

УДК 577.154.33+577.352.135

ИЗМЕНЕНИЕ pH И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ РОСТА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ: ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЕЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ

© 2011 г. Д. Согомонян, К. Акопян, А. Трчунян

Ереванский государственный университет, биологический факультет, Ереван, 0025 Армения

e-mail: Trchounian@ysu.am

Поступила в редакцию 09.07.2009 г.

При выращивании *Lactobacillus salivarius* 1588 и 3823, а также *L. acidophilus* 101E и *Lactococcus lactis* 3690 в анаэробных условиях в среде с глюкозой наблюдали уменьшение pH и падение окислительно-восстановительного потенциала. Эти параметры и протонная проводимость мембраны бактерий ($C_M^{H^+}$) изменялись в средах с разным pH. Окислитель феррицианид и восстановитель DL-дитиотреитол влияли на показатели роста бактерий и величину $C_M^{H^+}$, а также изменяли выведение H^+ из клеток и поглощение K^+ клетками в экспериментальных условиях. Предлагается использование окислителей и восстановителей для регуляции роста и сопряженного с переносом H^+ транспорта ионов у молочнокислых бактерий.

Молочнокислые бактерии растут в анаэробных условиях, осуществляя сбраживание сахара (глюкоза) с образованием преимущественно молочной [1] и других органических кислот. При этом происходит закисление среды, изменяется протондвижущая сила $\Delta\mu_{H^+}$ [2, 3], что обусловлено падением pH среды, изменением протонной проницаемости или активности транспортных и ферментