетки в среду.

Для оценки пассивного потока  $H^+$  по градиенту  $\Delta p$  необходимо, кроме самой величины  $\Delta p$ , знать величину коэффициента пассивной проницаемости для  $H^+$  у плазматической мембраны *B. flavum* :  $C_{H^+}$ . Поток  $H^+$  тогда выражается как  $\Delta p \cdot C_{H^+} / 60 \text{ мВ}$ , где коэффициент  $C_{H^+}$  имеет размерность

$$\left[ \frac{\mu \text{ моль } H^+}{\text{биомасса} \cdot \text{время} \cdot \text{ед.} (\Delta p / 60 \text{ мВ})} \right] \text{ или } \left[ \frac{\mu \text{ моль } H^+}{\text{биомасса} \cdot \text{время} \cdot \text{ед.} \Delta \text{ рН}} \right].$$

7.1. Зависимость коэффициента пассивной  $H^+$   
 проницаемости мембраны от рН среды

На рис. 7.1 представлены результаты исследования зависимости  $C_{H^+}$  от рН суспензии клеток, полученные в 6 независимых сериях опытов. Каждая точка на рисунке представляет результат единичного определения. В области значений рН среды от 6 до 8  $C_{H^+}$  находится в пределах  $0,1 \div 0,5 \left[ \frac{\mu \text{ моль } H^+}{(\text{г}_{\text{сух.веса}}) \cdot \text{сек} \cdot \text{единицу } \Delta \text{ рН}} \right]$ , как сообщено ранее для *Streptococcus lactis* /158/. Однако, начиная со значения рН среды  $5,7 \div 5,6$  и ниже, до  $5,1$ , наблюдается крутое возрастание  $C_{H^+}$  почти на порядок. В работе /158/ отмечено, что такое возрастание  $C_{H^+}$  связано с диссоциацией  $H^+$ -АТФазы при кислом рН и "открыгания" канала  $F_0$  для несвязанного с синтезом АТФ потока протонов. Эффект в этом случае снимается после добавления ингибитора  $H^+$ -АТФазы ДДЖ.

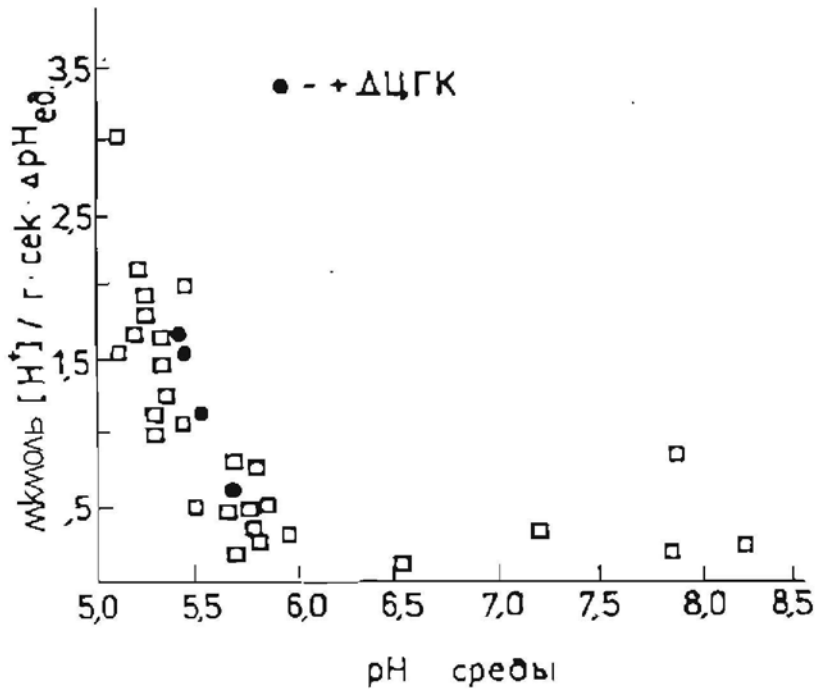


Рис. 7.1. Зависимость коэффициента пассивной  $H^+$ -проницаемости плазматической мембраны *V. flavum* 22 ЛД-II от рН среды.

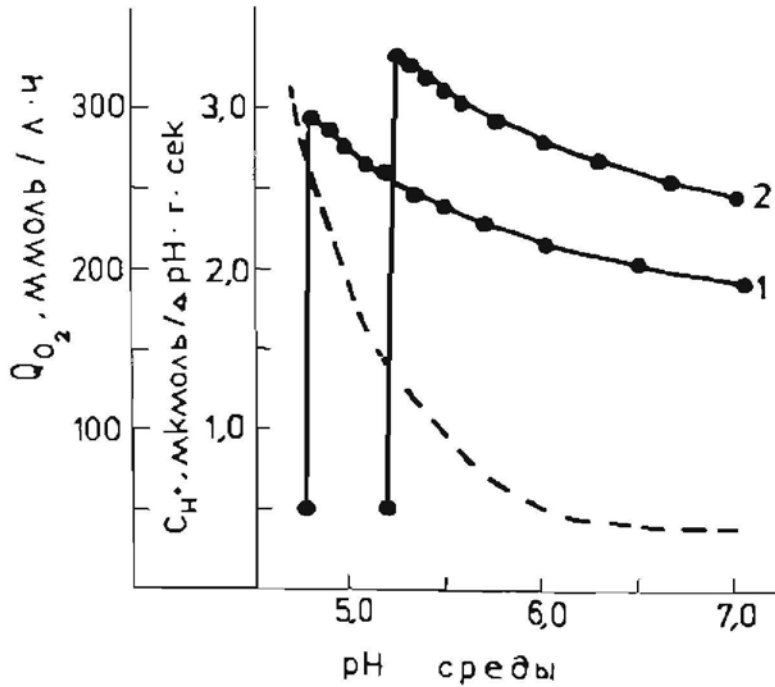


Рис. 7.2. Скорость дыхания хемостатной культуры *V. flavum* RC II5-II в состоянии 4 при разных рН среды. Источник углерода и энергии: кукурузный экстракт + сахароза (1), то же + ацетат (2). ----- - зависимость  $C_{H^+}$  от рН среды.

В нашем случае добавление ДЦК вызвало не снижение, а даже некоторое увеличение  $C_{H^+}$  (рис. 7.1.).

## 7.2. Влияние возрастания коэффициента пассивной $H^+$ проницаемости мембраны на $\Delta p$ , внутриклеточную концентрацию АТФ и скорость дыхания

Независимо от физических причин изменения  $H^+$ -проницаемости мембраны возрастание  $C_{H^+}$  интересно с точки зрения своих энергетических последствий. *a priori* не очевидно, насколько правильно показатель  $C_{H^+}$ , который по методике Митчелла измерен для искусственно наведенного  $\Delta pH$ , отражает реальную пассивную проницаемость протонов, участвующих в цикле "дыхательная цепь – потребители протондвижущей силы".

Адекватность  $C_{H^+}$  подтверждают 3 группы фактов. Во-первых, описанный выше эффект коллапса  $\Delta \psi$  и снижения внутриклеточного pH при pH среды  $< 5,6$  (гл. 6.2.) совпадает с резким возрастанием  $C_{H^+}$  при том же значении pH. Это говорит в пользу соответствия измеренного нами возрастания  $C_{H^+}$  реальному повышению трансмембранной проводимости для протонов, участвующих в образовании измеряемого  $\Delta p$ . Во-вторых, косвенным свидетельством о соответствии наблюдаемых изменений  $C_{H^+}$  реальным изменениям мембранной  $H^+$ -проводимости служит  $C_{H^+}$ -зависимость внутриклеточного уровня АТФ.

Для качественной оценки влияния изменений  $C_{H^+}$  на энергетический метаболизм мы измеряли динамику внутриклеточной концентрации АТФ у *V. flavum* в процессе голодания в среде с 200 мМ KCl. Для интерпретации данных можно предложить сле-

Таблица 7.1

Внутриклеточная концентрация АТФ [нмоль/мг] у  
*Brevibacterium flavum* 22 ЛД-II во время голодания  
 в 200 мМ КСI при различных значениях рН среды

Время голодания (ч.)	рН среды				
	6,0 + 0,3 мМ ЖФ	5,5-5,6	6,3-6,7	6,9-7,1	7,3-7,5
1	0,48	2,65	2,12	1,98	1,16
3	0,62	0,85	1,63	1,20	1,38
5	1,00	0,83	2,06	1,88	1,77

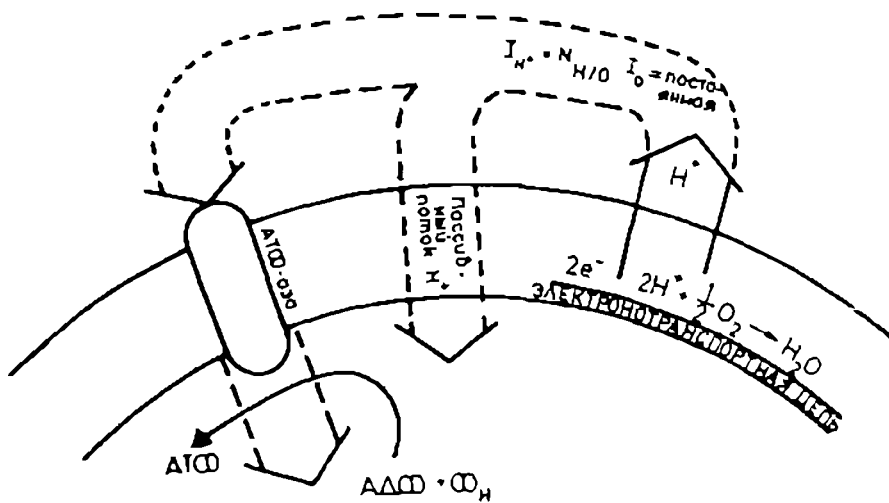


Рис. 7.3. Схема генерирования и потребления протон-движущей силы у голодающих клеток в состоянии 3.

дующую схему (рис. 7.3.) : у клеток в среде без субстрата, которые при этом не должны поддерживать большие градиенты ионов ( $K^+$ ,  $Na^+$ , ...) протоны по градиенту протондвижущей силы возвращаются обратно по двум путям - через  $H^+$ -АТФазу с образованием АТФ и как пассивный поток через липидный бислой плазматической мембраны. Если увеличить один из этих потоков, например, пассивный поток  $H^+$ , увеличение  $C_{H^+}$ , другой поток, соответственно, снижается (так как дыхание, по определению, постоянно и является лимитирующим звеном). Если далее принять, что внутриклеточный уровень АТФ в данном случае пропорционален его же скорости синтеза, то внутриклеточная концентрация АТФ в первом приближении будет обратно пропорциональна  $C_{H^+}$ .

В таблице 7.1 отражены данные об изменении внутриклеточной концентрации АТФ в процессе голодания клеток. Видно, что через 3 часа уровень АТФ у клеток в среде с  $pH = 5,5$  достоверно ниже, чем у клеток при более высоких  $pH$  среды, что говорит об энергетической значимости измеренного  $C_{H^+}$ . Данный вариант близок к варианту клеток с  $0,3 \mu M$  разбавителем ЖФ, который уже с начала опыта значительно отличается от остальных образцов. Наиболее высокий уровень АТФ наблюдается при  $pH$  среды в пределах  $6,3-6,7$ , что соответствует минимальному  $C_{H^+}$  (рис. 7.1.).

В-третьих, в работе с прототрофным ревертантом *B. flavum* РС-115-П нами показано, что при снижении  $pH$  от нейтрального до значений около  $4,8 + 5,0$  (на среде с сахарозой) скорость дыхания хемотратной культуры возрастает в хорошем соответствии с возрастанием  $C_{H^+}$  (рис. 7.2.), а ниже критического  $pH$  наблюдается резкое ингибирование дыхания. Если

культура находится в состоянии дыхательного контроля на среде в присутствии ацетата, то данный эффект выражен еще сильнее, а ингибирование дыхания наступает уже при pH около 5,4. Очевидно, ацетат, диффундируя в клетку в форме недиссоциированной молекулы, сильно увеличивает приток  $H^+$  из среды в клетку, тем самым как бы увеличивая протонную проводимость мембраны и шунтируя  $\Delta pH$ .

Таким образом, пассивная проницаемость плазматической мембраны *S. flavus* зависит от pH среды. При  $pH < 5,6$  коэффициент пассивной проницаемости  $S_{H^+}$  резко возрастает. Измеренные значения  $S_{H^+}$ , по-видимому, отражают реальную проницаемость для  $H^+$ , участвующих в образовании  $\Delta p$ , что доказывалось влиянием изменений  $S_{H^+}$  на величину  $\Delta p$ , внутриклеточную концентрацию АТФ и скорость дыхания.

Глава 8.  $\Delta pNa^+$  И ПАССИВНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ  
ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ *BREVIBACTERIUM*  
*FLAVUM* ДЛЯ  $Na^+$

Для оценки пассивного потока  $Na^+$  по градиенту  $\Delta \bar{\mu}_{Na^+}$ , нам (по аналогии с оценкой пассивного потока  $H^+$ ) необходимо знать величины  $\Delta \psi$ ,  $\Delta pNa^+$  и коэффициент пассивной  $Na^+$  - проницаемости мембраны -  $C_{Na^+}$ .

8.1. Трансмембранный концентрационный градиент  $Na^+$

$^{23}Na$ -ЯМР спектроскопия является наиболее подходящим методом измерения трансмембранного  $\Delta pNa^+$ . Применяя непроницающие через мембрану реагенты сдвига, которые изменяют положение сигнала внеклеточного  $Na^+$  в спектре, мы можем исследовать динамику  $\Delta pNa^+$  без отделения клеток от среды (рис. 8.1).

Внутриклеточная концентрация спектроскопически видимого  $Na^+$  оказывается в пределах 1,6–4,9 мМ (табл. 8.1.) при концентрации  $Na^+$  в среде от 30 до 80 мМ и pH среды  $\sim 6,0 \div 6,5$ .

Таблица 8.1

Величины  $\Delta pNa^+$  и коэффициента  $Na^+$ -проводимости  $Na^+/H^+$  антипортера ( $L_{Na^+}$ ) у *Brevibacterium flavum*

$[Na^+]_{ср-внтр.}$ (мм) (мм)	$[Na^+]_{внтр.}$ (мм) (видимый)	Спектроскоп. видимость $Na^+$ внутр.	$\Delta pNa^+$ нач.	$\Delta pNa^+$ конечн.	$L_{Na^+} \left[ \frac{\mu\text{моль } Na^+}{\text{г} \cdot \text{сек} \cdot \Delta pNa^+} \right]$
31	1,6	15 %	1,3	0,7	0,28
60	2,5	28 %	1,4	0,6	0,90
76	4,9	25 %	1,2	0,6	1,00

$\Delta pNa^+$  во всем рассмотренном интервале концентраций  $Na^+$  среды находится в пределах от 1,2 до 1,4 единиц. Такая величина



$\Delta p_{Na^+}$  характерна для клеток в фосфатном буфере, без добавления экзогенных субстратов, а анаэробных условиях и при этом остается стабильной в течение времени порядка часа.

### 8.2. Диссипация $\Delta p_{Na^+}$ , вызванная деполяризацией мембран: электрогенный $H^+/Na^+$ антипорт

Добавление валиномицина (3  $\mu$ M конечн. конц.) к суспензии клеток в K/Na или K фосфатном буфере вызывает постепенное возрастание внутриклеточной концентрации  $Na^+$  (рис. 8.1.). Известно, что в среде аналогичного состава валиномицин вызывает деполяризацию  $\Delta \Psi$  (табл. 8.2). Следовательно, поток  $Na^+$  по градиенту  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$  появляется после снижения этого градиента (путем снижения  $\Delta \Psi$ ). Такое явление невозможно объяснить исходя из предположения, что наблюдаемый поток  $Na^+$  является просто пассивным потоком по градиенту  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$ :  $J_{Na^+} = C_{Na^+} \cdot \Delta \tilde{\mu}_{Na^+} / F$ . Снижение термодинамической силы, естественно, должно вызвать уменьшение, а не увеличение соответствующего потока. Исключается также прямое влияние валиномицина на  $Na^+$ -проницаемость мембраны, так как показано, что в бескальевой среде, содержащей ионы  $Na^+$  в высокой концентрации, валиномицин не влияет на величину  $\Delta \Psi$  (табл. 8.2).

Более вероятным нам кажется предположение о наличии у *V. f. flavus* электрогенного  $H^+/Na^+$  антипортера. В таком случае силой, вызывающей поток  $Na^+$  является не просто  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+} / F$ , а комбинация термодинамических сил:  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+} / F - N_{H^+/Na^+} \cdot \Delta p$  [258]. В равновесии, когда  $J_{Na^+} = 0$ ,

$$\Delta \tilde{\mu}_{Na^+} / F = N_{H^+/Na^+} \cdot \Delta p \quad (8.1)$$

где  $N_{H^+/Na^+}$  - стехиометрическое отношение  $H^+/Na^+$ . Если

$N_{H^+/Na^+} > 1$ , то в равновесии  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+} / F > \Delta p$ , а при снятии валиномицином общей компоненты для обеих сил -  $\Delta \Psi$ , отношение

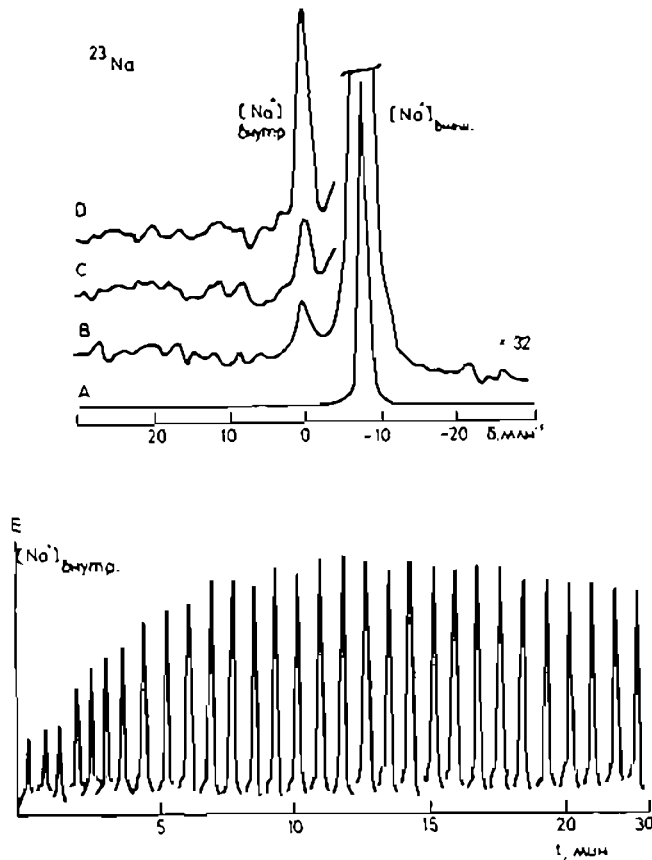


Рис. 8.1. Спектры  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР суспензии *V. flavum* 22 ЛД-П в присутствии 6 мМ  $\text{Dy}(\text{P}_3\text{O}_{10})_2^{7-}$ . А - сигнал  $\text{Na}^+$  среды; В - то же, но интенсивность спектра умножена на 32. При  $\delta = 0$  виден сигнал внутриклеточного  $\text{Na}^+$ ; С - спектр через 1 мин. после добавления валиномицина; Д - спектр через 10 мин. после добавления валиномицина; Е - кинетика интенсивности сигнала внутриклеточного  $\text{Na}^+$  после добавления валиномицина.

$(\Delta \tilde{\mu}_{\text{Na}}/F)/\Delta p$  возрастает. В результате возникает движущая сила и появляются потоки  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$  через предполагаемый антипортер, ведущие к снижению  $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Na}}/F$  и возрастанию  $\Delta p$  до нового состояния равновесия. В таблице 8.1 приведены данные о подобном сни-

Таблица 8.2

Величина  $\Delta\psi$  у отмытых клеток *B. flavum* 22 ЛД-П в 0,1 М ТРИС буфере при рН среды 7,2 в зависимости от присутствия в среде ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  и от добавления валиномицина

Добавление 5 $\mu\text{M}$ вали- номицина	Среда инкубирования		
	ТРИС буфер	ТРИС буфер + 130 мМ $\text{KCl}$	ТРИС буфер + 130 мМ $\text{NaCl}$
-	111 мВ	100 мВ	109 мВ
+	107 мВ	0* мВ	107 мВ

\* Допускали, что в данном варианте мембрана полностью деполяризована и наблюдаемое накопление  $\text{TFF}^+$  в клетках использовали в расчетах  $\Delta\psi$  в качестве контроля на специфическое связывание катиона.

жении градиента  $\text{Na}^+$  примерно на половину, после деполяризации мембраны.

Из (8.1) ясно, что в состоянии равновесия по соотношению термодинамических сил можно судить о стехиометрии  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  антипортера:  $N_{\text{H}^+/\text{Na}^+} = (\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F)/\Delta\mu$  [216]. Согласно данным о  $\Delta\psi$  и  $\Delta\text{pH}$  (для густых суспензий при рН  $\sim 6,5$ ; табл. 6.2) и о  $\Delta\text{pNa}^+$  (табл. 8.1), а также предполагая относительную близость антипортера к равновесию,  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  стехиометрию можно оценить как близкую к 2. Следовательно, предполагаемый антипортер является электрогенным: входжение  $\text{Na}^+$  в клетку вызывает возрастание  $\Delta\psi$ .

По кинетике изменения интенсивности ЯМР-сигналов внутриклеточного и внеклеточного  $\text{Na}^+$  после деполяризации мембраны рассчитан коэффициент  $L_{\text{Na}^+}$ , характеризующий  $\text{Na}^+$ -проводимость предполагаемого антипортера (табл. 8.1).  $L_{\text{Na}^+}$  оказался в пределах от  $\sim 0,3$  до  $1,0 \mu\text{моль Na}^+/\text{г}\cdot\text{сек}\cdot\Delta\text{pNa}^+$ , т.е. по по-

рядку сравнимый с  $C_{H^+}$ . При увеличении  $[Na^+]$  в среде  $L_{Na^+}$  проявляет тенденцию к возрастанию.

Необходимо отметить некоторые допущения при расчете значений  $L_{Na^+}$ , вытекающие из методики, описанной в гл. 5.5.2. Во-первых, принималось, что внутриклеточная буферная емкость для  $Na^+$  пропорциональна отношению [общее содержание внутриклеточного  $Na^+$  / внутриклеточное содержание спектроскопически видимого  $Na^+$ ], и что данное отношение не зависит от небольших изменений внутриклеточной концентрации  $Na^+$ . Во-вторых, как  $V_{Na^+}^{ср}$ , так и  $V_{Na^+}^{внутр.}$  меняется при изменении, соответственно, вне- и внутриклеточной концентрации  $Na^+$ . В расчетах пользовались усредненными значениями этих параметров.

Несмотря на такие допущения получено удовлетворительное соответствие между теоретически рассчитанными кинетическими кривыми и экспериментальными данными по диссипации  $\Delta pNa^+$  (рис. 8.2).

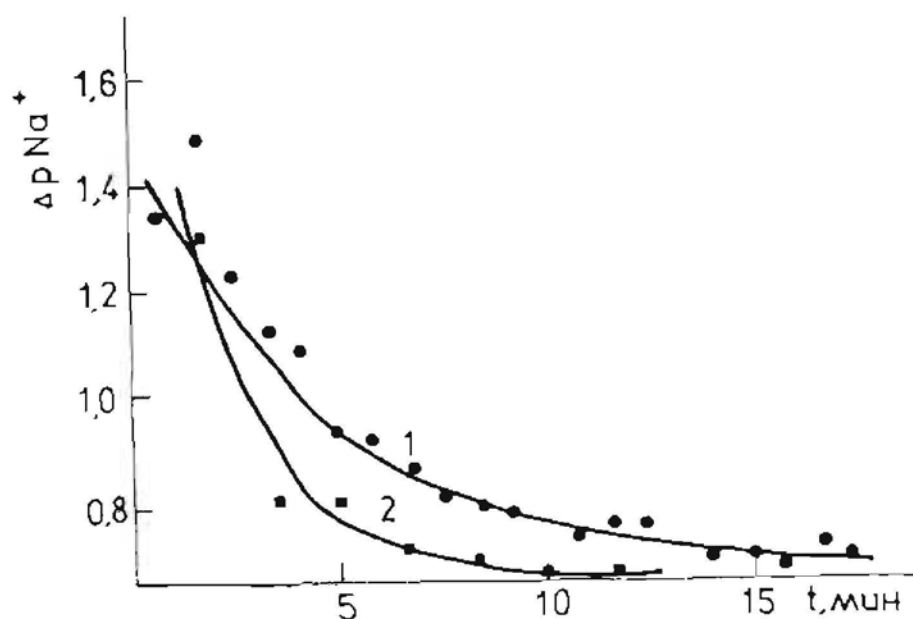


Рис. 8.2. Кинетика диссипации  $\Delta pNa^+$  после добавления валиномицина. 1 -  $[Na^+]_{ср} = 31$  мМ, 2 -  $[Na^+]_{ср} = 76$  мМ.

### 8.3. Влияние концентрации $\text{Na}^+$ на значение коэффициента пассивной $\text{H}^+$ -проницаемости мембраны

При наличии в мембране активного  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  антипортера мы должны обнаружить разницу в  $\text{H}^+$ -проницаемости мембраны в зависимости от присутствия в системе ионов  $\text{Na}^+$ . Факт  $\text{Na}^+$ -зависимости величины  $C_{\text{H}^+}$  служил указанием на наличие  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  антипортера у бактерий в нескольких работах [144, 166, 244].

Мы сравнивали значения  $C_{\text{H}^+}$  у *B. flavum* в среде, содержащей  $\text{Na}^+$  в концентрации 50 мМ (было добавлено 50 мМ  $\text{NaSCN}$ ) и в среде без  $\text{Na}^+$  (добавлено  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) при рН среды в пределах 5,7 + 5,9 (табл. 8.3). Такой интервал рН выбран потому, что при рН среды < 6,0 легче достигались стационарные значения рН и не требовалось длительного установления нужного рН среды добавлениями щелочи.

Таблица 8.3

$C_{\text{H}^+}$  у *Brevibacterium flavum* 22-ДД-П в зависимости от наличия в среде инкубирования  $\text{Na}^+$

рН среды	$\text{Na}^+$ (50 мМ)	$C_{\text{H}^+}$ $\left[ \frac{\mu\text{моль } \text{H}^+}{\text{г} \cdot \text{сек} \cdot \Delta \text{рН}} \right]$
5,7 - 5,9	+	$0,61 \pm 0,24$ (6) <sup>х)</sup>
5,7 - 5,9	-	$0,31 \pm 0,08$ (7)

х) в скобках - число повторностей

Оказалось, что в среде с 50 мМ  $\text{Na}^+$   $C_{\text{H}^+}$  увеличен примерно на 0,3  $\mu\text{моль } \text{H}^+/\text{г} \cdot \text{сек} \cdot \Delta \text{рН}$ . Это меньше, чем можно было ожидать, учитывая полученные величины  $L_{\text{Na}^+}$ . Однако, так как нельзя исключить присутствия некоторого количества  $\text{Na}^+$  в клетках "без-

натриевого" варианта, и, тем самым, некоторой активности  $H^+/Na^+$  антипортера, то разницу значений  $C_{H^+}$  между вариантами следует считать заниженной.

Прохождение  $H^+$  через  $H^+/Na^+$  антипортер нельзя причислять к пассивному потоку  $H^+$ , приводящему к непродуктивным энергозатратам, так как в данном случае энергия  $\Delta p$  переходит в энергию  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}/F$ . В случаях, когда при определении  $C_{H^+}$  в среде инкубирования добавляли  $NaSCN$ , полученные значения коэффициента включали также компоненту антипортера. Поэтому, для того, чтобы использовать эти значения  $C_{H^+}$  в расчетах пассивного потока  $H^+$ , необходима соответствующая коррекция.

#### 8.4. Оценка пассивной проницаемости мембраны для $Na^+$

Как уже отмечалось, расчет энергозатрат на поддержание  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}/F$  предполагает знание неспецифической, не связанной с антипортером компоненты  $Na^+$  проницаемости мембраны.

Устойчивость трансмембранного градиента  $Na^+$  у клеток *V. flavus* в условиях анаэробноза и в отсутствии экзогенного субстрата может быть объяснена двумя альтернативными предположениями: низким значением пассивной проницаемости мембраны для  $Na^+$ , или же, при достаточно высокой пассивной  $Na^+$ -проницаемости мембраны, отсутствием в среде подвижного противоиона, способного обеспечить электронейтральность пассивного трансмембранного потока  $Na^+$  по градиенту. Второе предположение маловероятно, так как в этом случае у клеток *V. flavus* на мембране должен поддерживаться диффузионный потенциал  $Na^+$ , тормозящий проникновение этого иона в клетку и имеющий обратный, по

сравнению с обычным  $\Delta\psi$ , знак ("+" внутри). Экспериментально это не подтверждается (гл. 6.4; табл. 8.2). Очевидно, необходимо допустить, что основная часть ионов  $\text{Na}^+$  пересекает мембрану через предполагаемый антипортер, т.е. что  $L_{\text{Na}^+} \gg C_{\text{Na}^+}$ .

Зная  $L_{\text{Na}^+}$  и соотношение градиентов  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F$  и  $\Delta p$  в стационарном состоянии антипортера (при  $J_{\text{Na}^+} = 0$ ), можно оценить порядок величины  $C_{\text{Na}^+}$ . С позиций линейной термодинамики необратимых процессов [217] антипортер можно описать следующей системой уравнений:

$$J_{\text{H}^+} = L_{11} \cdot \Delta p + L_{12} \cdot \Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F \quad (8.2)$$

$$J_{\text{Na}^+} = L_{21} \cdot \Delta p + L_{22} \cdot \Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F \quad (8.3)$$

где  $J_{\text{H}^+}$  - поток протонов через антипортер,  $J_{\text{Na}^+}$  - трансмембранный брутто-поток  $\text{Na}^+$  через мембрану, включающий в себя также пассивную составляющую, а  $L_{11}$ ,  $L_{12}$ ,  $L_{21}$  и  $L_{22}$  - феноменологические коэффициенты. Известно, что в стационарном состоянии в такой системе соотношение сил равно соотношению феноменологических коэффициентов  $L_{12}$  и  $L_{22}$  [217]:

$$\left(\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F\right)/\Delta p = L_{12}/L_{22} \quad (8.4)$$

Коэффициенты  $L_{12}$  и  $L_{22}$  нетрудно интерпретировать механически: по определению  $L_{12}$ , описывающий зависимость потока  $\text{H}^+$  через антипортер от градиента  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F$ , равен  $2 L_{\text{Na}^+}$  (при стехиометрии  $2 \text{H}^+/\text{Na}^+$ ), а  $L_{22} = L_{\text{Na}^+} + C_{\text{Na}^+}$  (при допущении, что нет других потоков  $\text{Na}^+$ , например,  $\text{Na}^+$  / субстратного симпорта). В результате получается уравнение:

$$\left(\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F\right)/\Delta p = 2L_{\text{Na}^+}/(L_{\text{Na}^+} + C_{\text{Na}^+}) \quad (8.5).$$

Очевидно, что при  $C_{\text{Na}^+} = 0$  антипортер находится в состоянии равновесия и отношение  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}/F$  к  $\Delta p$  равно 2:1.

Рассмотрим случай, когда концентрация  $\text{Na}^+$  в среде низка ( $\leq 30$  мМ) и значение  $L_{\text{Na}^+}$  близко к 0,3  $\mu\text{моль Na}^+ / \text{г} \cdot \text{сек} \cdot \Delta p\text{Na}^+$ . В табл. 6.2 приведены значения  $\Delta\psi$  и  $\Delta p\text{H}$  по данным распределения  $^3\text{H-TTPP}^+$  и  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты у клеток в 100 мМ К фосфатном буфере при концентрации биомассы 26 мг/мл. В этих условиях значение  $\Delta p$  примерно 90 мВ. Соответственно,  $\Delta p\text{Na}^+ = 1,3$  ед. (табл. 8.1), а  $\Delta\psi_{\text{Na}^+}/F$  - около 145 мВ. Так как плотность биомассы в ампуле ЯМР-спектрометра несколько выше, чем в экспериментах с  $^3\text{H-TTPP}^+$  и  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислотой, а клетки находятся в состоянии анаэробноза, то истинное значение  $\Delta p$ , вероятно, несколько меньше 90 мВ (тогда по выражению (8.5) мы фактически оцениваем наибольшее возможное значение  $C_{\text{Na}^+}$ ).

Подсчитав численное значение этого коэффициента, мы получаем, что  $C_{\text{Na}^+} < 0,07 \mu\text{моль Na}^+ / \text{г} \cdot \text{сек} \cdot \Delta p\text{Na}^+$ , т.е.  $L_{\text{Na}^+}$  превосходит значение  $C_{\text{Na}^+}$  по меньшей мере на порядок. Очевидно также, что пассивная  $\text{Na}^+$ -проницаемость мембраны в *flavum* ниже, чем пассивная проницаемость для  $\text{H}^+$  (см. гл. 7).



## Глава 9. СТЕХИОМЕТРИЯ $H^+/O$ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ *PREVIBACTERIUM FLAVUM*

Приведенные в главах 6-8 сведения о трансмембранных электрохимических градиентах и значениях пассивной проницаемости  $H^+$  и  $Na^+$  позволяют рассчитать трансмембранные пассивные потоки этих ионов. Чтобы оценить энергию на поддержание градиентов, необходимо дополнительно знать "энергетический эквивалент" пассивных потоков - количество метаболической энергии, расходуемой на обратный выброс в среду проникающих в клетку путем пассивной диффузии ионов  $H^+$  или  $Na^+$ . Как уже отмечалось в гл. I, мерой расхода метаболической энергии в аэробных условиях может служить потребленный кислород, а "энергетический эквивалент" в таком случае - количество потребленного кислорода на моль транспортируемого из клетки в среду иона, т.е. стехиометрия  $O/H^+$  дыхательной цепи. Традиционно в биоэнергетике используется обратный показатель - количество транспортируемых в среду ионов  $H^+$  на атом потребленного кислорода, т.е. стехиометрическое отношение  $H^+/O$  дыхательной цепи. Выяснение точного значения  $H^+/O$  важно при обсуждении термодинамических аспектов, а также деталей предполагаемых механизмов транспорта  $H^+$  в рамках хемиосмотической теории (гл. I). Поэтому в настоящей работе исследуется стехиометрия  $H^+/O$ , так как результаты в такой форме более привычны и легче сравнимы с данными других работ. Зная значение  $H^+/O$ , просто получить нужный нам "энергетический эквивалент"  $O/H^+ = 1/H^+/O$ .

В настоящей главе изложены некоторые модификации и усовершенствования методов измерения  $H^+/O$ , а также приводятся результаты определения этого параметра с помощью нескольких методов.

### 9.1. Метод определения стехиометрии $H^+/O$ по импульсному возмущению стационарного состояния хемостатной культуры добавлением кислоты

Классический подход к измерению  $H^+/O$  и некоторые его модификации, критически рассмотренные в гл. 4, невозможно применять для контроля  $H^+/O$  непосредственно в растущей хемостатной культуре бактерий без отбирания проб и дальнейших манипуляций с клетками. Работа в различных модельных средах, в свою очередь, затрудняет отнесение полученных результатов к исходному физиологическому состоянию клеток в хемостате. Нами разработана методика расчета  $H^+/O$  по параметрам, измеряемым непосредственно в ферментаторе, которая основана на анализе кинетик подщелачивания среды и кратковременного увеличения скорости дыхания после добавления кислоты к хемостатной культуре *S. flavum* в состоянии 4.

#### 9.1.1. Влияние добавок кислоты и щелочи на дыхание культуры

Добавление кислоты ( $H_2SO_4$  или  $HCl$ , IV растворов) к хемостатной культуре *S. flavum* в состояние 4 вызывает временное возрастание скорости дыхания, тогда как добавление щелочи (IV  $NaOH$ ) - временное снижение. На рис. 9.1 представлены типичные ответные реакции на импульсы кислоты и щелочи в реальном масштабе времени. Видно, что максимальное возрастание (снижение) скорости дыхания достигается практически сразу после добавления кислоты (щелочи). После этого наблюдается приблизительно линейное снижение (возрастание)  $J_{O_2}$  до исходного значения в течение 5+9 мин. Добавки кислоты или щелочи делались с расчета, чтобы рН среды не изменялся более, чем на 0,2±0,3 единицы,

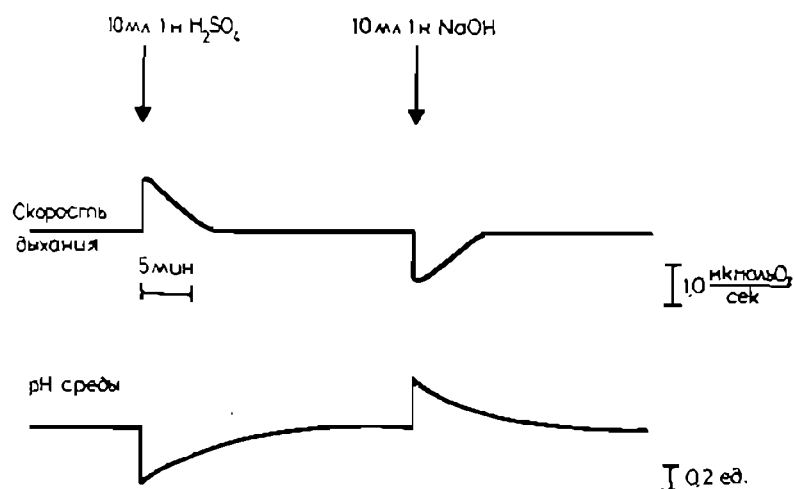


Рис. 9.1. Кинетика изменения рН среды и скорости дыхания хе-  
мостатной культуры *V. flavum* RC-II5 в состоянии 4  
после добавления кислоты или щелочи. Данные полу-  
чены в объеме 1,5 л при концентрации биомассы  
20 г/л и  $D = 0,15 \text{ час}^{-1}$ .

т.к. в противном случае буферную емкость среды нельзя считать  
постоянной во всем интервале изменения рН. рН среды релаксиро-  
вал до нового стационарного значения за 12+15 мин.

Система измерения скорости дыхания в ферментаторе (гл.  
5.2.3) имеет некоторое характерное время запаздывания, поэто-  
му наступление экстремального значения скорости дыхания сразу  
после импульса кислоты (щелочи) определяли по показаниям  $pO_2$   
электрода: допускалось, что максимальной скорости изменения  
 $pO_2$  среды соответствует экстремум  $J_{O_2}$ . Как правило, максимум  
 $J_{O_2}$  наступал в первые 15 сек. после добавления кислоты и в

расчетах принималось, что  $J_{O_2} = \max.$  при  $t = 0$ , и линейно снижается в течение времени.

Для проявления состояния 4 (дыхательного контроля) необходимо, чтобы хемостатная культура находилась в состоянии избытка С-субстрата в среде. Избыток С-субстрата легче наступает и эффект дыхательного контроля лучше выражен у ауксотрофного по гомосерину, лизинпродуцирующего мутанта *B. flavum* RC-115, который поэтому в данной серии опытов использовали вместо прототрофного штамма.

### 9.1.2. Модель кинетики изменения pH среды после импульса кислоты

Очевидно, что медленное защелачивание среды после добавления кислоты является результатом нескольких электрически скомпенсированных потоков  $H^+$ , где противоионами для  $H^+$  могут оказаться как анионы, входящие в клетку, так и выходящие из клетки катионы (например,  $K^+$ ). Допуская существование линейной зависимости между  $\Delta pH$  и соответствующими потоками /50/ можно написать уравнение скорости диссипации наведенного импульсом кислоты дополнительного градиента pH на мембране ( $\delta pH$ ) в условиях, когда нет возрастания дыхания:

$$\frac{d(\delta pH)}{dt} = -L \cdot (\delta pH - \delta pX) \cdot \frac{1}{V_H} \quad (9.1),$$

где  $\delta pX$  - градиент противоиона,  $\frac{I}{V_H} = \frac{I}{V_{H^+ \text{ внутр.}}} + \frac{I}{V_{H^+ \text{ среды}}}$

( $V_{H^+ \text{ внутр.}}$  и  $V_{H^+ \text{ среды}}$  - соответственно, внутри- и внеклеточные буферные емкости для  $H^+$ ), а  $L$  - общая  $H^+$ -проводимость мембраны, представляющая сумму коэффициентов  $H^+$ -проводимос-

отдельных электронейтральных  $H^+$  потоков. Скорость возрастания градиента противоиона(ов) описывается аналогичным выражением:

$$\frac{d(\delta pX)}{dt} = L(\delta pH - \delta pX) \cdot \frac{1}{B_x} \quad (9.2).$$

Возрастание скорости дыхания  $\delta J_o$  вызывает нарушение баланса трансмембранного  $H^+$ -цикла; в среду выбрасываются больше  $H^+$ , что выражается в подкислении среды (возрастании  $\delta pH$ ):

$$\frac{d(\delta pH)}{dt} = \delta J_o \cdot N \cdot \frac{1}{B_H} \quad (9.3),$$

где  $N$  - стехиометрия  $H^+/O$ . Суммируя (9.1) и (9.3), получаем уравнение кинетики изменения  $\delta pH$  для культуры в состоянии 4:

$$\frac{d(\delta pH)}{dt} = \left\{ -L(\delta pH - \delta pX) + \delta J_o \cdot N \right\} \cdot \frac{1}{B_H} \quad (9.4).$$

Систему из уравнений (9.2) и (9.4) можно решить относительно  $\delta pH$ :

$$\delta pH = \exp(-A) \cdot \left\{ \delta pH^0 + \frac{N}{B_H} \cdot \int_{t=0}^t (\delta J_o + \frac{L}{B_x} \cdot \int_{t=0}^t J_o \cdot dt) \cdot \exp(A) \cdot dt \right\} \quad (9.5),$$

где  $A = L \cdot (1/B_H + 1/B_x) \cdot t$ ,  $\delta pH^0 = \delta pH$  при  $t = 0$ . Имея функцию  $\delta pH = f(t)$ , легко рассчитать значение pH среды в любой момент времени:

$$pH_{\text{среды}} = pH_{\text{среды}}^0 + (\delta pH^0 - \delta pH) / (1 + V_{\text{среды}}^{H^+} / V_{\text{внутр.}}^{H^+}) \quad (9.6),$$

где  $pH_{\text{среды}}^0 = pH_{\text{среды}}$  при  $t = 0$ .

На рис. 9.2 представлены результаты теоретического расчета кинетических кривых подщелачивания среды после импульса кислоты при различных допускаемых значениях  $N$ ,  $L$  и отношения  $V_x/V_H$  по уравнения (9.5) и (9.6). Видно, что дыхание вызывает некоторую задержку подщелачивания среды, тем более значитель-

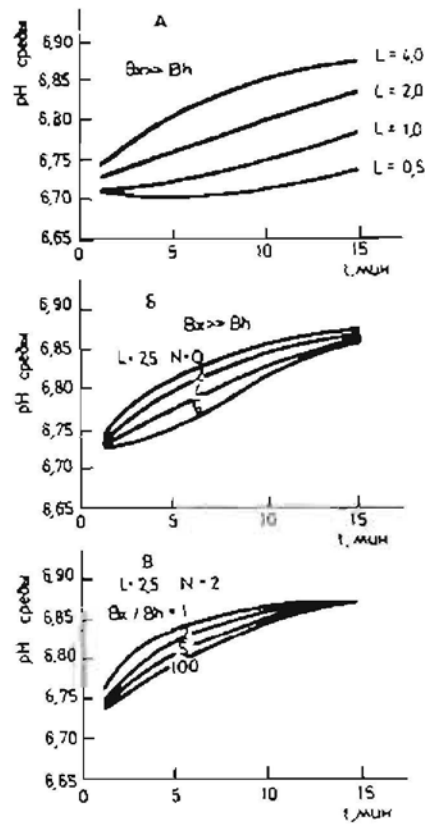


Рис. 9.2. Теоретический расчет кинетики pH среды после добавления кислоты по уравнению (9.6) при различных значениях: А -  $L$  ( $N = 2$ ), Б -  $N$ , В -  $B_x/B_h$ .

ную, чем выше  $N$ . При таком исследовании решений в уравнения ставились реальные, экспериментально полученные значения

$\delta J_0 = f(t)$ ,  $\delta pH^0$ ,  $pH^0_{\text{среды}}$  и  $B_H$ . Можно сделать заключение, что решения в достаточной мере зависят от  $N$ , т.е. что оценка  $N$  по кинетическим данным в принципе возможна.

### 9.1.3. Результаты расчетов значений $H^+/O$

Наблюдаемые изменения рН среды описывались уравнениями (9.5) и (9.6), подбирая подходящие значения  $L$ ,  $N$  и  $V_x$ . Подборку осуществляли эмпирически с помощью компьютерной программы перебора значений этих параметров и оценки соответствия полученных решений экспериментальной кинетике методом наименьших квадратов. Значение  $N$  по ходу перебора последовательно изменялось с шагом 0,5, значение  $L$  - с шагом 0,25  $\mu$  моль  $H^+$ /г.сек.  $\Delta$  рН, а  $V_x$  - так, чтобы отношение  $V_x/V_H$  менялось с шагом 0,5.

Оказалось, что критерий минимума суммы квадратов отклонений экспериментальных значений рН от теоретических (при указанных размерах шагов перебора параметров) одинаково хорошо соответствуют несколько комбинаций  $N$ ,  $L$  и  $V_x/V_H$  (табл. 9.1). Математическая обработка данных одного импульса позволяет локализовать  $N$  с неопределенностью примерно 2 единиц. В таблице 9.1 приведены результаты математической обработки данных от 3 импульсов кислоты с одного процесса хеостатного культивирования бактерий. Видно, что для каждого импульса характерен свой интервал подходящих значений параметров. Однако значения  $N$  около 3,5-4,0 подходят для всех 3 импульсов. Можно полагать, что один из путей повышения "разрешающей способности" метода кроется в нахождении способов независимо измерения  $L$  и/или  $V_x$ .

С целью сравнения,  $H^+/O$  стехиометрию у *B. flavum* определяли параллельно двумя другими методами: классическим методом Митчелла (гл. 5.3.3) и методом сравнения стационарной скорости дыхания с величиной трансмембранного потока  $H^+$  в процессе титрования суспензии клеток разбавителем.

Таблица 9.1

Значения параметров  $L$ ,  $V_x/V_H$  и  $N$ , соответствующие наблюдаемым кинетикам подщелачивания среды после добавления кислоты к хемостатной культуре

№ опыта <sup>ж)</sup>	$L$	$V_x/V_H$	$N$
1	3,75	2,0	4,0
	4,00	2,5	4,0
	4,75	3,0	5,5
	5,00	3,5	5,5
	5,25	4,0	6,0
2	1,75	1,0	2,5
	2,00	1,0	4,0
	2,25	1,0	5,0
	2,50	1,5	4,5
3	3,00	1,5	2,5
	3,75	2,0	3,5
	3,75	3,0	3,0

ж) Представлены данные расчетов 3 импульсных экспериментов с одной хемостатной культурой *Brevibacterium flavum* RC-I $\bar{1}$ 5



9.2. Величина  $H^+/O$ , определенная  
по методике Митчелла

Этим методом исследованы  $H^+/O$  у клеток прототрофного штамма в зависимости от наличия экзогенного субстрата и у клеток ауксотрофного штамма R C-II5, потребляющих эндогенный субстрат. Данные представлены в табл. 9.2.

Таблица 9.2

Результаты определения  $H^+/O$  у  
*V. flavum* по методике Митчелла

Штамм	Добавление субстрата (4 мМ пируват)	$N$
Прототроф 22 ЛД-П	-	$1,44 \pm 0,20$ (3)
	+	$2,29 \pm 0,38$ (5)
Ауксотроф R C-II5	-	$1,31 \pm 0,22$ (3)

в скобках - число повторностей

Численные значения  $H^+/O$  оказываются существенно ниже тех, которые получены вышеописанным методом импульсного возмущения стационарного состояния хемостатной культуры: для эндогенно дышащих *V. flavum*  $H^+/O$  около  $1,3 \div 1,7$ , а в присутствии субстрата (пируват) у прототрофного штамма *V. flavum*  $H^+/O$  достигает значений 2,3. Необходимо, однако, учитывать наличие компоненты  $CN^-$ -резистентного дыхания, которая, как показано для *V. flavum* /37/, в условиях близких к анаэробным достигает порядка 50 % от всего потребления  $O_2$ . Допуская, что  $CN^-$ -резистентное дыхание не сопряжено или слабо сопряжено с транслокацией  $H^+$  /40, 47/, мы, тем самым, должны внести коррекцию -

вычесть  $\text{CN}^-$ -резистентную компоненту из общего количества потребленного кислорода. В результате получаем значения  $\text{H}^+/\text{O}$  примерно в 2 раза выше: около 3+4, т.е. близкие к данным метода импульсного возмущения.

### 9.3. Оценка значений $\text{H}^+/\text{O}$ по увеличению энергии на поддержание $\Delta p$ вследствие возрастания $\text{C}_{\text{H}^+}$ под воздействием разобщителей

Добавление протонных разобщителей повышает протонную проницаемость мембраны [103, 182], в связи с чем наблюдается снижение  $\Delta p$ , а у клеток в состоянии 4 - возрастание скорости дыхания. Постепенно увеличивая в среде концентрацию протонного разобщителя, можно получить функциональную зависимость  $J_{\text{O}_2} = f(\text{C}_{\text{H}^+} \cdot \Delta p)$ , где  $\text{C}_{\text{H}^+} \cdot \Delta p = J_{\text{H}^+}$  - пассивный трансмембранный поток  $\text{H}^+$ . Если разобщитель при этом не влияет на величину  $\text{H}^+/\text{O}$ , то функция представляет собой прямую с тангенсом угла наклона  $\frac{1}{2 \cdot N}$  ( $N$  - стехиометрия  $\text{H}^+/\text{O}$ ).

Согласно такой схеме у прототрофного штамма *B. flavum* одновременно измеряли скорость дыхания, величину  $\Delta p$  и коэффициент пассивной  $\text{H}^+$ -проницаемости мембраны ( $\text{C}_{\text{H}^+}$ ) в зависимости от добавленного количества протонных разобщителей пентахлорфенола или ХКФ. Клетки инкубировали в среде 200 мМ КСИ с добавлением энергетического субстрата (сахарозы или ацетата). Скорость дыхания измеряли в аппарате Варбурга,  $\Delta p$  и  $\text{C}_{\text{H}^+}$  - как прежде.

Влияние ХКФ на  $J_{\text{O}_2}$  и  $\Delta p$  приведено в табл. 9.3, влияние ПХФ - на рис. 9.3. Видно, что зависимость  $J_{\text{O}_2}$  и  $\Delta p$  от концентраций разобщителей носит сложный характер,

Зависимость скорости дыхания и величины  $\Delta p$  от концентрации ХКФ у *V. flavum*. Клетки инкубированы в Na/K фосфатном буфере при pH среды 7.2

ХКФ (M)	+ Сахароза (0,4 %)		+ Ацетат натрия (0,2 %)	
	$\bar{J}_{O_2}$ ммоль/час.г	$\Delta p$ (мВ)	$\bar{J}_{O_2}$ ммоль/час.г	$\Delta p$ (мВ)
-	3,0	151	5,9	129
$10^{-7}$	5,4	147	5,1	119
$5 \cdot 10^{-7}$	4,5	137	5,0	107
$10^{-6}$	4,5	127	5,9	86
$5 \cdot 10^{-6}$	7,9	125	7,1	69
$10^{-5}$	8,7	85	3,5	0

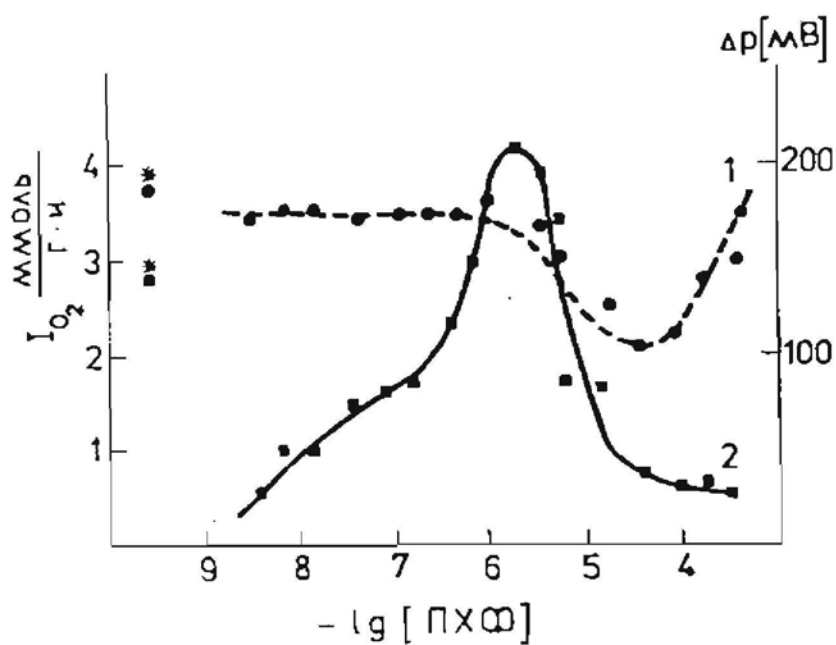


Рис. 9.3. Зависимость  $\Delta p$  (1) и скорости дыхания (2) культуры *V. flavum* 22 ЛД-П от концентрации разбавителя ПХФ. \* - без добавления ПХФ

особенно в случае ПХФ. Зависимость  $C_{H^+}$  от концентрации ХКФ приведена на рис. 9.4. В случае ПХФ эта зависимость имеет большое сходство. Неожиданным является факт, что влияние на  $\Delta p$  и/или  $J_{O_2}$  проявляются при концентрациях обоих разобщителей, которые на 1-2 порядка ниже, чем те концентрации, при которых наблюдается сколько-нибудь заметное возрастание  $C_{H^+}$ . Это, а также сложная зависимость  $J_{O_2}$  и  $\Delta p$  от концентраций обоих разобщителей, несомненно, говорит о побочных, "непротонофорных" эффектах этих соединений на клеточную энергетику. На рис. 9.5 изображена зависимость  $J_{O_2} = f(C_{H^+}, \Delta p)$ , полученная титруя суспензию пентахлорфенолом. Зависимость достаточно хорошо аппроксимируется прямой, наклону которой соответствует крайне низкое значение стехиометрии  $H^+/O$  - около 0,85. Сходные результаты получены с ХКФ ( $H^+/O$  около 0,75; не показано). Таким образом, обнаруженные непротонофорные побочные эффекты ПХФ и ХКФ делают эти соединения непригодными для их методического применения в качестве специфических агентов, избирательно повышающих  $C_{H^+}$ : заниженные значения  $H^+/O$ , полученные данным методом, очевидно, являются следствием непропорционально большого эффекта разобщителей на  $J_{O_2}$  по сравнению с их эффектом на  $C_{H^+}$ .

Для расчета энергии на поддержание  $\Delta p$  у *B. flavus* использовано значение  $H^+/O = 4$ , полученное с помощью метода Митчелла и метода импульсного возмущения стационарного состояния хемостатной культуры.

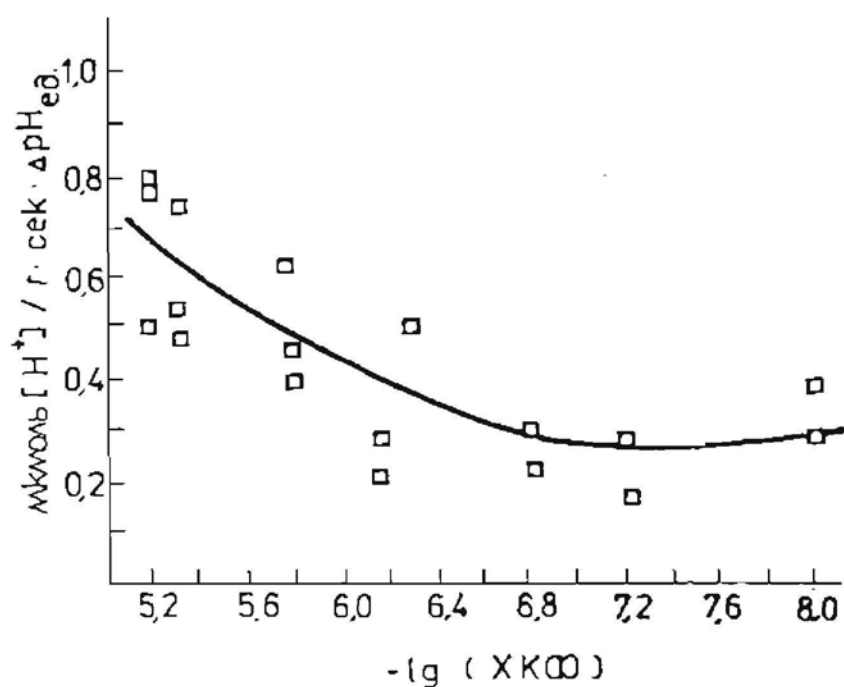


Рис. 9.4. Зависимость коэффициента пассивной  $H^+$ -проницаемости мембраны *V. flavus* 22 ЛД-П от концентрации разбавителя ХФ.

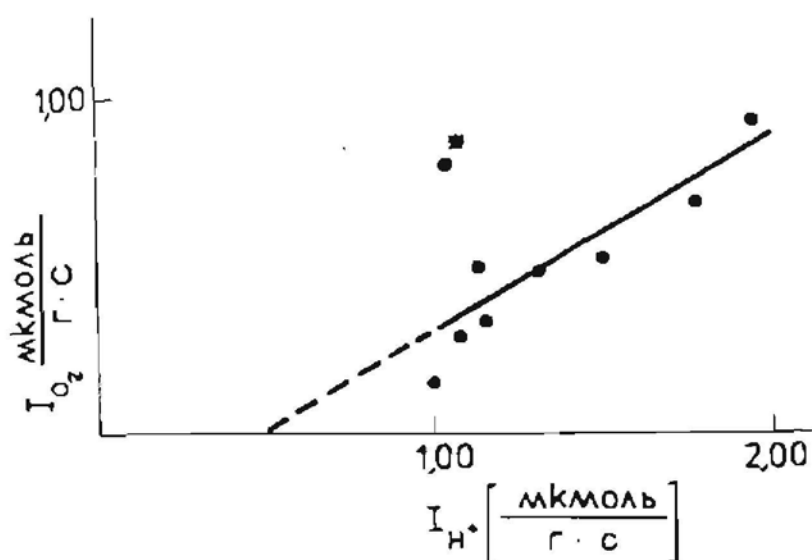


Рис. 9.5. Зависимость скорости дыхания у *V. flavus* 22 ЛД-П от пассивного потока  $H^+$ .  $C_{H^+}$  изменяли, добавляя разбавитель ПХФ. \* - без добавления ПХФ.

Глава 10. ОЦЕНКА ЭНЕРГОЗАТРАТ НА ПОДДЕРЖАНИЕ  
ИОННЫХ ГРАДИЕНТОВ У *BREVIBACTERIUM*  
*FLAVUM* И *ZYMOONAS MOBILIS*

10.1. Энергозатраты на поддержание  
ионных градиентов у *B. flavum*

10.1.1.  $\Delta p$

Экспериментальные данные, изложенные в главах 6-9 были получены с целью оценки той доли метаболической энергии, которая у *B. flavum* затрачивается для компенсации пассивных трансмембранных потоков  $H^+$  и  $Na^+$ , или, согласно нашей терминологии, на поддержание  $\Delta p$  и  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$ . Результаты оценки величины энергии на поддержание  $\Delta p$  представлены в табл. 10.1. Рассмотрены (так же как в начале гл. 6) два физиологических состояния клеточной популяции: состояние 4 (дыхательный контроль) и состояние 3 (отсутствие дыхательного контроля). Для расчетов взяты данные о  $\Delta \psi$  и  $\Delta pH$  из гл. 6; по этим данным оценивали  $\Delta p$  у хемостатной культуры *B. flavum* 22 ЛД-П в состоянии 3, растущей на среде с БВК и ацетатом, а также у периодической культуры того же штамма в состоянии 4, растущей на среде с сахарозой и кукурузным экстрактом при указанных в таблице 10.1 значениях pH среды. Данные о скорости дыхания клеток в состоянии 3 на среде, содержащей БВК и ацетат - те же, что приведены в гл. 6. Данные о скорости дыхания клеток в состоянии дыхательного контроля при различных значениях pH среды взяты из опыта, где исследовалась корреляция повышения скорости дыхания с возрастанием  $C_{H^+}$  (гл. 7).

Значения  $C_{H^+}$  следует рассматривать как приблизительные

Таблица 10.1

Оценка энергии на поддержание  $\Delta p$  у *V. flavum*  
в зависимости от pH среды и физиологического  
состояния культуры

Дыхатель- ный конт- роль	pH среды	$C_{H^+}$ [ $\frac{\mu\text{моль } H^+}{\text{г.сек. } \Delta\text{pH}}$ ]	$\Delta p$ (мВ)	$J_{O_2}$ [ $\frac{\mu\text{моль } O_2}{\text{г.сек}}$ ]	Энергия на поддержан- ие $\Delta p$ (%)
-	7	0,1	136	0,70	4,0
	6	0,1	122	0,45	5,7
	5,5	0,5	44	0,09	51,4
	5	1,5	40	0	-
+	7	0,1	134	1,11	2,5
	6	0,1	154	1,17	2,7
	5,5	0,5	160	1,30	12,8
	5	1,5	182	1,47	38,6

ввиду разброса результатов отдельных измерений (гл. 7). Рас-  
четы делались по формуле:

$$\beta'_{H^+} = C_{H^+} \cdot \Delta p / 2 \cdot N \cdot J_{O_2} \quad (10.1)$$

где  $\beta'_{H^+}$  - потребление энергии (в % от общего потребления кис-  
лорода) для поддержания  $\Delta p$ .

Результаты расчетов свидетельствуют о том, что в рассмат-  
риваемых условиях  $\beta'_{H^+}$  может изменяться в пределах от 2,5 до  
50 %.  $\beta'_{H^+}$  резко возрастает при понижении pH среды ниже 6. Как  
ясно из данных табл. 10.1, основной причиной такого возрастания  
энергии поддержания  $\Delta p$  - увеличение  $C_{H^+}$ .

У клеток в состоянии 3  $\beta'_{H^+}$  с понижением pH среды возрас-

тает относительно быстрее и достигает несколько больших значений, чем  $\beta'_{H^+}$  у клеток в состоянии 4. Однако по абсолютному значению (в единицах скорости потребления кислорода на грамм биомассы) энергия на поддержание  $\Delta p$ , которую затрачивает культура в состоянии 4 при pH среды  $< 6$ , в несколько раз превышает аналогичный показатель у культуры в состоянии 3. Очевидно, именно этим можно объяснить повышенные значения  $\Delta p$  (а также, частично, поддержание более высоких значений внутриклеточного pH), которые наблюдаются у клеток *B. flavum* в состоянии 4 в области pH среды  $< 6$ .

### 10.1.2. $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$

Полученные данные о  $C_{Na^+}$  позволяют оценить лишь верхний предел энергии на поддержание  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$  при pH среды около нейтральных значений. В условиях дыхательного контроля при pH среды между 6 и 7 мы можем принять, что  $\Delta \psi$  поддерживается в пределах от 100 до 150 мВ, а значение  $C_{Na^+}$ , по нашим оценкам (гл. 8), меньше 0,07  $\mu$ моль  $Na^+$ /г.сек.  $\Delta p_{Na^+}$ . Используя значения приведенные в табл. 10.1, а также учитывая, что компенсация пассивного потока  $Na^+$  в 2 раза "дороже" компенсации такого же потока  $H^+$  (если  $H^+/Na^+ = 2$ ), можно рассчитывать, что  $\beta'_{Na^+} = 4,7 \div 5,9 \%$  (для культуры в состоянии 4).

В отличие от  $\Delta p$  "натрийдвижущая сила" у *B. flavum* не занимает центральной роли в энергетике и может быть сведена практически на 0 без серьезных последствий для жизнедеятельности клеток путем выращивания, отмывания и ресуспендирования бактерий в безнатриевой среде. Тогда, сравнивая скорости дыхания у клеток в безнатриевой среде и в среде с  $Na^+$  (когда  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+} \neq 0$ ),



можно непосредственно судить о порядке величины энергии на поддержание  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$ . В табл. 10.2 приводятся такие данные. Сравнивали скорость дыхания клеток в 200 мМ КСI и скорость дыхания клеток в среде с 100 мМ КСI и 100 мМ NaCl при pH среды 8,0 и в присутствии 0,5 % ацетата в качестве энергетического субстрата. Клетки *V. flavum* находились в состоянии дыхательно-го контроля, о чем свидетельствует эффект ХКФ. Оказалось, что в присутствии 100 мМ Na<sup>+</sup> в среде скорость дыхания клеток увеличена почти на 10 % (считая от  $J_{O_2}$  в присутствии Na<sup>+</sup>).

Таблица 10.2

Влияние ионов Na<sup>+</sup> на скорость дыхания  
клеток *V. flavum* в среде с 0,5 %  
ацетатом калия

Состав среды	$J_{O_2}$ [μмоль O <sub>2</sub> /г.сек]	$\frac{\Delta J_{O_2}}{J_{O_2}^{КСI} + \Delta J_{O_2}}$ (%)
200 мМ КСI	1,13 - 1,44	- (3)*
100 мМ КСI	1,21 - 1,68	9,4% ± 5,8% (3)
100 мМ NaCl		
200 мМ КСI + 6 μМ ХКФ	2,12 - 2,23	43,4% ± 11,6% (3)

\* - в скобках - количество  
повторностей

Используя интервал величины  $J_{O_2}$  в присутствии Na<sup>+</sup> (табл. 10.2) и принимая, что при pH среды = 8  $\Delta \Psi = 180$  мВ (гл. 6), нетрудно подсчитать, что в этом случае верхний предел

$\beta'_{\text{Na}^+}$  - около  $4,5 \pm 6,2\%$ . Эти значения, вероятно, несколько занижены, так как не учтена возможность, что при концентрации  $\text{Na}^+$  в среде  $\sim 100$  мМ  $\Delta p_{\text{Na}^+}$  превышает 1,3 единиц (гл. 8), и, соответственно, реальный пассивный поток  $\text{Na}^+$  также несколько выше. В пределах ошибки значение  $\beta'_{\text{Na}^+}$ , измеренное по возрастанию дыхания в присутствии в среде  $\text{Na}^+$  совпадает с рассчитанным максимальным значением  $\beta'_{\text{Na}^+}$ . Таким образом, истинное значение  $\beta'_{\text{Na}^+}$ , вероятно, близко к рассчитанной верхней границе и по порядку совпадает с величиной  $\beta'_{\text{H}^+}$  при нейтральном pH среды.

#### 10.2. $\Delta p$ и энергозатраты на ее поддержание у *Zygomonas mobilis*

У анаэробной бактерии *Zygomonas mobilis*  $\Delta p$  не участвует в генерировании АТФ. Как рассматривалось выше (гл. 2.1), ее наличие не требуется также для транспорта в клетку энергетического субстрата, хотя и показан  $\Delta p$  - зависимый транспорт аминокислот [84]. Ситуация во многом аналогична с поддержанием  $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$  у *Brevibacterium flavum*: количество энергии на поддержание  $\Delta p$  у *Z. mobilis* можно мерить прямым путем, просто "отключая" генератор протонного градиента и фиксируя изменение уровня непродуктивных энергозатрат. Конечно, в этом случае термин "непродуктивные энергозатраты" означают не только энергопотребление на компенсацию  $\Delta p \cdot C_{\text{H}^+}$ , а также, возможно, затраты на движение (гл. 2).

### 10.2.1. $\Delta pH$ и $\Delta \psi$ у *Zygomonas mobilis*

Результаты исследования зависимости  $\Delta pH$  от  $pH$  среды у метаболически активных и метаболически неактивных клеток *Z. mobilis* ИЗ представлены на рис. 10.1 и в табл. 10.3. Метаболически активными считали культуры клеток, выделяющие  $CO_2$ , какими являются клетки в экспоненциальной фазе роста или в стационарной фазе после добавления глюкозы в 5 % (конечная конц.). Метаболически неактивными считали клетки в стационарной фазе роста, у которых выделение  $CO_2$  прекратилось. На рис. 10.1 видно, что  $\Delta pH$  у метаболически неактивных клеток значительно меньше, чем у клеток, потребляющих субстрат. Однако, если  $pH$  среды  $< 4$ , метаболически неактивные клетки все-таки поддерживают  $\Delta pH$  более единицы. Отсюда следует, что  $\Delta pH$  у *Z. mobilis* лишь частично зависит от метаболической энергии.

У метаболически активных клеток изменения  $pH$  среды от 3,5 до 5,6 вызывает изменения внутриклеточного  $pH$  от 5,75 до 6,40. У метаболически неактивных клеток значения внутриклеточного  $pH$  оказались ниже  $5,0 \pm 5,5$ .

Величину  $\Delta \psi$  у данных бактерий измерить при помощи  $TpH^+$  не удалось. В энергезированных клетках количество  $TpH^+$  оказалось почти в 2 раза выше, чем в интактных, так что клетки как будто не аккумулировали, а, наоборот, "выталкивали" этот катион (не показано). С *E. coli* нами была проделана серия экспериментов и продемонстрирована зависимость наблюдаемого  $\Delta \psi$  от концентрации  $TpH^+$  /121/. Однако, накопление  $TpH^+$  внутри клеток *Z. mobilis* не удавалось достичь ни обработкой суспензии с ЭДТА, ни варьированием концентрации  $TpH^+$  в среде. При этом, накопление катиона в метаболически неактивных клетках сказалось

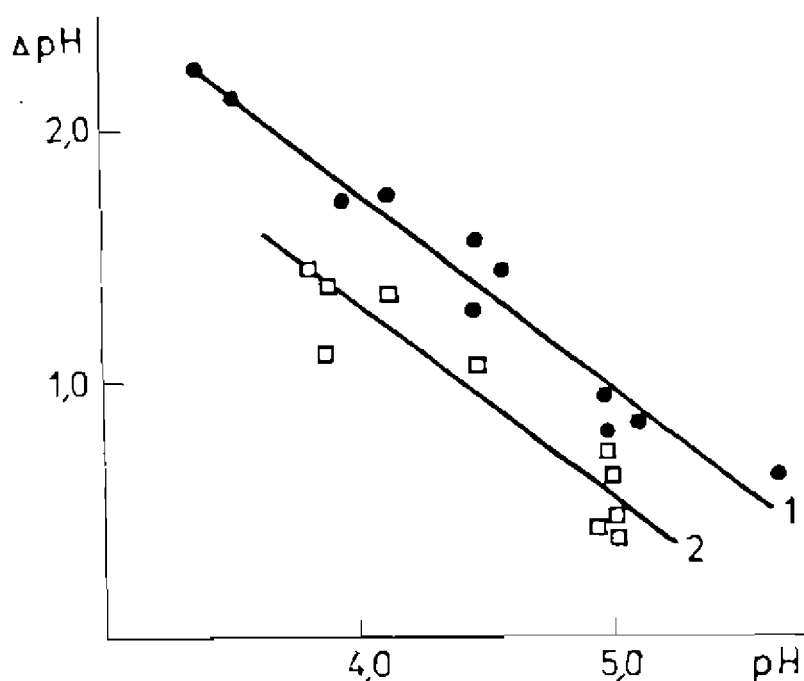


Рис. 10.1. Зависимость  $\Delta pH$  от pH среды у метаболически активных (1) и метаболически неактивных (2) клеток *Zymomonas mobilis* ПЗ

ниже, чем в метаболически активных. На качественном уровне такое поведение  $T_{\text{pH}}^+$  может свидетельствовать об обратном  $\Delta \psi$  на мембране *Z. mobilis* ("+" внутри клетки), однако для количественного определения  $\Delta \psi$  в данном случае необходимо использовать проникающий анион вместо проникающего катиона. Подобные наблюдения сообщаются также в работе /200/. Там же исследована динамика  $\Delta pH$  в процессе периодического роста *Zymomonas mobilis*. Показано снижение этого градиента в конце культивирования по мере израсходования субстрата, что хорошо согласуется с нашими данными о различии в величине  $\Delta pH$  у метаболически активных и метаболически неактивных клеток. В количественном

Таблица 10.3

Зависимость величины  $\Delta \text{pH}$  и накопления  $\text{ТФФ}^+$  от  $\text{pH}$  среды в метаболически активных и метаболически неактивных клетках *Z. mobilis*

pH среды	Метаболически активные		Метаболически неактивные	
	$\Delta \text{pH}$	$[\text{ТФФ}^+]$ внутр. [имп/мин]	$\Delta \text{pH}$	$[\text{ТФФ}^+]$ внутр. [имп/мин]
4,07	1,87	3777	1,42	2010
4,47	1,71	3135	1,06	1864
4,92	0,93	4495	0,78	3278

плане полученные нами значения  $\Delta \text{pH}$  в основном согласуются с литературными данными [58, 200].

#### 10.2.2. Оценка энергозатрат на поддержание путем ингибирования $\text{H}^+$ -АТФазы

При концентрации ингибитора  $\text{H}^+$ -АТФазы ДЦК равной или выше  $2 \cdot 10^{-4}$  М наблюдается стимуляция роста *Z. mobilis* и увеличение выхода биомассы на единицу потребленного субстрата ( $Y_{x/s}$ ) (табл. 10.4). ДЦК снимает лишь часть  $\Delta \text{pH}$  и по данным табл. 10.4 можно оценить энергозатраты на поддержание этой ДЦК - чувствительной компоненты. Принимая для *Z. mobilis*  $Y_{x/\text{АТФ}}^{\text{макс.}} = 8,5$  [234], непродуктивные затраты энергии  $\beta'$  рассчитали по формуле:

$$\beta' = 1 - \frac{Y_{x/\text{АТФ}}}{Y_{x/\text{АТФ}}^{\text{макс.}}} \quad (10.2)$$

Из данных о  $Y_{x/s}$  легко получить  $Y_{x/\text{АТФ}}$ , учитывая, что из 1 моля глюкозы образуется 1 моль АТФ. Таким образом, можно оце-

Таблица 10.4

Влияние ДЦК на  $\text{pH}_{\text{внутр.}}$  и выход биомассы на г субстрата и моль АТФ у *Zygomonas mobilis* в период с 14 по 18 ч. культивации

Добавка ингибитора	$Y_{X/S}$ (г/г)	$Y_{X/ATP}$ (г/моль)	$\text{pH}_{\text{внутр.}}$	$\Delta \text{pH}$
-	0,009	1,62	6,26	2,36
+ДЦК	0,033	5,94	5,89	1,82

$Y_{X/ATP}^{\text{макс.}} = 8,5$

нить, что у *Zygomonas mobilis* в случае роста культуры на богатой среде  $\beta' = 81\%$ . При ингибировании  $\text{H}^+$ -АТФазы посредством ДЦК наблюдается значительное увеличение выхода биомассы на молекулу АТФ. Непродуктивные энергозатраты в этом случае ( $\beta'_{\text{ДЦК}}$ ) - около 30%. Непродуктивные энергозатраты на поддержание ДЦК-зависимой компоненты  $\Delta \text{pH}$  соответствуют разнице (допуская, что ДЦК - не меняет  $Y_{X/ATP}^{\text{макс.}}$ ) между этими двумя величинами:

$$\beta'_{\text{H}^+} = \beta' - \beta'_{\text{ДЦК}} \quad (10.3)$$

Как видно,  $\beta'_{\text{H}^+}$  равна примерно 50%. Вместо "ДЦК-зависимая компонента  $\Delta \text{pH}$ " мы можем говорить "компонента, зависящая от  $\text{H}^+$ -АТФазы", так как показано /84/, что  $\text{H}^+$ -АТФаза *Z. mobilis* ДЦК-чувствительна. С другой стороны, эти данные не позволяют вычислить полной энергии на поддержание  $\Delta \text{pH}$ , так как нет уверенности, что  $\text{H}^+$ -АТФаза является единственным генератором  $\Delta \text{pH}$  у *Zygomonas mobilis*.

## Глава II. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Правильность оценки затрат энергии на поддержание транс-мембранных ионных градиентов у *B. flavum* всецело зависит от точности и адекватности определения соответствующих параметров энергетики, значения которых приведены в экспериментальной части. В первую очередь это касается протондвижущей силы. Надежность существующих методов измерения  $\Delta p$  широко дискутируется в литературе последнего десятилетия, в частности, в связи с "неидеальным" поведением липофильных катионов, используемых для измерения  $\Delta \psi$  (гл. 2). Как отмечалось, надежность определения  $\Delta \psi$  выше при больших значениях электрического потенциала, когда наблюдается хорошее совпадение данных распределения  $Tm^{+}$  с данными других методик /45, 265/. Как мы показали,  $\Delta \psi$  является ведущей компонентой протондвижущей силы у *B. flavum* и всегда (за исключением клеток в состоянии 3 при кислых pH среды) выше 100 мВ. Это, в целом, делает данные о  $\Delta p$  у *B. flavum* относительно достоверными.

Во вторых, необходимо отметить, что мы рассматривали точность и надежность определения "делокализованной" протондвижущей силы, которая поддается измерению изложенными выше методиками. Однако, накапливаются все больше данных работ, в т.ч. на бактериях, указывающие на возможную роль локализованных в мембране (или в примембранном пространстве) потоков  $H^{+}$  в энергосопряжении /36, 88, 98, 165, 172/ (см. гл. 2.4). Оценить величину энергии на поддержание таких локальных градиентов еще труднее, так как методики измерения  $C_{H^{+}}$  и  $H^{+}/O$  также позволяют учитывать только "делокализованных"  $H^{+}$ . Если же существенная часть энергии, генерируемой в дыхательной цепи, расходуется на

транслокацию через мембрану "невидимых" с помощью имеющихся методов "локальных" протонов, мы в итоге получаем заниженное  $H^+/O$ . Таким образом, при наличии локального сопряжения, мы переоцениваем  $\beta'_{H^+}$  для делокализованного градиента, так как не учитываем тот факт, что реально для образования  $\Delta p$  расходуется не весь кислород: часть  $O_2$  потребляется для трансмембранного переноса "локальных" протонов. Из такого анализа следует, что применяемые нами методики позволяют оценить верхний предел  $\beta'_{H^+}$ , который соответствует истинному значению  $\beta'_{H^+}$  при условии, что все энергосопряжение осуществляется посредством "делокализованной"  $\Delta p$ .

В настоящей работе исследовалась зависимость  $\Delta p$  у *B. flavum* от ряда факторов: pH среды, концентрации  $K^+$  в среде инкубирования клеток, концентрации биомассы и буферной емкости среды с учетом физиологического состояния клеток. Знание перечисленных зависимостей необходимо для оценки и прогнозирования величины  $\Delta p$  в соответствующих условиях.

"Физиологическое состояние клеток" в данном случае понимается как наличие или отсутствие у *B. flavum* дыхательного контроля. В сущности, дыхательный контроль характеризует "запасы мощности" системы генерирования энергии: в условиях, когда проявляется дыхательный контроль (состояние 4, по аналогии с митохондриями), лимитирующими являются процессы потребления энергии, а не процессы ее генерирования. Наоборот, когда дыхательный контроль не наблюдается, система генерирования энергии сама является лимитирующим звеном (состояние 3).

Состояние 3 у бактерий может наступить как вследствие ингибирования путей производства энергии /39/, так и при активации процессов, потребляющих метаболическую энергию /238/;



важно лишь изменение отношения максимально возможной скорости генерирования энергии к реальной скорости ее потребления в пользу последней. От "запасов мощности", очевидно, зависит количество метаболической энергии, доступной для поддержания трансмембранных ионных градиентов. Отсюда понятны различия в зависимостях  $\Delta p$  от некоторых факторов среды у клеток в двух этих физиологических состояниях.

К сожалению, конкретная биохимическая основа проявления у бактерий дыхательного контроля во многих случаях остается неясной. Известно, что дыхательный контроль в случае *E. coli* наблюдается у нерастущих клеток в условиях потребления эндогенного субстрата, тогда как растущие клетки *E. coli* находятся в состоянии 3 /70/. Согласно интерпретации авторов, у быстрорастущих клеток весь образованный АТФ быстро потребляется в процессах биосинтеза. Нам представляется правильным провести различие между понятием "состоянием 3" у митохондрий и бактерий в том плане, что у бактерий  $\Delta p$  в большей мере используется в энергопотребляющих процессах, не связанных непосредственно с АТФ (транспорт, передвижение). Поэтому для бактерий более адекватно рассматривать не изменения содержания АТФ, а непосредственно величины  $\Delta p$ , при переходах из одного состояния в другое.

Интересно отметить, что в отличие от *E. coli* у *B. flavum* наблюдается дыхательный контроль в растущих клетках. Для этого требуется избыток С-субстрата в среде (у эндогенно дышащих *B. flavum* дыхательный контроль не проявляется), а также незаингибированность путей генерирования энергии. Судя по имеющимся данным, для *B. flavum* переход от состояния 4 к состоянию 3 в условиях избытка С-субстрата чаще вызван именно ингибированием путей производства энергии, а не возрастанием потребления. Так, в нашей лаборатории показано, что проявление

дыхательного контроля у *V. flavum* зависит от активности ферментов цикла Кребса / 33 /. В процессе периодического культивирования на сахарозе активность цикла Кребса максимальна в поздней логарифмической и ранней стационарной фазах роста. Соответственно, в то же время наблюдается наиболее выраженный дыхательный контроль. Активность цикла Кребса зависит от условий выращивания клеток, в частности, ингибирующее воздействие на некоторые ключевые ферменты цикла оказывают присутствующие в среде свободные аминокислоты / 34 /. Клетки *V. flavum*, выращиваемые на средах с богатым содержанием аминокислот не проявляют дыхательного контроля, чем отличаются от клеток, растущих на углеводах / 33 /. Отсюда становится понятно различие между клетками, растущими на среде с БВК и на среде с кукурузным экстрактом: первый субстрат содержит большое количество свободных аминокислот, и, вероятно, является одной из причин отсутствия дыхательного контроля у *V. flavum* в этой серии экспериментов (гл. 6). Имеются также указания на установление состояния катаболитной репрессии в присутствии в среде БВК / 34 /. Кроме рассмотренных факторов на активность системы генерирования энергии в принципе могут влиять и другие факторы, которых мы не учитываем. Поэтому перед каждым экспериментом контролировалось состояние культуры тестом на дыхательный контроль.

При заранее фиксированном физиологическом состоянии культуры, мы можем рассматривать особенности влияния pH среды на значения внутриклеточного pH,  $\Delta$  pH и  $\Delta$   $\psi$ , характерные для *V. flavum*. Самая очевидная особенность *V. flavum* в этом отношении - широкий интервал изменения внутриклеточного pH при изменении pH среды, т.е. отсутствие внутриклеточного

го рН гомеостаза. Такое отсутствие рН<sub>внутр.</sub> гомеостаза и небольшой  $\Delta$  рН во всем интервале рН среды, очевидно, не является артефактом методики, так как пользуясь идентичной процедурой измерения, нами получена характерная рН-зависимость  $\Delta$  рН у *E. coli* /121/, совпадающая с данными литературы /45, 191, 231/.

Можно утверждать, что частично отсутствие рН-гомеостаза обусловлено энергетическим фактором: у клеток в состоянии 3 интервал изменений внутриклеточного рН относительно шире, а в районе рН среды  $5,0 \div 5,5$ , где наблюдается возрастание пассивной  $H^+$ -проницаемости мембраны, рН<sub>внутр.</sub> в большей мере зависит от рН среды, чем в районе  $6,0 \div 7,0$ . Однако, у клеток в состоянии дыхательного контроля значение внутриклеточного рН также меняется в пределах 1,2 единиц, что не позволяет говорить о рН гомеостазе. Очевидно, у *B. flavum* просто нет "жесткой" регуляции внутриклеточного рН, что для аэробного нейтрофильного гетеротрофа, судя по данным литературы (см. обзоры /203, 204/), нетипично. Несколько похожие данные получены на аэробной *Nitrosomonas eutrophae* /147/, однако все остальные известные случаи отсутствия рН<sub>внутр.</sub> гомеостаза относятся к анаэробным бактериям. У исследованных аэробных нейтрофилов, таких, как *E. coli* диапазон изменений рН<sub>внутр.</sub> даже в условиях утилизации клетками эндогенных резервов значительно более узкий, чем у *B. flavum* /95, 122, 242, 266/.

$\Delta \Psi$  у *B. flavum* (в состоянии 3) снижается в сторону кислых значений рН среды, что можно считать типичным для бактерий. Однако, эта зависимость является весьма крутой и при рН среды  $\leq 5,5$  наблюдается резкий спад  $\Delta \Psi$  практически до 0, который также соответствует упомянутому возрастанию пассивной

$H^+$ -проницаемости мембраны. При увеличении  $C_{H^+}$  коллапс  $\Delta\psi$ , вероятно, обусловлен возрастанием потребности в энергозатратах для поддержания физиологических значений  $\Delta p$ , что превышает энергетические возможности клеток в состоянии 3. В пользу такого предположения говорит тот факт, что у культуры *V.flavum* в состоянии дыхательного контроля при pH среды около 5 снижения  $\Delta\psi$  не наблюдается.

Показана  $K^+$ -зависимость отношения  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$  у *V.flavum*: при наличии в среде  $K^+$  клетки поддерживают относительно высокие значения  $\Delta pH$  и низкие значения  $\Delta\psi$  по сравнению с клетками в бескальевой среде (где  $K^+$  замещен на  $Na^+$ ). Такое наблюдение указывает на существование у *V.flavum* электрогенного транспорта  $K^+$ , который участвует в образовании  $\Delta pH$  (как это подробно показано на *E.coli* /54,142,143,264/).

Сходные данные о  $\Delta\psi$  были получены группой Мартиросова /5,6/ в работах со штаммом *V.flavum* ATCC 14067. Отмытые клетки в буфере ТРИС поддерживали  $\Delta\psi$  в пределах от 110 до 160 мВ при pH среды от 5,0 до 9,0, соответственно. При этом, добавляя в среду  $K^+$ , также наблюдали некоторое снижение  $\Delta\psi$ .

Неожиданным явилось обнаружение зависимости  $\Delta pH$  и  $\Delta\psi$  от концентраций биомассы *V.flavum* и буферной емкости среды инкубирования. На исследования в этом направлении нас побуждало несоответствие между данными о  $\Delta pH$ , полученными с помощью распределительной методики и данными  $^{31}P$ -ЯМР спектроскопии. Данные  $^{31}P$ -ЯМР указывали на существенно большие значения  $\Delta pH$ . Однако удалось показать, что при измерении  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$  с помощью распределительных методик, увеличение концентрации биомассы (т.е. приближение к условиям  $^{31}P$ -ЯМР опыта) приводит к возрастанию измеряемых значений  $\Delta pH$  и снижению значений  $\Delta\psi$ . При постоянной концентрации биомассы, снижая буферную емкость среды,

добивались такого же эффекта. Это позволяет высказать предположение, что на величину  $\Delta \text{pH}$  и отношение  $\Delta \text{pH}$  к  $\Delta \Psi$  влияет именно отношение "буферная емкость суммарного внутриклеточного пространства" / "буферная емкость среды".

Интересно рассмотреть возможный биологический смысл подобной зависимости. Сторонники теории локального энергосопряжения ссылаются на "эффект океана", как один из аргументов против полезности делокализованного  $\Delta p$  в реальных условиях существования бактерий / 128, 129 /. Смысл эффекта - невозможность бактерии создать достаточно большой делокализованный

$\Delta \text{pH}$  в среде с практически бесконечной буферной емкостью (по отношению к внутреннему содержанию 1 клетки), не повышая свое внутриклеточное значение pH выше допустимого. Однако, ясно, что в достаточно концентрированной суспензии, где буферная емкость среды сравнима с суммарной буферной емкостью внутриклеточной фазы множества клеток, поддержание  $\Delta \text{pH}$  становится физиологически более выгодным для каждой отдельной клетки.

Поэтому наблюдаемую зависимость  $\Delta \text{pH}$  (и  $\Delta \Psi$ ) от концентрации биомассы можно рассматривать как результат целенаправленной регуляции в ответ на возрастание плотности популяции клеток.

Конечно, проверка этого предположения требует раскрытия системы, с помощью которой клетка *B. flavum* получает информацию о плотности популяции и соответственно регулирует величину компонент своей  $\Delta p$ , что выходит за рамки данной работы.

Обсуждаемая зависимость имеет также практическую и методическую значимость. Во-первых, она заставляет с осторожностью отнестись к оценке  $\Delta p$  у культуры *B. flavum* с большой концентрацией биомассы (например, у хемостатной культуры) на основании данных, полученных у клеток, отобранных у той же культуры и разве-

денных до концентрации биомассы  $1 \pm 2$  г/л (согласно стандартной методике определения  $\Delta \psi$  и  $\Delta pH$  /83,93,265/. Во-вторых, - учитывать разницу в концентрации биомассы, что необходимо при сравнении данных  $^{31}P$ -ЯМР с данными других методик.

Из рассмотренного выше нетрудно понять, что доля энергии, расходуемая на поддержание протондвижущей силы не есть постоянная величина, а зависит как от самой  $\Delta p$ , так и, наверняка, от энергетического состояния клеток. Как уже было оговорено, непродуктивными энергозатратами на поддержание  $\Delta p$  у неподвижных бактерий, в т.ч. у *B. flavum*, можно считать энергозатраты на компенсацию пассивного трансмембранного потока  $H^+$  ( $J_{H^+}$ ). Величина  $J_{H^+}$  зависит как от  $\Delta p$ , так и от коэффициента пассивной проницаемости мембраны для  $H^+$  ( $C_{H^+}$ ) /50,117,247/. На полученные данные о  $C_{H^+}$  у *B. flavum* и на методических вопросах определения этого параметра следует остановиться подробнее.

$C_{H^+}$  определяли по кинетике изменения pH среды после добавления известного количества HCl в суспензии клеток /158,182/. Общий недостаток данной методики -  $C_{H^+}$  нельзя измерить непосредственно у метаболически активных клеток. Необходимо работать в анаэробных условиях с клетками, у которых  $\Delta p$  близок к 0, а в среду инкубирования добавлен проникающий противоион для обеспечения электронейтральности потока  $H^+$  ( $SCN^-$  и/или  $K^+$  + валлинмицин). Следовательно, в рамках данной методики практически нет смысла говорить о значениях  $C_{H^+}$  отдельно для клеток в состоянии 3 и для клеток в состоянии 4. Более того, для расчетов  $J_{H^+}$  приходится допускать, что  $C_{H^+}$ , измеряемый у деэнергизованных клеток можно отнести также к клеткам в физиологических условиях, т.е. что  $C_{H^+}$  не зависит от  $\Delta p$ . Правомерность такого допущения отчасти следует из данных литературы.

В литературе существует общепринятое мнение, что  $C_{H^+}$  не зависит от  $\Delta pH$ . В основном это вытекает из данных титрования суспензий митохондрий и бактерий ингибиторами транспорта электронов /50, 140, 199, 268/. Как правило, получается линейная зависимость между скоростью дыхания (транспортом  $\bar{e}$ ) и величиной  $\Delta pH$ , свидетельствующая в пользу постоянства  $C_{H^+}$ . С  $\Delta \psi$ -зависимостью дело обстоит сложнее. В ряде работ продемонстрирована существенно нелинейная зависимость  $J_{O_2}$  от  $\Delta \psi$  как у бактерий /117/, так и у митохондрий /68, 195/. При этом в области значений  $\Delta \psi$  до  $\sim 150$  мВ зависимость  $J_{O_2}$  от  $\Delta \psi$  оказывается приблизительно линейной, тогда как при более высоких  $\Delta \psi$   $J_{O_2}$  экспоненциально возрастает. Интерпретация этого явления в литературе неоднозначна. В большинстве публикаций постулируется зависимость  $C_{H^+}$  от  $\Delta \psi$  при достаточно больших значениях электрического потенциала /68, 140, 195/. Однако, в работе Зоратти и др. /268/ на митохондриях приводятся результаты одновременного измерения зависимости  $J_{O_2}$  от  $\Delta \psi$  и зависимости  $J_{H^+}$  (как начальная скорость изменения концентрации  $K^+$  в среде после добавления валиномицина) от  $\Delta \psi$ . Делается заключение, что за резкое возрастание  $J_{O_2}$  ответственно не столько наблюдаемое незначительное возрастание  $C_{H^+}$ , сколько, скорее, снижение эффективности работы самой дыхательной цепи (снижение механистического  $H^+/O$ ) в области высоких  $\Delta \psi$ .

Говоря о нашем объекте, нужно отметить, что все расчеты  $J_{H^+}$  (табл. 10.1) проделаны при  $\Delta \psi$  меньше 150 мВ. Поэтому, даже допуская, что при больших  $\Delta \psi$  возможно существенное возрастание  $C_{H^+}$ , в нашем случае есть основания принять  $C_{H^+}$  за постоянную. В наблюдаемом физиологическом диапазоне  $\Delta \psi$  скольконибудь существенное снижение эффективности работы дыхательной цепи также представляется маловероятным, т.к. получено

достаточно хорошее совпадение данных о  $H^+/O$  стехиометрии с помощью двух методов: методом Митчелла (когда  $\Delta\psi \approx 0$ ) и разработанным нами методом импульсного возмущения стационарного состояния хемостатной культуры добавками кислоты (при физиологическом значении  $\Delta\psi$ ).

Значение  $C_{H^+}$  определялось при различных значениях pH среды. В нейтральной области pH полученные значения близки к данным литературы о других бактериях /134, 158, 244/. Однако, при pH среды ниже 5,5-5,6  $C_{H^+}$  возрастает и при pH = 5,0 на порядок превышает уровень в нейтральной области. Такой эффект ранее на *S. lactis* наблюдал Мэлони /158/, однако, автор показал, что возрастание снимается добавленным ДЦК и, следовательно, обусловлено диссоциацией  $F_1$  части  $H^+$ -АТФазы с открытием протонного канала  $F_0$ . Нами такой эффект не наблюдался. В последнее время появились другие работы /103, 244/, где показано возрастание  $C_{H^+}$  в кислой области pH. В работе с *Vacillus acidocaldarius* также обнаружена ДЦК-независимость данного эффекта /103/.

Продемонстрированы эффекты низких pH среды на основные параметры энергетического метаболизма *V. flavum* (особенно в состоянии 3), что свидетельствует о реальности возрастания  $C_{H^+}$  в физиологических условиях, отличных от условий (анаэробность, 200 mM KCl, добавление валиномицина и  $SCN^-$ ), диктуемых методикой измерения коэффициента  $H^+$ -проницаемости (гл. 7). Однако нет ясности насчет физических причин наблюдаемого эффекта. Можно сказать, что сама физико-химическая теория  $H^+$ -проводимости липидного бислоя находится на уровне разработки /9, 60, 65, 78/ (см. гл. 3.2). В первом приближении  $H^+$ -проводимость мембраны можно разделить на 2 компоненты: прохождение  $H^+$  в



составе нейтральных молекул слабых кислот /63,167/ (например, причина возрастания  $C_{H^+}$ , вызываемого протонифорными разобщителями) и трансмембранная проводимость  $H^+$  по цепям водородных связей, образуемых молекулами воды /9,65,189/ ("электрогенная компонента"). Возможно, что возрастание именно электрогенной компоненты пассивной проницаемости вызывает коллапс  $\Delta \Psi$  у клеток в состоянии 3 при pH около 5,0÷5,5. Некоторые соображения можно высказать также по поводу протонифорной проводимости.

Известно, что в кислой области pH находятся значения  $pK_a$  ряда органических кислот, содержащихся внутри клетки (ацетат, лактат, пируват и др.) в миллимолярных концентрациях /215/. Как уже отмечалось, наличие в среде инкубирования упомянутых слабых кислот приводит к шунтированию  $\Delta pH$  бактерий при pH близком к соответствующим значениям  $pK_a$  /63,168,130,221/. Ввиду наблюдений, что плазматическая мембрана бактерий проницаема только для недиссоциированных молекул кислот, а практически не проницаема для анионов /48/, наличие в среде ацетата не позволяет объяснить коллапс  $\Delta \Psi$  при кислых pH среды (гл. 6). Для объяснения диссипации  $\Delta \Psi$  необходимо постулировать челночный механизм, т.е. возможность аниону пересекать мембрану много раз, как в случае протонифорных разобщителей /63/.

Однако, с другой стороны, соотношение проницаемостей "Анион/С нейтральная молекула" имеет конечную, отличную от 0 величину /215/. Если, допустим, внутриклеточная концентрация кислоты имеет порядок нескольких миллимолей, а соотношение проницаемостей - порядка  $10^{-3} \div 10^{-4}$  /215/, то действия такого внутриклеточного пула слабой кислоты вполне сопоставима с воздействием протонифора в концентрации  $10^{-6} \div 10^{-7}$  М, когда отчетливо проявляются разобщающие эффекты /103,22,132/. Важно,

что при этом достаточно наличия слабых кислот именно во внутриклеточном пространстве, их присутствия в среде не требуется и, следовательно, можно объяснить одинаково выраженный коллапс  $\Delta \Psi$  как у клеток с добавленным ацетатом, так и у клеток в среде без экзогенного субстрата (гл. 6).

Кроме того, необходимо учитывать, что некоторые метаболиты имеют специфические переносчики, осуществляющие трансмембранный перенос этих веществ в симпорте с  $H^+$  /202,216,241/. В работах группы Конингса /202,241/ показано, что, в частности, выход из клеток *E. coli* лактата в симпорте с несколькими протонами может поддерживать высокое значение  $\Delta p$  в условиях энергетического дефицита. Однако известно, что стехиометрическое отношение анион/ $H^+$  систем симпорта меняется /45,242/, обычно снижаясь в щелочной области pH. Вполне возможно, что в кислой области это отношение иногда превышает 1, или что часть переносчиков работает с "ошибками" (англ. "slips") /208,268/, пропуская анион метаболита без протонов из внутриклеточного пространства в среду. Все это, конечно, проявляется как возрастание  $S_{\text{анион}}$  и создает условия для чисто протонофорного, "челночного" действия внутриклеточных слабых кислот. О такой роли слабых кислот косвенно свидетельствуют наблюдения о более выраженном возрастании скорости дыхания у культуры *Brevibacterium* в состоянии 4 в среде с ацетатом по сравнению с культурой на сахарозе в процессе постепенного понижения pH культурной среды (гл. 7, рис. 7.2), а также аналогичные сообщения насчет зависимости скорости дыхания дрожжей *Candida utilis* от внутриклеточного содержания ацетата /115/.

Интересно, что делая заключение о протонофорном действии слабых кислот – метаболитов при кислых значениях pH сре-

ды, мы вместе с тем отрицаем чисто протонофорную природу "классических" протонофоров ПХФ и ХКФ. Возрастание  $C_{H^+}$  в присутствии протонофорных разобщителей продемонстрирована в различных системах, в том числе у бактерий /103, 120, 149, 182, 244/. Однако имеются также указания, что действие разобщителей может объясниться специфическими местами связывания в сопрягающих мембранах (см. обзор /106/). В частности, разобщители семейства ХКФ являются также сульфгидрильными реагентами, хотя скрининг химических свойств соединений этой группы показал, что лучше с разобщающими эффектами коррелирует именно их протонофорность, а не сродство к SH-группам /57/. Неясен также механизм разобщающего действия агентов, не являющихся слабыми кислотами, например, анестетиков /97/.

В настоящей работе показано, что разобщающее действие (возрастание скорости дыхания, снижение  $\Delta p$ ) ХКФ и ПХФ у *V. flavus* наступает при концентрациях на 1+2 порядка ниже тех, при которых наблюдается возрастание  $C_{H^+}$  (гл. 9). При этом концентрационная зависимость  $J_{O_2}$  и  $\Delta p$  носит довольно сложный характер, в особенности в случае ПХФ, где в зависимости от концентрации наблюдается как стимулирование, так и ингибирование дыхания. Побочное непротофорное действие указанных разобщителей проявляется также в области концентраций, вызывающих заметное возрастание  $C_{H^+}$ : об этом свидетельствуют явно заниженные значения стехиометрического отношения  $H^+/O$ , полученные из наклонов прямых зависимости скорости дыхания от пассивного потока  $H^+$ , меняя  $\Delta p$  и  $C_{H^+}$  добавками разобщителей. Другими словами, эффект на скорость дыхания в этой области концентраций протонофоров также оказывается сильно завышенным по сравнению с наблюдаемыми изменениями  $J_{H^+}$ . Таким образом, наши данные свидетель-

ствуют о непригодности протонифорных разобщителей в экспериментах для избирательного повышения  $C_{H^+}$ , если при этом не проводится специальный контроль на возможные побочные эффекты этих соединений на энергетику бактерий.

Оказалось, что значение  $C_{H^+}$  возрастает также, если в среде инкубирования клеток присутствуют ионы  $Na^+$  (гл. 8). Это наблюдение позволило предположить, что механизмом создания и поддержания трансмембранного градиента концентрации  $Na^+$  у *V. flavum* (как и у ряда других бактерий /144,244/) является  $H^+/Na^+$  антипорт. В свою очередь, снижение  $\Delta p_{Na^+}$  после добавления к клеточной суспензии валиномицина указывает на электрогенную природу предполагаемого антипортера. Об электрогенности свидетельствует также стехиометрия  $H^+/Na^+$  антипорта, которую можно определить по соотношению сил  $-\Delta p$  и  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}/F$ , допуская, что антипортер находится в стационарном состоянии, близком к равновесию /45,216/. "Расстояние" стационарного состояния от состояния равновесия определено скоростью диссипации энергии /24, 217/, которая в данном случае пропорциональна скорости проникновения  $Na^+$  в клетку без сопряженного транспорта  $H^+$  из клетки (т.е. величина пассивного потока  $Na^+$ ). Это обстоятельство дает возможность оценить величину коэффициента пассивной проницаемости  $Na^+$  -  $C_{Na^+}$ , пользуясь формулой (8.4) для соотношения сил в стационарном состоянии.

Поскольку нет оснований считать, что имеющиеся методики дают возможность достоверно определить малые отклонения отношения  $(\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}/F) / \Delta p$  от 2, нам представлялось приемлемым оценить лишь верхнюю допустимую границу значения  $C_{Na^+}$ , взяв для расчетов минимальное возможное отношение  $(\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}/F) / \Delta p$  согласно результатам исследований зависимостей этих градиен-

тов от ряда условий (гл. 6 и 8). Расчет показал, что максимальное значение  $C_{\text{Na}^+}$  примерно на порядок меньше  $L_{\text{Na}^+}$ , а также несколько ниже значений  $C_{\text{H}^+}$  при том же интервале pH среды (6,0÷6,5).

Ценную дополнительную информацию дает сравнение двух величин  $\beta'_{\text{Na}^+}$ : полученную прямым путем (гл. 10) и рассчитанную по той же схеме как и  $\beta'_{\text{H}^+}$ , принимая для расчетов максимальную величину  $C_{\text{Na}^+}$ . Эти величины оказались близкими. Следовательно, истинное значение  $C_{\text{Na}^+}$  достаточно близко к максимальному.

Отсюда возникает интересный вопрос о причинах близости значения  $C_{\text{Na}^+}$  к значению  $C_{\text{H}^+}$  у *V. flavum*. В ряде искусственных систем показано, что  $C_{\text{Na}^+}$  для липидного бислоя на несколько порядков ниже, чем  $C_{\text{H}^+}$  /9, 60/. Это же вытекает из теоретических рассуждений /78/ (см. гл. 3.1). Можно лишь высказать общее соображение, что кроме прохождения  $\text{Na}^+$  через липидный бислой, в сложной мембране бактерий может существовать и другие пути пассивной диссипации  $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ . В частности, не исключено прохождение  $\text{Na}^+$  через антипортер или другую систему без выхода в среду  $\text{H}^+$ .

Необходимо отметить, что других оценок  $C_{\text{Na}^+}$  бактериальной мембраны нам в литературе найти не удалось. Пока не хватает литературных данных и для того, чтобы четко связать величину поддерживаемого  $\Delta p_{\text{Na}^+}$  с типом энергетического метаболизма конкретного микроорганизма. Можно отметить результаты группы Готшалка, полученные с помощью

$^{22}\text{Na}$ , по внутриклеточной концентрации  $\text{Na}^+$  в бактериях с анаэробным метаболизмом: в анаэробной *methanosarcina barkeri* /185/ и лишенного цитохромов мутанта *Bacteroides* /260/. В первом микроорганизме сообщаемая  $[\text{Na}^+]_{\text{внутр.}}$  близка к нашим данным по *B. flavum*, а во втором оказывается даже на порядок ниже. С другой стороны, у *E. coli*, по данным ЯМР, эта величина в анаэробных условиях значительно выше, чем у *B. flavum* /73/. Несомненно, что для целенаправленной минимизации пассивного потока  $\text{Na}^+$  во время культивирования, требуется дальнейшее изучение как  $C_{\text{Na}^+}$ , так и  $\Delta p_{\text{Na}^+}$  у пропущенных в зависимости от их физиологического состояния и условий культивирования.

Как отмечалось в гл. 4 и 9, "энергетическим эквивалентом" трансмембранных пассивных потоков ионов служит отношение  $\text{O}/\text{H}^+$  в дыхательной цепи.

Экспериментально получены значения  $\text{H}^+/\text{O}$  стехиометрии дыхательной цепи *B. flavum*, пользуясь двумя методами: методом регистрации количества транспортируемых  $\text{H}^+$  из клеток в среду после добавления малого количества  $\text{O}_2$  /118, 224/ и разработанным нами подходом возмущения стационарного состояния хемостатной культуры в состоянии 4 добавлением кислоты. Оба метода давали приблизительно одинаковые результаты, несмотря на то, что в их основе лежат разные допущения.

В рамках разработанного нами метода допускается, что наблюдаемое возрастание дыхания после добавления кислоты есть проявление эффекта дыхательного контроля. Данное предположение

подтверждается тем, что  $J_{O_2}$  под воздействием кислоты возрастает только в таких условиях, когда хеостатная культура находится в состоянии 4 и, в частности, в условиях избытка С-субстрата в среде культивирования /41/. Но если так, то возрастание  $J_{O_2}$  происходит вследствие временного снижения  $\Delta p$  под воздействием кислоты. Возросшее дыхание в свою очередь нарушает баланс трансмембранных потоков  $H^+$  и, соответственно, мы должны наблюдать подкисление среды, пропорциональное отношению  $H^+/O$ . После добавления кислоты моментальному снижению pH среды следует медленное защелачивание, очевидно, вследствие диффузии добавленных  $H^+$  в клетку. Во время возрастания скорости дыхания практически можно ожидать не подкисления среды, а некоторого замедления скорости защелачивания или "деформацию" кинетической кривой. Эта "деформация" пропорциональна как величине приращения скорости дыхания ( $\delta J_b$ ), так и  $H^+/O$  стехиометрии (N). Следовательно, даже не зная конкретного механизма воздействия кислоты на величину  $\Delta p$ , мы по анализу кинетики подщелачивания ("вычленив" из кинетической кривой компоненту  $J_{O_2}$ -зависимого подкисления среды) имеем возможность судить о значении  $H^+/O$ .

Рассматривая возможные механизмы воздействия кислоты на  $\Delta p$ , нетрудно показать, что постулируемое снижение  $\Delta p$  не есть прямое следствие простой диффузии внесенных кислотой  $H^+$  в клетку. Добавляя кислоту, мы тем самым увеличиваем трансмембранный  $\Delta pH$ , т.е.  $\Delta p$  фактически возрастает. Но так как электрическая емкость биомембран чрезвычайно низка /179/, то электрически нескомпенсированная диффузия протонов в клетку за микросекунды (учитывая реальное значение  $C_{H^+}$ ) создает

равный приросту  $\Delta pH$ , но по знаку противоположный диффузионный электрический потенциал. Тем самым,  $\Delta p$  фактически не изменяется, и, следовательно, нельзя ожидать каких-либо изменений  $J_{O_2}$ . После добавления кислоты происходит лишь некоторое "перераспределение" компонент  $\Delta p$ .

Однако, макроскопически наблюдаемый поток  $H^+$  из среды в клетку электронейтрален и, поэтому, зависит от  $\Delta pH$ , а не от  $\Delta p$ . На рис. II.I представлена гипотетическая схема возможных электронейтральных потоков  $H^+$  в клетку В. flavum. Вся проблема состоит в том, что эти потоки сами по себе не вызывают достаточно резкого снижения  $\Delta p$ , который бы соответствовал наблюдаемому возрастанию  $J_{O_2}$ . Происходит лишь медленная диссипация наведенного кислотой дополнительного  $\Delta pH$ , посредством которой невозможно объяснить резкое повышение  $J_{O_2}$  сразу после добавления кислоты. Остаётся предположить, что после импульса кислоты имеет место более глубокая деполяризация мембраны, по абсолютному значению превосходящая индуцированную дополнительную величину  $\delta pH$ , и, следовательно, лишь косвенно связанная с диффузией  $H^+$ .

Как один из вариантов можно предположить цикл "электронейтральный  $H^+/K^+$  антипорт - АТФ-зависимый электрогенный транспорт  $K^+$  в клетку" (рис. II.I). Согласно такому механизму, глубокую деполяризацию мембраны вызывает "ретранспорт" обратно в клетку  $K^+$ , выход которого из клетки обусловлен электронейтральным потоком  $H^+$  через  $H^+/K^+$  антипортер. Однако верификация того, что именно данный механизм является причиной возрастания  $J_{O_2}$ , требует специальных исследований и не является существенной для наших целей.



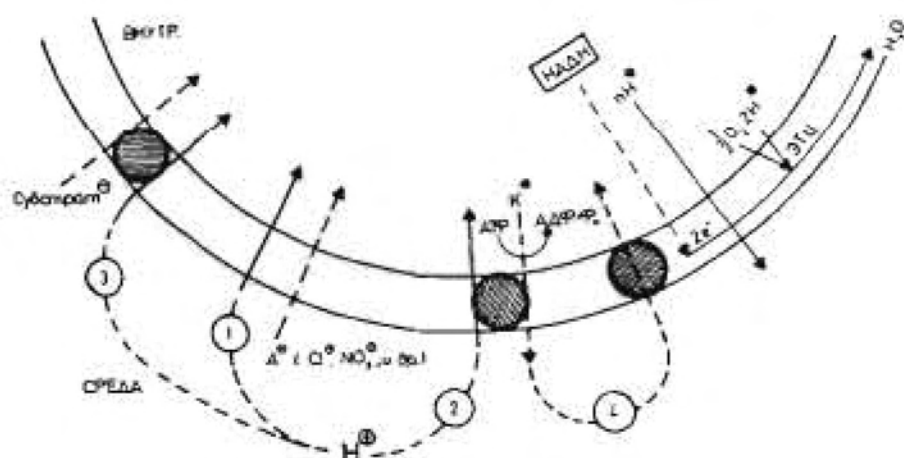


Рис. II.1. Гипотетичная схема путей прохождения  $H^+$  через мембрану *B. flavum* после кислотного пульса:  
 1 - электронейтральный пассивный поток,  
 2 -  $H^+/K^+$  антипорт,  
 3 - электронейтральный  $H^+$ /субстратный симпорт.  
 Электрогенный, АТФ-зависимый транспорт  $K^+$  ( 4 ) предположительно, вызывает возрастание  $J_{O_2}$

Имея численное значение  $L$  мы можем непосредственно оценить долю энергии на поддержание  $\Delta p$ . Это выражается как

$$\beta'_{H^+} = \frac{\text{пассивный поток } H^+}{\text{общий поток } H^+} = \frac{C_{H^+} \cdot \Delta p}{L \cdot \Delta p} = \frac{C_{H^+}}{L} \quad (\text{II.1})$$

По данным глав 7 и 9 легко рассчитать, что это отношение при нейтральных значениях pH среды равно или меньше 10 %, в основном в соответствии с результатами, приведенными в гл. 10. Кроме того, нетрудно связать величины  $N$  и  $L$  со значением протондвижущей силы. В стационарном состоянии выполняется условие:

$$L \cdot \Delta p = 2 \cdot J_{O_2} \cdot N \quad (\text{II.2})$$

где  $J_{O_2}$  - стационарная скорость потребления кислорода.  $J_{O_2}$  и  $\Delta p$  можно мерить независимо от постоянных  $L$ ,  $V_x$  и  $N$  и в итоге дополнительно ограничить допустимый интервал значений  $N$  (также  $V_x$  и  $L$ ). С другой стороны, процедура измерения  $\Delta pH$  и  $\Delta \psi$  неудобна для регистрации протондвижущей силы у клеток непосредственно в ферментаторе: фактически и в этом случае (как и при определении  $H^+/O$ ) мы сталкиваемся с проблемой отнесения данных, полученных на суспензии клеток вне ферментатора к популяции клеток в ферментаторе без возможностей делать коррекцию на соответствующие различия в физиологическом состоянии. Поэтому, возможно, что выражение (II.2) более целесообразно применять для решения обратной задачи - оценки значения  $\Delta p$  у клеток непосредственно в ферментаторе.

Полученное методом импульсов кислоты значение  $N$  около 4 подтверждается как данными метода Митчелла, так и косвенной оценкой по отношению  $P:O$  /227/. Определяя  $H^+/O$  клас-

сическим методом учитывалась компонента  $\text{CN}^-$ -резистентного дыхания, которая практически не участвует в генерировании  $\Delta p$  /40,47/ и у *V. flavum* при низких концентрациях  $\text{O}_2$  в среде составляет до 50 % от всего потребления кислорода /37/. Учет этой компоненты необходим для сравнения данных классического метода с данными методик, в которых вычитывание  $\text{CN}^-$ -резистентного дыхания происходит автоматически (например, как в предлагаемом нами методе, где  $\delta J_b$  есть возрастание "CN<sup>-</sup>чувствительной",  $\Delta p$ -образующей составляющей дыхания).

Отношение  $\text{P:O}$  у *V. flavum*, рассчитанное по  $Y_{\text{X/ATФ}}^{\text{макс.}}$  и  $Y_{\text{X/O}_2}^{\text{макс.}}$  близко к 2 /227/. Учитывая, что стехиометрия  $\text{H}^+/\text{ATФ}$  у большинства изученных бактерий равна 2 /100, 161/, мы таким путем приходим к 4 как наиболее вероятному значению  $\text{H}^+/\text{O}$  стехиометрии дыхательной цепи *V. flavum*. В литературе имеется достаточно данных о  $\text{H}^+/\text{O}$  в различных бактериях /105, 112, 141, 150/ (гл. 4) и значение  $\text{H}^+/\text{O} = 4$  встречается наиболее часто. Как уже отмечалось, значение коэффициента  $\text{H}^+/\text{O} = 4$  использовалось в расчетах энергии на поддержание  $\Delta p$ .

В гл. 10 представлены результаты расчетов энергии на поддержание  $\Delta p$  и  $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$  у *V. flavum*, а также оценка величины энергии на поддержание АТФ-зависимой компоненты  $\Delta p$  у *Z. mobilis*. Основные методические подходы и соответствующие допущения обобщены в табл. II.1. Видно, что интерпретация понятия "энергозатраты на поддержание ионного градиента" и, соответственно, способ расчета этой величины зависит от участия рассматриваемого градиента в энергосопряжении. Если данный ион участвует в процессах активного транспорта и/или синтезе АТФ, то для оценки непродуктив-

Микроорганизм	Градиент	Интерпретация понятия энергозатрат на поддержание	Способ расчета энергозатрат на поддержание	Основные допущения
<i>B. flavum</i>	$\Delta p$	затраты энергии для компенсации пассивного трансмембранного потока $H^+$ по градиенту $\Delta p$	$\beta'_{H^+} = \frac{\Delta p \cdot C_{H^+}}{2N \cdot J_{O_2}}$	Энергия градиента частично расходуется продуктивно (транспорт, синтез АТФ), а частично путем диссипации
	$\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$	1) затраты энергии для компенсации пассивного трансмембранного потока $Na^+$ по градиенту	$\beta'_{Na^+} = \frac{2 \cdot \Delta \tilde{\mu}_{Na^+} \cdot C_{Na^+}}{2N \cdot J_{O_2}}$ (учитывая, что $H^+/Na^+ = 2$ )	"
		2) энергия, расходуемая на генерирование градиента	$\beta'_{Na^+} = \frac{J_{O_2} - J_{O_2}^0}{J_{O_2}}$ где $J_{O_2}^0$ - скорость дыхания в отсутствии градиента	Энергия градиента расходуется только путем непродуктивной диссипации
<i>Z. mobilis</i>	$\Delta p$	Энергия, расходуемая $H^+$ -АТФазой на генерирование АТФ-зависимой компоненты	$\beta'_{H^+} = \frac{Y_{X/ATP}^{DЦГК} - Y_{X/ATP}}{Y_{X/ATP}^{макс.}}$ где $Y_{X/ATP}^{DЦГК}$ - выход биомассы на моль АТФ после добавления ДЦГК	"

ных энергозатрат на поддержание градиента необходимо выяснить величину пассивного потока, а также, в некоторых случаях, учесть поток иона через "мотор" жгутиков. Если же энергия градиента расходуется только путем непродуктивной диссипации, то задача упрощается: непродуктивные затраты в таком случае можно приравнять к общему расходу энергии на генерирование данного градиента. Методически это означает, что можно отключить системы, генерирующие градиент, и фиксировать изменения в экономических коэффициентах, в скорости цыхания и т.д.

Для уяснения величины энергии на поддержание  $\Delta p$  у *V. flavus*, очевидно, применим лишь первый подход. Однако, в случае оценки энергии на поддержание  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$  оправданы обе стратегии, поскольку  $Na^+$  не является центральным энергосопрягающим ионом у этих бактерий. Как уже отмечалось, сравнение значений  $\beta'_{Na^+}$ , полученных обоими путями, показывает, что в пределах ошибки обе эти величины совпадают. Тем самым в какой-то мере подтверждается правильность обоих независимых подходов к определению  $\beta'_{Na^+}$ .

Для *Z. mobilis* показано, что транспорт глюкозы в клетки происходит как облегченная диффузия и не нуждается в энергии / 84 /. Однако, транспорт некоторых аминокислот, возможно зависит от  $\Delta p$  / 84 /. Если последнее верно, то оценка энергии на поддержание  $\Delta p$  по снижению  $\beta'$  после ингибирования  $H^+$ -АТФазы не вполне корректна. Однако нами ранее показано / 21 /, что *Z. mobilis* способны расти в отсутствии  $\Delta p$  (после добавления ХКФ). Это указывает на то, что энергизация транспортных систем не является существенной для роста *Z. mobilis*, или по крайней мере, что транспорт аминокислот в клетку требует достаточно малую долю метаболи-

ческой энергии. Поэтому  $\beta'_{H^+}$  у *Z. mobilis* можно определять с применением второго из вышеупомянутых подходов.

Биологический смысл поддержания  $\Delta pH$  у *Z. mobilis* остается до конца не выясненным. Одна из гипотез утверждает, что активность  $H^+$ -АТФазы (генератора  $\Delta pH$ ) служит "клапаном" для сброса лишнего АТФ и, таким образом, приводит к сбалансированию анаболизма с катаболизмом /151/. С такой точки зрения легко понять высокий процент энергии, затрачиваемой на поддержание  $\Delta pH$ . Однако, усиленный рост биомассы *Z. mobilis* после ингибирования  $H^+$ -АТФазы с ДЦК указывает на то, что "сбрасываемый" АТФ не является лишним для анаболизма. Этот факт свидетельствует, что энергия, затрачиваемая непродуктивно на поддержание  $\Delta pH$  ( $\Delta p$ ) в принципе может быть использована продуктивно.

Возможно, что основной биологический смысл поддержания  $\Delta pH$  у *Z. mobilis* кроется в энергизации системы передвижения. Количественная оценка этого вида непродуктивных энергозатрат (как части общих непродуктивных затрат на поддержание  $\Delta p$ ) требует дальнейших исследований.

Полученные нами данные представляют интерес, в первую очередь, в контексте общего уровня непродуктивных затрат энергии. Поэтому следует вкратце остановиться на этой интегральной характеристике энергетике *B. flavum* и *Z. mobilis*. Величина непродуктивных энергозатрат  $\beta'$  для *Zygomonas mobilis* уже приведена в гл. 10 и составляет примерно 80 % от всего энергопотребления клеток. Видно, что энергозатраты на поддержание ДЦК-чувствительной компоненты  $\Delta p$  представляют собой большую часть от этой величины. Конечно, необходимо учитывать, что *Zygomonas mobilis* выращивались на богатой сре-

це. Возможно, что на минимальной среде клетки не могут расходовать столько энергии на поддержание  $\Delta p$ , т.е. наши данные необходимо отнести к конкретному физиологическому состоянию. Данные о непродуктивных энергозатратах у *B. flavum* и их зависимости от скорости протока в хеостатном культивировании при нейтральных значениях pH среды можно найти в работе /53/. При  $D = 0,15 \text{ час}^{-1}$  величина  $\beta' = 1 - \frac{Y_{x/o}^{\text{эксн.}}}{Y_{x/o}^{\text{макс.}}}$  составляет примерно 20 %. Следовательно, *B. flavum* в нейтральном диапазоне pH на поддержание  $\Delta p$  затрачивает около 25 % непродуктивно расходуемой энергии. Однако, при кислых pH среды доля энергии на поддержание  $\Delta p$  у *B. flavum* существенно возрастает и становится доминирующей компонентой всех непродуктивных энергозатрат. У клеток в состоянии 3, по-видимому, даже происходит некоторое перераспределение энергозатрат в пользу энергии на поддержание  $\Delta p$  на фоне постоянной или даже сниженной скорости общего производства энергии в кислой области pH. Возрастание энергии на поддержание  $\Delta p$  в неблагоприятных условиях говорит о физиологической важности поддержания достаточно высоких значений  $\Delta p$ , что и следует из предполагаемой роли протондвижущей силы в энергетике у аэробных бактерий /66,157,216/.

В заключение отметим, что учет и минимизация расхода энергии на поддержание  $\Delta p$  и  $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$  несомненно может служить повышению экономичности биотехнологических процессов. Исследования зависимости ионных градиентов и ионной проницаемости мембран у различных продуцентов от условий культивирования с выявлением при этом общих закономерностей позволят целенаправленно минимизировать величину непродуктивных энергозатрат.

## ВЫВОДЫ

1. Исследована величина протондвижущей силы у *Brevibacterium flavum*.

Показано, что величина  $\Delta\psi$  у *B. flavum* существенно зависит от физиологического состояния клеток. У клеток в состоянии 3 (без дыхательного контроля)  $\Delta\psi$  меняется от 0 мВ при pH среды 5,0±5,5 до 180±200 мВ при pH среды > 8. Клетки в состоянии 4 (состояние дыхательного контроля) в интервале pH среды от 5,2 до 7,2 поддерживают постоянное значение  $\Delta\psi$  около 110±120 мВ.

Клетки *B. flavum* не поддерживают строгого гомеостаза внутриклеточного pH: величина их трансмембранного градиента pH во всем упомянутом выше интервале pH среды не превышает 1±1,2 ед.

2. Установлено, что увеличение концентрации биомассы или снижение буферной емкости среды инкубирования у *B. flavum* приводит к возрастанию  $\Delta$  pH и снижению  $\Delta\psi$ . Предполагается, что клетки *B. flavum* способны регулировать величину  $\Delta$  pH в зависимости от отношения буферной емкости среды к общей буферной емкости внутриклеточной фазы.

3. Исследована протондвижущая сила у *Zygomonas mobilis*. Показано, что в интервале pH среды от 3,5 до 5,6 клетки *Z. mobilis* поддерживают  $\Delta$  pH от 2,2 до 0,8 единиц, но не образуют  $\Delta\psi$  обычной полярности.

4. У *Brevibacterium flavum* при pH среды = 6,0±6,5 обнаружен трансмембранный градиент ионов  $\text{Na}^+$  -  $\Delta$  рNa<sup>+</sup> около 1,2±1,4 единиц в интервале концентраций  $\text{Na}^+$  среды от 30 до 80 мМ.

5. Получены данные, указывающие на наличие электрогенного  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  антипортера в плазматической мембране *B. flavum*:

- показан транспорт  $\text{Na}^+$  в клетку после электрической де-



поляризации мембраны;

- продемонстрировано увеличение коэффициента  $H^+$ -проницаемости мембраны в присутствии ионов  $Na^+$  в среде.

Отношение  $\Delta p / (\Delta \tilde{\mu}_{Na^+} / F)$  близко к 1:2, что говорит о возможной стехиометрии антипортера как  $2 H^+ : 1 Na^+$ .

Рассчитан коэффициент проницаемости  $Na^+$  через предполагаемый антипортер -  $L_{Na^+}$ , который оказался в пределах  $0,28-1,00 \mu\text{ моль } Na^+ / \text{г.сек } \Delta p_{Na^+}$ . Оценен верхний предел величины пассивной  $Na^+$ -проницаемости мембраны:

$$C_{Na^+} < 0,07 \frac{\mu\text{ моль } Na^+}{\text{г.сек. } \Delta p_{Na^+}} .$$

6. Изучена зависимость коэффициента пассивной  $H^+$ -проницаемости ( $C_{H^+}$ ) плазматической мембраны *B. flavum* от pH среды в нейтральной и кислой области pH. При нейтральных pH  $C_{H^+}$  находится в пределах  $\sim 0,1+0,5 \mu\text{ моль } H^+ / \text{г.сек. } \Delta pH$ , тогда как при pH ниже  $5,6+5,5$  проницаемость мембраны для  $H^+$  резко возрастает, достигая значений  $C_{H^+} > 2,0$ .

7. Разработан метод определения стехиометрии  $H^+/O$  дыхательной цепи бактерий по характерным кинетикам изменения pH среды и скорости дыхания после импульсного добавления кислоты непосредственно в хемостатной культуре в условиях дыхательного контроля. Для *B. flavum* этим методом получены значения  $H^+/O$  около 4.

8. Оценены непродуктивные затраты энергии на поддержание протондвижущей силы и трансмембранного электрохимического градиента  $Na^+$  у *Brevibacterium flavum* и протондвижущей силы у *Zygomonas mobilis*.

а) непродуктивные затраты энергии на поддержание  $\Delta p$  у *B. flavum*, выраженные в процентах от общего потребления кис-

лорода, составляют от 2,5 % в нейтральной области рН среды до 50 % при рН среды около 5,0÷5,5. Увеличение  $\beta'_{H^+}$  в кислой области рН в первую очередь определяется возрастанием  $C_{H^+}$ ;

б) энергозатраты поддержания  $\Delta\tilde{\mu}_{Na}$  у *V. flavum* составляют около 5÷10 % от общего потребления кислорода;

в) у *Z. mobilis* в условиях роста на богатой среде на поддержание АТФ-зависимой компоненты протондвижущей силы затрачивается более 50 % АТФ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алсите А.Ф., Межиня Г.Р., Осе В.П. Продуценты L-лизина из рода *Brevibacterium* . - Рига: Зинатне, 1978. - 169 с.
2. Бабурин Л.А., Швинка Ю.Э. Ответная реакция хемотропной культуры микроорганизмов в малых возмущениях // Микробный синтез ферментов и получение их препаративных форм. - Рига: Зинатне, 1983. - С. 79-89.
3. Бабурин Л.А., Швинка Ю.Э., Калниениекс У.З., Иганов В.Н. Метод оценки эффективности использования источника углерода при росте гетеротрофных бактерий // Микробиол. журн. - 1987. - Т. 49. - № 6. - С. 90-93.
4. Бекер М.Е., Клишаре А.А., Швинка Ю.Э., Панкова Л.М. Штамм бактерий *Zygomonas mobilis* ПЗ - продуцент этанола // Авт. свид. № ПИ0800 - Бюл. изобр. 1984. - № 32. - С. 77.
5. Варданын С.М., Гончегулян А.Е., Петросян М.К., Мартиросов С.И. Механизм быстрой гиперполяризации у *Brevibacterium flavum* // Биофизика. - 1986. - Т. 31. - С. 993-996.
6. Варданын А.Г., Мартиросов С.М. Ионный обмен и гиперполяризация мембраны *Brevibacterium flavum* при аппликации метаболизируемых сахаров // Биофизика. - 1986. - Т. 31. - С. 833-837.
7. Великая Е.И., Сухоцол В.Ф., Томашевич В.К. Общие методы контроля броцильных производств. - М.: Пищевая промышленность, 1964. - 273 с.
8. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука, 1980. - 320 с.
9. Генкин М.В., Доценко О.Е., Давыдов Р.М., Крылов О.В. Влияние различных факторов на кинетику исчезновения трансмембранного градиента pH в липосомах // Молекулярная биология. - 1986. -

Т. 20. - С. 751-760.

10. Головлев Е.Д. Биология сапрофитных микобактерий. Автореф. дис. д-ра биол. наук. - Пущино, 1983. - 37 с.
11. Гринюс Л.Л. Транспорт макромолекул у бактерий. - М.:Наука, 1986. - 240 с.
12. Гринюс Л.Л., Даугелавичюс Р.Ю., Алькимавичюс Г.А. Исследование мембранного потенциала клеток *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* методом проникающих ионов // Биохимия. - 1980. - Т. 45. - № 9. - С. 1609-1618.
13. Гуревич Ю.Л. Устойчивость и регуляция размножения в микробных популяциях. - Новосибирск: Наука, 1984. - 161 с.
14. Ерошин В.К. Основы материально-энергетического баланса роста микроорганизмов // Лимитирование и ингибирование микробиологических процессов. - Пущино, 1980. - С. 34-55.
15. Иванов В.Н. Затраты энергии на потребление минеральных компонентов среды клетками микроорганизмов // Микробиол. журн.- 1986. - Т. 48. - № 4. - С. 3-8.
16. Иванов В.Н. Энергетика роста микроорганизмов. - Киев : Наукова Думка, 1981. - 140 с.
17. Иванов В.Н., Стабникова Е.В. Стехиометрия и энергетика микробиологических процессов. - Киев : Наукова Думка, 1987. - 152 с.
18. Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов. - М.: Изд-во АН СССР, 1963. - 315 с.
19. Калнениекс У.З., Бабурин Л.А. Протондвижущая сила у *Brevibacterium flavum* // 5-я республиканская конференция молодых ученых-химиков ЭССР. - Таллин, 1983. - С. 56.
20. Калнениекс У.З., Банковский В.К., Швинка Ю.Э., Бабурин Л.А. Определение внутриклеточного рН бактерий по изменениям рН

- срецы в ходе обработки клеток тритоном X-100 // Микробный синтез ферментов и получение их препаративных форм. - Рига: Зинатне, 1983. - С. 90-97.
21. Калнениекс У.З., Панкова Л.М., Швинка Ю.Э. Энергетические затраты на поддержание трансмембранного градиента рН у *Zygomonas mobilis* // Микробиология. - 1987. - Т.56. - С. 770-773.
22. Калнениекс У.З., Тома М.К., Швинка Ю.Э. Влияние пентахлор-фенола на протондвижущую силу, потребление кислорода и  $H^+$ -проницаемость мембран у *Brevibacterium flavum* // Известия АН ЛатвССР. - 1985. - № II. - С. 72-76.
23. Квасников Н.И., Ногина Т.М., Нестеренко О.А., Панченко Л.П., Розынов Б.В., Коронелли Т.В. О систематическом положении продуцента лизина *Brevibacterium flavum* // Микробиология - 1984. - Т. 53. - С. 93-97.
24. Кеплен С.Р., Эссиг Э. Биоэнергетика и линейная термодинамика необратимых процессов. - М.: Мир, 1986. - 384 с.
25. Минкевич И.Г., Ерошин В.К. Закономерности внутриклеточного материально-энергетического баланса роста микроорганизмов // Успехи соврем. биологии. - 1976. - Т. 82. - Вып. I. - С. 103-116.
26. Минкевич И.Г. Физико-химические основы материально-энергетического баланса клеточного метаболизма // Лимитирование и ингибирование микробиологических процессов. - Пущино, 1980. - С. 55-101.
27. Николаев И.А. Измерение количества теплоты, выделяемой микроорганизмами в процессе культивирования в лабораторном ферментере // Ферментационная аппаратура. - Рига: Зинатне, 1980. - С. 81-89.

28. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. - М.: Мир, 1978. - 331 с.
29. Петров В.В., Огороков Л.А. Увеличение неспецифической протонной проницаемости плазмалеммы как возможная причина токсического воздействия этанола на дрожжевую клетку // Докл. АН СССР - 1986. - Т. 289. - С. 1006-1009.
30. Пучков Е.О., Косарев Н.В., Петухова Н.М. Об участии ионов  $K^+$  в анаэробном гликолизе у бактерии *Escherichia coli* // Биохимия - 1982. - Т.47. - С. 1522-1525.
31. Работнова И.Л., Позмогова И.Н., Баснакьян И.А. Хемостатное и периодическое культивирование при изучении физиологии микроорганизмов // Итоги науки и техники. Микробиология. - М.: Наука, 1981. - Т. II. - С. 4-54.
32. Работнова И.Л., Позмогова И.Н. Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов. - М.: Наука, 1979. - 208 с.
33. Руклиш М.П. Кинетические характеристики транспорта глюкозы у *Brevibacterium flavum* // Микробиология - 1987. - Т. 56. - С. 21-26.
34. Руклиш М.П., Дунце М.Э., Леване В.А., Калниня Р.В. Особенности функционирования цикла трикарбоновых кислот у *Brevibacterium flavum* и *Micrococcus glutanicus* // Микробиология - 1987. - Т. 56. - С. 759-763.
35. Скулачев В.П. Трансформация энергии в биомембранах. - М.: Наука, 1972. - 204 с.
36. Талыбов Ш.Т., Харатьян Е.Э., Капрельянц А.С., Островский Д.Н. Генерация мембранного потенциала и синтез АТФ мембранными препаратами с нарушенным барьером проницаемости из бактерий *Staphylococcus aureus* (к проблеме "локального сопряжения")

// Биол. мембр. - 1986. - Т. 3. - № 6. - С. 575-591.

37. Тома М.К., Швинка Ю.Э., Руклиш М.П., Саксе А.К., Бабурин Л.А. Цианидрезистентное потребление кислорода у лизинсинтезирующих бактерий *Brevibacterium flavum* 22 ЛД // Прикладная биохимия и микробиология - 1984. - Т. 20. - С. 95-100.
38. Трчунян А.А., Дургарьян С.С., Оганджян Е.С., Тер-Никогосян В.А., Варданян А.Г., Оганесян М.И., Петросян Л.С., Ванян П.А., Карагулян Э.А., Мартиросов С.М. Исследование способности анаэробно выращенных бактерий обменивать  $2n^+$  клетки на  $K^+$  среды и поддерживать высокое распределение  $K^+$  между клеткой и средой // Биол. науки - 1986. - № 12. - С. 82-88.
39. Швинка Ю.Э. Физиологические аспекты регуляции выхода продуктов бактериального синтеза. - Докт. дисс. - Рига, 1986.
40. Швинка Ю.Э. Физиологические и биотехнологические аспекты регуляции выхода продуктов, синтезируемых микроорганизмами // Известия АН ЛатвССР. - 1984. - № 10. - С. 56-71.
41. Швинка Ю.Э., Бабурин Л.А., Виестур У.Э. Чувствительность процесса поглощения кислорода у *Brevibacterium flavum* к изменениям pH среды и действию разобщителя окисления и фосфорилирования // Микробиология - 1982. - Т. 51. - С. 926-931.
42. Швинка Ю.Э., Бабурин Л.А., Калнениекс У.З. Способ определения концентрации источника углерода при культивировании микроорганизмов // Заявка № 4117988/31-13.
43. Эрикссон Л., Ерошин В.К. Определение и использование коэффициентов выходов при производстве биомассы // Микробиол. пром-сть. - 1978. - № 7. - С. 3-8.
44. Addanki S., Cahill F.D., Sotos J.F. Determination of intramitochondrial pH and intramitochondrial-extramitochondrial

- pH gradient of isolated heart mitochondria by the use of 5,5-dimethyl-2,4-oxazolidinedione // J. Biol. Chem. - 1968. - Vol. 243. - P. 2337-2348.
45. Ahmed S., Booth I.R. Quantitative measurement of the proton-motive force and its relation to steady state lactose accumulation in *Escherichia coli* // Biochem. J. - 1981. - Vol. 200. - P. 573-581.
46. Ahmed S., Booth I.R. The effect of  $\beta$ -galactosides on the proton-motive force and growth of *Escherichia coli* // J. Gen. Microbiol. - 1983. - Vol. 129. - P. 2521-2529.
47. Akimenko V.K., Golovchenko N.P., Medentsev A.G. The absence of energy conservation coupled with electron transfer via the alternative pathway in cyanide-resistant yeast mitochondria // Biochim. Biophys. Acta - 1979. - Vol. 545. - P. 398-403.
48. Alexander B., Leach S., Ingledew J.W. The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans* // J. Gen. Microbiol. - 1987. - Vol. 133. - P. 1171-1179.
49. Al-Shawi H.K., Brand M.D. Steady-state H/O stoichiometry of liver mitochondria // Biochem. J. - 1981. - Vol. 200. - P. 539-546.
50. Arents J.C., van Dekken H., Hellingwerf K.J., Westerhoff H.V. Linear relations between proton current and pH gradient in bacteriorhodopsin liposomes // Biochemistry - 1981. - Vol. 20. - P. 5114-5123.
51. Arshavsky V.Yu., Baryshev V.A., Brown I.I., Glagolev A.N., Skulachev V.P. Transmembrane gradient of K and Na ions as



- an energy buffer in *Halobacterium halobium* // FEBS Lett. - 1981. - Vol. 133. - P. 22-26.
52. Axe D.D., Bailey J.E. Application of phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy to investigate plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism // Biotechnol. Lett. - 1987. - Vol. 9. - P. 83-88.
53. Baburin L.A., Shvinka J.E., Ruklisha M.P., Viesturs U.E. Gas balance method for testing of microbial growth efficiency after carbon substrate pulse // Acta biotechnol. - 1986. - Vol. 6. - P. 123-128.
54. Bakker E.P., Mangerich W.E. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport // J. Bacteriol. - 1981. - Vol. 147. - P. 820-826.
55. Bakker E.P., Harold F.M. Energy coupling to potassium transport in *Streptococcus faecalis*. Interplay of ATP and the protonmotive force // J. Biol. Chem. - 1980. - Vol. 255. - P. 433-440.
56. Bakker E.P. Membrane potential in a potassium transport-negative mutant of *Escherichia coli* K-12. The distribution of rubidium in the presence of valinomycin indicates a higher potential than that of the tetraphenylphosphonium cation // Biochim. Biophys. Acta - 1982. - Vol. 681. - P. 474-483.
57. Balaz S., Sturdik E., Durcova E., Antalik M., Sulo P. Quantitative structure-activity relationship of carbonyl-cyanide phenylhydrazones as uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation // Biochim. Biophys. Acta - 1986. - Vol. 851. - P. 93-98.
58. Barrow K.D., Collins J.G., Norton R.S., Rogers P.L., Smith G.M. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance studies of the

- fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis* // J. Biol. Chem. - 1984. - Vol. 259. - P. 5711-5716.
59. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th edition. Coeditors: R.E.Buchanan, N.E.Gibbons. - Baltimore, 1974.
60. Biegel C.M., Gould J.M. Kinetics of hydrogen ion diffusion across phospholipid vesicle membranes // Biochemistry - 1981. - Vol. 20. - P. 3474-3479.
61. Boogerd F.C., van Verseveld H.W., Torenvliet D., Braster H., Stouthamer A.H. Reconsideration of the efficiency of energy transduction in *Paracoccus denitrificans* during growth under a variety of culture conditions // Arch. Microbiol. - 1984. - Vol. 139. - P. 344-350.
62. Booth I.R., Mitchell W.J., Hamilton W.A. Quantitative analysis of proton-linked transport systems. The lactose permease of *Escherichia coli* // Biochem. J. - 1979. - Vol. 182. - P. 687-696.
63. Boron W.P. Transport of H and of ionic weak acids and bases // J. Membrane Biol. - 1983. - Vol. 72. - P. 1-16.
64. Boyer P.D., Chance B.C., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E.C. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation // Ann. Rev. Biochem. . 1977. - Vol. 46. - P. 955-1026.
65. Bramhall J. Conductance routes for protons across membrane barriers // Biochemistry - 1987. - Vol. 26. - P. 2848-2855.
66. Brey R.N., Rosen B.P., Sorensen E.N. Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*. Properties of the potassium/proton antiporters // J. Biol. Chem. - 1980. - Vol. 255. - P. 39-44.
67. Brooks J.D., MacLennan D.G. Design of laboratory continuous-culture equipment for accurate gaseous metabolism measure-

- ments // Biotechnol. Bioeng. - 1982. - Vol. 24. - P. 847-856.
68. Brown G.C., Brand M.D. Changes in permeability to protons and other cations at high protonmotive force in rat liver mitochondria // Biochem. J. - 1986. - Vol. 234. - P. 75-81.
69. Brand M.D., Reynafarje B., Lehninger A.L. Re-evaluation of the H/site ratio of mitochondrial electron transport with the oxygen pulse method // J. Biol. Chem. - 1976. - Vol. 251. - P. 5670-5679.
70. Burstein C., Tiankova L., Kepes A. Respiratory control in *Escherichia coli* K-12 // Eur. J. Biochem. - 1979. - Vol. 94. - P. 387-392.
71. Campbell-Burk S.L., Shulman R.G. High-resolution NMR studies of *Saccharomyces cerevisiae* // Ann. Rev. Microbiol. - 1987. - Vol. 41. - P. 595-616.
72. Carr J.G. The genus *Zymomonas* // The Prokaryotes. - Springer-Verlag: Berlin, New York, Heidelberg, 1981. - Vol. 2. - P. 1349-1354.
73. Castle A.M., Macnab R.M., Shulman R.G. Measurement of intracellular sodium concentration and sodium transport in *Escherichia coli* by sodium-23 nuclear magnetic resonance // J. Biol. Chem. - 1986. - Vol. 261. - P. 3288-3294.
74. Chance B., Williams G.R. The respiratory chain and oxydative phosphorylation // Adv. Enzymol. - 1956. - Vol. 17. - P. 65-102.
75. Cogley J.G., Cox J.C. Energy conservation in acidophilic bacteria // Microbiol. Rev. - 1983. - Vol. 47. - P. 579-595.
76. Collins S.H., Hamilton W.A. Magnitude of protonmotive force in respiring *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* //

- J. Bacteriol. - 1976. - Vol. 126. - P. 1224-1231.
77. Cooney Ch.L., Wang H.Y., Wang D.I. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters // Biotechnol. Bioeng. - 1977. - Vol. 19. - P. 55-67.
78. Cruzeiro L., DaSilva K.M.C. Quantum mechanical model for passive transport through lipid bilayer membranes // NATO ASI Ser., Ser. A. (Recent Adv. Biol. Membr. Stud.) - 1985. - Vol. 91. - P. 165-178.
79. Davenport J.W. Double inhibitor titrations of photophosphorylation are consistent with delocalised coupling // Biochim. Biophys. Acta - 1985. - Vol. 900. - P. 300-307.
80. Dawes E.A., Ribbons D.W. Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria // Bacteriol. Rev. - 1964. - Vol. 28. - P. 126-149.
81. Dawson M.J., Jones C.W. Respiration-linked proton translocation in the obligate methylotroph *Methylophilus methylotrophus* // Biochem. J. - 1981. - Vol. 194. - P. 915-924.
82. Deamer D.W., Nichols J.W. Proton-hydroxide permeability of liposomes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1983. - Vol. 80. - P. 165-168.
83. Deutsch C.J., Kula T. Transmembrane electrical and pH gradients of *Paracoccus denitrificans* and their relationship to oxydative phosphorylation // FEBS Lett. - 1978. - Vol. 87. - P. 145-151.
84. Dimarco A.A., Romano A.H. D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis* // Appl. Environ. Microbiol. - 1985. - Vol. 49. - P. 151-157.
85. Dimroth P., Thomer A. Citrate transport in *Klebsiella pneumoniae* // Biol. Chem. Hoppe-Seyler - 1986. - Vol. 307. - P. 813-823.

86. Dioloz P., Moreau F. Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria // Biochem. Biophys. Acta - 1985. - Vol. 806. - P. 56-63.
87. Drachev A.L., Markin V.S., Skulachev V.P.  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -buffering by Na and K gradients in bacteria. Model and experimental systems // Biochem. Biophys. Acta - 1985. - Vol. 811. - P. 197-215.
88. Elferink M.G.L., Hellingwerf K.J., Konings W.N. The relation between electron transfer, proton-motive force and energy-consuming processes in cells of *Rhodospseudomonas sphaeroides* // Biochem. Biophys. Acta - 1986. - Vol. 848. - P. 58-68.
89. Epstein W. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli* // FEMS Microbiol. Rev. - 1986. - Vol. 39. - P. 73-78.
90. Erickson L.E., Minkevich I.G., Eroshin V.K. Application of mass and energy balance regularities in fermentation // Biotechnol. Bioeng. - 1978. - Vol. 20. - P. 1595-1621.
91. Erickson L.E., Selga S.E., Viesturs U.E. Application of mass and energy balance regularities to product formation // Biotechnol. Bioeng. - 1978. - Vol. 20. - P. 1623-1638.
92. Eroshin V.K., Minkevich I.G. On the upper limit of mass yield of an organic product from an organic substrate // Biotechnol. Bioeng. - 1982. - Vol. 24. - P. 2263-2265.
93. Felle H., Porter J.S., Slayman C.L., Kaback H.R. Quantitative measurements of membrane potential in *Escherichia coli* // Biochemistry - 1980. - Vol. 19. - P. 3585-3590.

94. Fillingame R.H. Biochemistry and genetics of bacterial H-translocating ATPases // Curr. Top. Bioenerg. - 1981. - Vol. 11. - P. 35-106.
95. Friedberg I., Kaback H.R. Electrochemical proton gradient in *Micrococcus lysodeikticus* cells and membrane vesicles // J. Bacteriol. - 1980. - Vol. 142. - P. 651-658. .
96. Garcia M.L., Guffanti A.A., Krulwich T.A. Characterization of the Na/H antiporter of alkalophilic bacilli *in vivo*:  $\Delta\psi$ -dependent Na efflux from whole cells // J. Bacteriol. - 1983. - Vol. 156. - P. 1151-1157.
97. Garlid K.D., Nakashima R.A. Studies on the mechanism of uncoupling by amine local anesthetics. Evidence for mitochondrial proton transport by lipophilic ion pairs // J. Biol. Chem. - 1983. - Vol. 258. - P. 7974-7980.
98. Ghazi A., Delamourd L., Schechter E. Absence of a unique relationship between active transport of lactose and protonmotive force in *E.coli* // FEBS Lett. - 1986. - Vol. 209. - P. 325-329.
99. Ghazi A., Schechter E., Letellier L., Labedan B. Probes of membrane potential in *Escherichia coli* cells // FEBS Lett. - 1981. - Vol. 125. - P. 197-200.
100. Gober J.W., Kashket E.R. H/ATP stoichiometry for cowpea *Rhizobium* sp. strain 32H1 cells grown under nitrogen-fixing and nitrogen-nonfixing conditions // J. Bacteriol. - 1984. - Vol. 160. - P. 216-221.
101. Gottwald M., Gottschalk G. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation // Arch. Microbiol. - 1985. - Vol. 143. - P. 42-46.

102. Gowrishankar J. Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation // J. Bacteriol. - 1985. - Vol. 164. - P. 434-445.
103. Guffanti A.A., Hou E. The effect of pH on passive proton conductance of *Bacillus acidocaldarius* // FEMS Microbiol. Lett. - 1987. - Vol. 41. - P. 275-278.
104. Hamilton W.A. Energy coupling in microbial transport // Adv. Microbial Physiol. - 1975. - Vol. 12. - P. 1-48.
105. Hammond R.C., Rees B., Higgins I.J. Factors affecting proton translocation by facultative methylotrophs // Biochim. Biophys. Acta - 1981. - Vol. 638. - P. 22-29.
106. Hanstein W.G. Uncoupling of oxidative phosphorylation // Biochim. Biophys. Acta - 1976. - Vol. 456. - P. 129-148.
107. Harold F.M. Membranes and energy transduction in bacteria // Curr. Top. Bioenerg. - 1977. - Vol. 6. - P. 83-149.
108. Harold F.M., van Brunt J. Circulation of H and K across the plasma membrane is not obligatory for bacterial growth // Science - 1977. - Vol. 197. - P. 372-373.
109. Harrison D.E.F. The regulation of respiration rate in growing bacteria // Adv. Microb. Physiol. - 1976. - Vol. 14. - P. 243-314.
110. Harrison D.E.F., Loveless J.E. The effect of growth conditions on respiratory activity and growth efficiency in facultative anaerobes grown in chemostat culture // J. Gen. Microbiol. - 1971. - Vol. 68. - P. 35-43.
111. Heinz E., Westerhoff H.V., van Dam K. The residual protonmotive force in mitochondria after an oxygen pulse // Eur. J. Biochem. - 1981. - Vol. 115. - P. 107-113.

112. Hollocker T.C., Kumar S., Nicholas D.J.D. Respiration-dependent proton translocation in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* during inorganic oxidations // J. Bacteriol. - 1982. - Vol. 149. - P. 1013-1020.
113. Huang L., Gibbins L.N., Forsberg C.W. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions // Appl. Environ. Microbiol. - 1985. - Vol. 50. - P. 1043-1047.
114. Hueting S., de Lange T., Tempest D.W. Energy requirement for maintenance of the transmembrane potassium gradient in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418: a continuous culture study // Arch. Microbiol. - 1979. - Vol. 123. - P. 183-188.
115. Hueting S., Tempest D.W. Influence of acetate on the growth of *Candida utilis* in continuous culture // Arch. Microbiol. - 1977. - Vol. 115. - P. 73-78.
116. Ishikawa T., Hama H., Tsuda M., Tsuchiya T. Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* possessing defective sodium/proton antiporter // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol. 162. - P. 7443-7446.
117. Jackson J.B. Evidence that the ionic conductivity of the cytoplasmic membrane of *Rhodospseudomonas capsulata* is dependent upon membrane potential // FEBS Lett. - 1982. - Vol. 139-143.
118. Jones C.W., Brice J.M., Downs A.J., Drozd J.W. Bacterial respiration-linked proton translocation and its relationship to respiratory-chain compositions // Eur. J. Biochem. - 1975. - Vol. 52. - P. 265-273.



119. Jones C.W., Brice J.M., Edwards C. The effect of respiratory chain composition on the growth efficiencies of aerobic bacteria // Arch. Microbiol. - 1977. - Vol. 115. - P. 85-93.
120. Kakinuma Y., Harold F.M. ATP-driven exchange of Na and K ions by *Streptococcus faecalis* // J. Biol. Chem. - 1985. - Vol. 260. - P. 2086-2091.
121. Kalnenieks U., Vilu R. Effect of tetraphenylphosphonium concentration on the apparent value of transmembrane electric potential in *Escherichia coli* // Studia Biophysica - 1986. - Vol. 113. - P. 213-220.
122. Kashket E.R. Effects of aerobiosis and nitrogen source on the proton motive force in growing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* cells // J. Bacteriol. - 1981. - Vol. 146. - P. 377-384.
123. Kashket E.R. Proton motive force in growing *Streptococcus lactis* and *Staphylococcus aureus* cells under aerobic and anaerobic conditions // J. Bacteriol. - 1981. - Vol. 146. - P. 369-376.
124. Kashket E.R. Stoichiometry of the H-ATPase of *Escherichia coli* cells during anaerobic growth // FEBS Lett. - 1983. - Vol. 154. - P. 343-346.
125. Kashket E.R. Effects of K and Na on the proton motive force of respiring *Escherichia coli* at alkaline pH // J. Bacteriol. - 1985. - Vol. 163. - P. 423-429.
126. Kashket E.R., Blanchard A.G., Metzger W.C. Proton motive force during growth of *Streptococcus lactis* cells // J. Bacteriol. - 1980. - Vol. 143. - P. 128-134.

127. Keddie R.M., Jones D. Saprophytic, aerobic coryneform bacteria // The Prokaryotes. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 1981. - Vol. 2. - P. 1838-1877.
128. Kell D.E. On the functional proton current pathway of electron transport phosphorylation. An electrodic view // Biochim. Biophys. Acta - 1979. - Vol. 549. - P. 55-99.
129. Kell D.B., Clarke D.J., Morris J.G. On proton-coupled information transfer along the surface of biological membranes and the mode of action of certain colicins // FEMS Microbiol. Lett. - 1981. - Vol. 11. - P. 1-11.
130. Kell D.B., Peck M.V., Rodger G., Morris J.G. On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum* // Biochim. Biophys. Res. Commun. - 1981. - Vol. 99. - P. 81-88.
131. Kihara M., Macnab R.M. Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak-acid repellent taxis of bacteria // J. Bacteriol. - 1981. - Vol. 145. - P. 1209-1221.
132. Kinoshita N., Unemoto T., Kobayashi H. Proton motive force is not obligatory for growth of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. - 1984. - Vol. 160. - P. 1074-1077.
133. Kitada M., Horikoshi K. Further properties of sodium ion-stimulated  $\alpha$ -[1-<sup>14</sup>C]aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic *Bacillus* species // J. Biochem. - 1980. - Vol. 87. - P. 1279-1284.
134. Kobayashi H. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm // J. Biol. Chem. - 1985. - Vol. 260. - P. 72-76.
135. Kobayashi H., Unemoto T. *Streptococcus faecalis* mutants defective in regulation of cytoplasmic pH // J. Bacteriol. -

1980. - Vol. 143. - P. 1187-1193.
136. Koyama N., Ishikawa Y., Nosoh Y. Dependence of the growth of pH-sensitive mutants of a facultatively alkalophilic *Bacillus* on the regulation of cytoplasmic pH // FEMS Microbiol. Lett. - 1986. - Vol. 34. - P. 195-198.
137. Koyama N., Nosoh Y. Effect of potassium and sodium ions on the cytoplasmic pH of an alkalophilic *Bacillus* // Biochim. Biophys. Acta - 1985. - Vol. 812. - P. 206-212.
138. Koyama N., Wakabayashi K., Nosoh Y. Effect of potassium on the membrane functions of an alkalophilic *Bacillus* // Biochim. Biophys. Acta - 1987. - Vol. 898. - P. 293-298.
139. Krab K., Soos J., Wilkström M. The H/O ratio of proton translocation linked to the oxidation of succinate by mitochondria // FEBS Lett. - 1984. - Vol. 178. - P. 187-192.
140. Krishnamoorthy G., Hinkle P.C. Non-ohmic proton conductance of mitochondria and liposomes // Biochemistry - 1984. - Vol. 23. - P. 1640-1645.
141. Kristjanssen J.K., Walter B., Hollocher T.C. Respiration-dependent proton translocation and the transport of nitrate and nitrite in *Paracoccus denitrificans* and other denitrifying bacteria // Biochemistry - 1978. - Vol. 17. - P. 5014-5019.
142. Kroll R.G., Booth I.R. The role of potassium in the generation of a pH gradient in *Escherichia coli* // Biochem. J. - 1981. - Vol. 198. - P. 691-698.
143. Kroll R.G., Booth I.R. The relationship between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in *Escherichia coli* // Biochem. J. - 1983. - Vol. 216. - P. 709-716.

144. Krulwich T.A. Na/H antiporters // *Biochim. Biophys. Acta* - 1983. - Vol. 726. - P. 245-264.
145. Krulwich T.A., Agus R., Shneier M., Guffanti A.A. Buffering capacity of *Bacilli* that grow at different pH ranges // *J. Bacteriol.* - 1985. - Vol. 162. - P. 768-772.
146. Krulwich T.A., Federbush J.G., Guffanti A.A. Presence of a nonmetabolizable solute that is translocated with Na enhances Na-dependent pH homeostases in an alkalophilic *Bacillus* // *J. Biol. Chem.* - 1985. - Vol. 260. - P. 4055-4058.
147. Kumar S., Nicholas D.J.D. Proton electrochemical gradient in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* // *J. Bacteriol.* - 1983. - Vol. 154. - P. 65-71.
148. Kumar S., Nicholas D.J.D. Na and K transport in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* // *Biochim. Biophys. Acta* - 1984. - Vol. 765. - P. 268-274.
149. Law B.P., John P. Effect of the lactoperoxidase bactericidal system on the formation of the electrochemical proton gradient in *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1981. - Vol. 10. - P. 67-70.
150. Lawford H.G., Haddock B.A. Respiration-driven proton translocation in *Escherichia coli* // *Biochem. J.* - 1973. - Vol. 136. - P. 217-220.
151. Lazdunski A., Belaich J.P. Uncoupling in bacterial growth: ATP pool variation in *Z. mobilis* cells in relation to different uncoupling conditions of growth // *J. Gen. Microbiol.* - 1972. - Vol. 70. - P. 187-197.
152. Lehninger A.L., Reynafarje B., Hendler R.W., Shrager R.I.

- The H/O ratio of proton translocation linked to the oxidation of succinate my mitochondria. Reply to a commentary // FEBS Lett. - 1985. - Vol. 192. - P. 173-178.
153. Lemasters J.J. ATP stoichiometries of mitochondrial oxidative phosphorylation: a reevaluation by nonequilibrium thermodynamics // Comments Mol. Cell. Biophys. - 1985. - Vol. 3. - P. 99-122.
154. Lewls R.J., Krulwich T.A., Reynafarje B., Lehninger A.L. Respiration-dependent proton translocation in alkalophilic *Bacillus firmus* RAB and its nonalkalophilic mutant derivative // J. Biol. Chem. - 1983. - Vol. 258. - P. 2109-2111.
155. Lolkema J.S., Hellingwerf K.J., Konings W.N. The effect of "probe binding" on the quantitative determination of the proton-motive force in bacteria // Biochim. Biophys. Acta - 1982. - Vol. 681. - P. 85-94.
156. Lundin A., Richardson A., Thore A. Continuous monitoring of ATP converting reactions by purified firefly luciferase // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 75. - P. 611-620.
157. Maloney P.C. Coupling between H entry and ATP formation in *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Res. Commun. - 1978. - Vol. 83. - P. 1496-1501.
158. Maloney P.C. Membrane H conductance of *Streptococcus lactis* // J. Bacteriol. - 1979. - Vol. 140. - P. 197-205.
159. Maloney P.C. Coupling between H entry and ATP synthesis in bacteria // Curr. Top. Membr. Transp. - 1982. - Vol. 16. - P. 175-193.
160. Maloney P.C. Relationship between phosphorylation potential and electrochemical H gradient during glycolysis in *Streptococcus lactis* // J. Bacteriol. - 1983. - Vol. 153. -

- P. 1461-1470.
161. Maloney P.C., Hansen F.C. Stoichiometry of proton movements coupled to ATP synthesis driven by a pH gradient in *Streptococcus lactis* // J. Membrane Biol. - 1982. - Vol. 66. - P. 63-75.
162. Maloney P.C., Schattshneider S. Voltage sensitivity of the proton-translocating adenosine-5'-triphosphatase in *Streptococcus lactis* // FEBS Lett. - 1980. - Vol. 110. - P. 337-340.
163. Manson M.D., Tedesco P.M., Berg H.C. Energetics of flagellar rotation in bacteria // J. Mol. Biol. - 1980. - Vol. 138. - P. 541-561.
164. Manson M.D., Tedesco P., Berg H.C., Harold F.M., van der Drift C. A protonmotive force drives bacterial flagella // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1977. - Vol. 74. - P. 3060-3064.
165. McCarthy J.E.G., Ferguson S.J. Characterisation of membrane vesicles from *Paracoccus denitrificans* and measurements of the effect of partial uncoupling on their thermodynamics of oxidative phosphorylation // Eur. J. Biochem. - 1983. - Vol. 132. - P. 417-424.
166. McLaggan D., Selwyn M.J., Dawson A.P. Dependence on Na of control of cytoplasmic pH in a facultative alkalophile // FEBS Lett. - 1984. - Vol. 165. - P. 254-258.
167. McLaughlin S.G.A., Dilger J. Transport of protons across membranes by weak acids // Physiol. Rev. - 1980. - Vol. 60. - P. 825-863.
168. Menzel U., Gottschalk G. The internal pH of *Acetobacterium wieringae* and *Acetobacter aceti* during growth and production

- of acetic acid // Arch. Microbiol. - 1985. - Vol. 143. - P. 47-51.
169. Meyer D.J., Jones C.W. Oxidative phosphorylation in bacteria which contain different cytochrome oxidases // Eur. J. Biochem. - 1973. - Vol. 36. - P. 144-151.
170. Michels M., Bakker E.P. Generation of a large, protonophore-sensitive proton motive force and pH difference in the acidophilic bacteria *Thermoplasma acidophilum* and *Bacillus acidocaldarius* // J. Bacteriol. - 1985. - Vol. 161. - P. 231-237.
171. Michel H., Oesterhelt D. Electrochemical proton gradient across the cell membrane of *Halobacterium halobium*: effect of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, relation to intracellular adenosine triphosphate, adenosine diphosphate and phosphate concentration, and influence of the potassium gradient // Biochemistry - 1980. - Vol. 19. - P. 4607-4614.
172. Michel H., Oesterhelt D. Electrochemical proton gradient across the cell membrane of *Halobacterium halobium*: comparison of the light-induced increase with the increase of intracellular adenosine triphosphate under steady-state illumination // Biochemistry - 1980. - Vol. 19. - P. 4615-4619.
173. Midgley M. The phosphonium ion efflux system of *Escherichia coli*: relationship to the ethidium efflux system and energetic studies // J. Gen. Microbiol. - 1986. - Vol. 132. - P. 3187-3193.
174. Midgley M., Iscander N.S., Dawes E.A. The interaction of phosphonium ions with *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the operation of an efflux system // Biochim. Biophys. Acta - 1986. - Vol. 856. - P. 45-49.

175. Midgley M., Parish M., Dawes E.A. Interaction of phosphonium ions with *Arthrobacter globiformis*: evidence for the operation of an efflux system // FEMS Microbiol. Lett. - 1985. - Vol. 30. - P. 7-10.
176. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. - 1959. - Vol. 31. - P. 426-428.
177. Minkevich I.G. Physico-chemical properties of organic compounds and the energetics of metabolism // J. Theor. Biol. - 1982. - Vol. 95. - P. 569-590.
178. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism // Nature - 1961. - Vol. 191. - P. 144-148.
179. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation // Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. - 1966. - Vol. 41. - P. 445-502.
180. Mitchell P. Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems // Eur. J. Biochem. - 1979. - Vol. 95. - P. 1-20.
181. Mitchell P. Bacterial flagellar motors and osmoelectric molecular rotation by an axially transmembrane well and turnstill mechanism // FEBS Lett. - 1984. - Vol. 174. - P. 287-294.
182. Mitchell P., Moyle J. Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria. Catalysis by uncouplers // Biochem. J. - 1967. - Vol. 104. - P. 588-600.
183. Mitchell P., Moyle J. Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria // Eur. J. Biochem.



1968. - Vol. 4. - P. 530-539.
184. Moody A.J., Mitchell R., West I.C., Mitchell P. Protonmotive stoichiometry of rat liver cytochrome c oxydase: determination by a new rate/pulse method // *Biochim. Biophys. Acta* - 1987. - Vol. 894. - P. 209-227.
185. Muller V., Blaut M., Gottschalk G. Generation of a transmembrane gradient of Na in *Methanosarcina barkeri* // *Eur. J. Biochem.* - 1987. - Vol. 162. - P. 461-466.
186. Mulder M.M., Teixeira de Matos M.J., Postma P.W., van Dam K. Energetic consequences of multiple potassium uptake systems in *Escherichia coli* // *Biochim. Biophys. Acta* - 1986. - Vol. 851. - P. 223-228.
187. Nagai S., Aiba S. Reassessment of maintenance and energy uncoupling in the growth of *Azotobacter vinelandii* // *J. Gen. Microbiol.* - 1972. - Vol. 73. - P. 531-538.
188. Nagle J.F., Morowitz H.J. Molecular mechanisms for proton transport in membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1978. - Vol. 75. - P. 298-302.
189. Nagle J.F., Tristram-Nagle S. Hydrogen-bonded chain mechanisms for proton conduction and proton pumping // *J. Membrane Biol.* - 1983. - Vol. 74. - P. 1-14.
190. Nakamura T., Tokuda H., Unemoto T. K/H antiporter functions as a regulator of cytoplasmic pH in marine bacterium // *Biochim. Biophys. Acta* - 1984. - Vol. 776. - P. 330-336.
191. Navon G., Ogawa S., Shulman R.G., Yamane T. High-resolution  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance studies of metabolism in aerobic *Escherichia coli* cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1977. - Vol. 74. - P. 888-891.

192. Neijssel O.M., Tempest D.W. The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms growing in chemostat culture // Arch. Microbiol. - 1975. - Vol. 106. - P. 251-258.
193. Neijssel O.M., Tempest D.W. Bioenergetic aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in carbon limited and carbon sufficient chemostat culture // Arch. Microbiol. - 1976. - Vol. 107. - P. 215-221.
194. Neijssel O.M., Tempest D.W. The role of energy-spilling reactions in the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic chemostat culture // Arch. Microbiol. - 1976. - Vol. 110. - P. 305-311.
195. Nicholls D.G. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined from ion distribution // Eur. J. Biochem. - 1974. - Vol. 50. - P. 305-315.
196. Nozaki Y., Tanford Ch. Proton and hydroxide ion permeability of phospholipid vesicles // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1981. - Vol. 78. - P. 4324-4328.
197. Ogino T., Den Hollander J.A., Shulman R.G.  $^{39}\text{K}$ ,  $^{23}\text{Na}$ , and  $^{31}\text{P}$  NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1983. - Vol. 80. - P. 5185-5189.
198. Okorokov L.A., Kulakovskaya T.V., Lichko L.P., Polorotova E.V. H<sup>+</sup>/ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* // FEBS Lett. - 1985. - Vol. 192. - P. 303-306.

199. O'Shea P.S., Petrone G., Casey R.P., Azzi A. The current-voltage relationships of liposomes and mitochondria // *Biochem. J.* - 1984. - Vol. 219. - P. 719-726.
200. Osman Y.A., Conway T., Bonetti S.J., Ingram L.O. Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: enzyme and metabolite levels during batch fermentation // *J. Bacteriol.* - 1987. - Vol. 169. - P. 3726-3736.
201. Otto R., Klont B., ten Brink B., Konings W.N. The phosphate potential, adenylate energy charge and proton motive force in growing cells of *Streptococcus cremoris* // *Arch. Microbiol.* - 1984. - Vol. 139. - P. 338-343.
202. Otto R., Langeveen R.G., Veldkamp H., Konings W.N. Lactate efflux-induced electrical potential in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris* *J. Bacteriol.* - 1982. - Vol. 149. - P. 733-738.
203. Padan E., Schuldiner S. Intracellular pH and membrane potential as regulators in prokaryotic cell // *J. Membrane Biol.* - 1987. - Vol. 95. - P. 189-198.
204. Padan E., Zilberstein D., Schuldiner S. pH Homeostasis in bacteria // *Biochim. Biophys. Acta* - 1981. - Vol. 650. - P. 151-166.
205. Payne W.J. Energy yields and growth of heterotrophs // *Ann. Rev. Microbiol.* - 1970. - Vol. 24. - P. 17-52.
206. Perlin D.S., Michael J.D., Slayman C.W., Rosen B.P. Proton/ATP stoichiometry of proton pumps from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli* // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1986. - Vol. 248. - P. 53-61.
207. Pietrobon D., Caplan S.R. Further comments on the logic of

- of the application of uncoupler-inhibitor titrations for the elucidation of the mechanisms of energy coupling // FEBS Lett. - 1985. - Vol. 192. - P. 119-122.
208. Pietrobon D., Zoratti M., Azzone G.F., Caplan S.R. Intrinsic uncoupling of mitochondrial proton pumps. 2. Modelling studies // Biochemistry - 1986. - Vol. 25. - P. 767-775.
209. Pirt S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures // Proc. Roy. Soc. London - 1965. - Vol. 163B. - P. 224-231.
210. Plack R.M., Rosen B.P. Cation/proton antiport system in *Escherichia coli*. Absence of potassium/proton antiporter activity in a pH-sensitive mutant // J. Biol. Chem. - 1980. - Vol. 255. - P. 3824-3825.
211. Puchkov E.O., Bulatov I.S., Zinchenko V.P. Investigation of intracellular pH in *Escherichia coli* by 9-aminoacridine fluorescence measurements // FEMS Microbiol. Lett. - 1983. - Vol. 20. - P. 41-45.
212. Raven J.A. The evolution of chemiosmotic energy coupling // J. Theor. Biol. - 1976. - Vol. 57. - P. 301-312.
213. Repaske D.R., Adler J. Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemotactic response to certain attractants and repellants // J. Bacteriol. - 1981. - Vol. 145. - P. 1196-1208.
214. Roels J.A. Energetics and Kinetics in Biotechnology. - Elsevier Biomedical Press, 1983. - P. 330.
215. Roos A. Intracellular pH and intracellular buffering power of the cat brain // Am. J. Physiol. - 1965. - Vol. 209. - P. 1233-1246.

216. Rosen B.P., Kashket E.R. Energetics of active transport // Bacterial Transport. - N.Y.: Marcel Dekker Inc., 1978. - P. 559-620.
217. Rottenberg H. Non-equilibrium thermodynamics of energy conversion in bioenergetics // Biochim. Biophys. Acta - 1979. - Vol. 549. - P. 225-253.
218. Rottenberg H. Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by general anesthetics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1983. - Vol. 80. - P. 3313-3317.
219. Rottenberg H. Membrane potential and surface potential in mitochondria: uptake and binding of lipophilic cations // J. Membr. Biol. - 1984. - Vol. 81. - P. 127-138.
220. Rottenberg H., Steiner-Mordoch S. Free fatty acids decouple oxidative phosphorylation by dissipating intramembranal protons without inhibiting ATP synthesis driven by the proton electrochemical gradient // FEBS Lett. - 1986. - Vol. 202. - P. 314-318.
221. Salmond C.V., Kroll R.G., Booth I.R. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli* // J. Gen. Microbiol. - 1984. - Vol. 130. - P. 2845-2850.
222. Santos H., Turnev D.L. Characterization of the improved sensitivity obtained using a flow method for oxygenating and mixing cell suspensions in NMR // J. Magn. Resonance - 1986. - Vol. 66. - P. 345-349.
223. Scholes P., Mitchell P. Acid-base titration across the plasma membrane of *Micrococcus denitrificans*: factors affecting the effective proton conductance and the respiratory rate // Bioenergetics - 1970. - Vol. 1. - P. 61-72.

224. Scholes P., Mitchell P. Respiration-driven proton translocation in *Micrococcus denitrificans* // Bioenergetics - 1970. - Vol. 1. - P. 309-323.
225. Schumpe A. Zur ermittlung von Stoffübergangszahlen auf der Basis von Gelöstsauerstoff-Messungen // Chem. Ing. Tech. - 1985. - Vol. 57. - P. 501-505.
226. Setlow B., Setlow P. Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1980. - Vol. 77. - P. 2474-2476.
227. Shvinka J., Viesturs U., Ruklisha M. Yield regulation of lysine biosynthesis in *Brevibacterium flavum* // Biotechnol. Bioeng. - 1980. - Vol. 22. - P. 897-912.
228. Skulachev V.P. Membrane-linked energy transductions. Bioenergetic functions of sodium: H is not unique as a coupling ion // Eur. J. Biochem. - 1985. - Vol. 151. - P. 199-208.
229. Slater E.C., Berden J.A., Herweijer M.A. A hypothesis for the mechanism of respiratory-chain phosphorylation not involving the electrochemical gradient of protons as obligatory intermediate // Biochim. Biophys. Acta - 1985. - Vol. 811. - P. 217-231.
230. Slavik I. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes // FEBS Lett. - 1982. - Vol. 140. - P. 22-26.
231. Slonczewski J.L., Rosen B.P., Macnab R.M. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1981. - Vol. 78. - P. 6271-6275.

232. Stewart L.M.D., Bakker E.P., Booth I.R. Energy of coupling to K uptake via the trk system in *Escherichia coli*: the role of ATP // J. Gen. Microbiol. - 1985. - Vol. 131. - P. 77-85.
233. Stock J.B., Rauch B., Roseman S. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. - 1977. - Vol. 252. - P. 7850-7861.
234. Stouthamer A.H. Energetic aspects of the growth of microorganisms // Symposia of the society for general microbiology. - 1977. - N 27. - P. 285-315.
235. Stouthamer A.H. Energy yielding pathways // The Bacteria. A Treatise on Structure and Function. - Acad. Press, 1978. - Vol. 6. - P. 389-462.
236. Stouthamer A.H., Bettenhausen C.W. A continuous culture study of an ATPase-negative mutant of *Escherichia coli* // Arch. Microbiol. - 1977. - Vol. 113. - P. 185-189.
237. Stouthamer A.H., Bettenhausen C.W. Growth and physiology of potassium limited chemostat cultures of *Paracoccus denitrificans* // Arch. Microbiol. - 1980. - Vol. 125. - P. 239-244.
238. Stouthamer A.H., Bettenhausen C.W. Influence of 2,4-dinitrophenol on the maximum specific growth rate and the respiration rate of chemostat cultures of *Paracoccus denitrificans* // FEMS Microbiol. Lett. - 1981. - Vol. 10. - P. 33-35.
239. Stucki J.W. The optimum efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation // Eur. J. Biochem. - 1980. - Vol. 109. - P. 269-283.

240. Tempest D.W., Neijssel O.M., Zeveboom W. Properties and performance of microorganisms in laboratory culture. Their relevance to growth in natural ecosystems // *Microbes in Their Natural Environments*. 34th Symp. Soc. Gen. Microbiol. - Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983. - P. 119-152.
241. ten Brink B., Konings W.N. Generation of a protonmotive force in anaerobic bacteria by end-product efflux // *Meth. Enzymol.* - 1986. - Vol. 125. - P. 492-510.
242. ten Brink B., Lolkema J.S., Hellingwerf K.J., Konings W.N. Variable stoichiometry of proton: lactose symport in *Escherichia coli* cells // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1981. - Vol. 12. - P. 237-240.
243. Terraciano J.S., Schreurs W.J.A., Kashket E.R. Membrane conductance of *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium acetobutylicum*: evidence for electrogenic Na/H antiport in *Clostridium thermoaceticum* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1987. - Vol. 53. - P. 782-786.
244. Tokuda H., Unemoto T. A respiration-dependent primary sodium extrusion system functioning at alkaline pH in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1981. - Vol. 102. - P. 265-271.
245. Tokuda H., Unemoto T. Characterization of the respiration-dependent Na pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // *J. Biol. Chem.* - 1982. - Vol. 257. - P. 10007-10014.
246. Udagawa T., Unemoto T., Tokuda H. Generation of sodium electrochemical potential by the sodium-motive NADH-oxidase and sodium/proton antiport system of a moderately halophilic



- Vibrio costicola* // J. Biol. Chem. - 1986. - Vol. 261. - P. 2616-2622.
247. van Dam K., Westerhoff H.V., Krab K., van der Meer R., Arents J.C. Relationship between chemiosmotic flows and thermodynamic forces in oxidative phosphorylation // Biochim. Biophys. Acta - 1980. - Vol. 591. - P. 240-250.
248. van Verseveld H.W., Braster M., Kashket E.R., Stouthamer A.H. Proton-motive force during growth of *Escherichia coli* in the recycling fermentor // FEBS Lett. - 1986. - Vol. 202. - P. 319-322.
249. Vink R., Bendall M.R., Simpson S.J., Rogers P.J. Estimation of H to adenosine 5'-triphosphate stoichiometry of *Escherichia coli* ATP synthase using  $^{31}\text{P}$  NMR // Biochemistry - 1984. - Vol. 23. - P. 3667-3675.
250. Waggoner A.S. Dye indicators of membrane potential // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. - 1979. - Vol. 8. - P. 47-68.
251. Wallace J.R., Holms H.W. Maintenance coefficients and rates of turnover of cell material in *Escherichia coli* ML 308 at different growth temperatures // FEMS Microbiol. Lett. - 1986. - Vol. 37. - P. 317-320.
252. Wase D.A.J., Ratwatte H.A.M. Variation of intracellular sodium and potassium concentration with changes in agitation rate for chemostat-cultivated *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1985. - Vol. 22. - P. 325-328.
253. Watson T.G. Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Gen. Microbiol. - 1970. - Vol. 64. - P. 91-99.

254. Westerhoff H.V., Hellingwerf K.J., van Dam K. Thermodynamic efficiency of microbial growth is low but optimal for maximal growth rate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1983. - Vol. 80. - P. 305-309.
255. Westerhoff H.V., Lolkema J.S., Otto R., Hellingwerf K.J. Thermodynamics of growth, non-equilibrium thermodynamics of bacterial growth. The phenomenological and the mosaic approach // Biochim. Biophys. Acta - 1982. - Vol. 683. - P. 181-220.
256. Westerhoff H.V., Melandri B.A., Venturoli G., Azzone G.F., Kell D.B. Mosaic protonic coupling hypothesis for free energy transduction // FEBS Lett. - 1984. - Vol. 165. - P. 1-5.
257. Westerhoff H.V., Melandri B.A., Venturoli G., Azzone G.F., Kell D.B. A minimal hypothesis for membrane-linked free-energy transduction. The role of independent, small coupling units // Biochim. Biophys. Acta - 1984. - Vol. 768. - P. 257-292.
258. Westerhoff H.V., Scholte B.J., Hellingwerf K.J. Bacteriorhodopsin in liposomes. 1. A description using irreversible thermodynamics // Biochim. Biophys. Acta - 1979. - Vol. 547. - P. 544-560.
259. Westerhoff H.V., Simonetti A.L.M., van Dam K. The hypothesis of localised chemiosmosis is unsatisfactory // Biochem. J. - 1981. - Vol. 200. - P. 193-202.
260. Wetzstein H.G., McCarthy J.E.G., Gottschalk G. The membrane potential in a cytochrome-deficient species of *Bacteroides*: its magnitude and mode of generation // J. Gen. Microbiol. - 1987. - Vol. 133. - P. 73-83.

261. Wikström H., Krab K. Proton-pumping cytochrome c oxidase  
// Biochim. Biophys. Acta - 1979. - Vol. 549. - P. 177-222.
262. Williams R.J.P. The history and the hypothesis concerning  
ATP-formation by energized protons // FEBS Lett. - 1978. -  
Vol. 85. - P. 9-19.
263. Woelders H., Putters J., van Dam K. Flow-force relation-  
ships in mitochondrial oxidative phosphorylation // FEBS  
Lett. - 1986. - Vol. 204. - P. 17-21.
264. Yamasaki K., Moriyama Y., Futai M., Tsuchiya T. Uptake and  
extrusion of K regulated by extracellular pH in *Escherichia*  
*coli* // FEBS Lett. - 1980. - Vol. 120. - P. 125-127.
265. Zaritsky A., Kihara M., Macnab R. Measurement of membrane  
potential in *Bacillus subtilis*: a comparison of lipophilic  
cations, rubidium ion and a cyanine dye as probes // J.  
Membrane Biol. - 1981. - Vol. 63. - P. 215-231.
266. Zilberstein D., Schuldiner S., Padan E. Proton electrochemi-  
cal gradient in *Escherichia coli* cells and its relation to  
active transport of lactose // Biochemistry - 1979. -  
Vol. 18. - P. 669-673.
267. Zilberstein D., Agmon V., Schuldiner S., Padan E. The sodi-  
um/proton antiporter is part of the pH homeostasis mechanism  
in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. - 1982. - Vol. 257. -  
P. 3687-3691.
268. Zoratti M., Favoron M., Pietrobon D., Azzone G.F. Intrinsic  
uncoupling of mitochondrial proton pumps. 1. Non-ohmic  
conductance cannot account for the nonlinear dependence of  
static head respiration on  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  // Biochemistry - 1986. -  
Vol. 25. - P. 760-767.

269. Zoratti M., Pietrobon D., Azzone G.F. On the relationship between rate of ATP synthesis and H electrochemical gradient in rat-liver mitochondria // Eur. J. Biochem. - 1982. - Vol. 126. - P. 443-451.
270. Zoratti M., Petronilli V., Azzone G.F. ATP-synthase-mediated proton fluxes and phosphorylation in rat liver mitochondria: dependence on  $H^+$  // Biochim. Biophys. Acta - 1986. - Vol. 851. - P. 123-135.
271. Zychlinsky E., Matin A. Effect of starvation on cytoplasmic pH, proton motive force and viability of an acidophilic bacterium *Thiobacillus acidophilus* // J. Bacteriol. - 1983. - Vol. 153. - P. 371-374.
272. Zychlinsky E., Matin A. Cytoplasmic pH homeostasis in an acidophilic bacterium, *Thiobacillus acidophilus* // J. Bacteriol. - 1983. - Vol. 156. - P. 1352-1355.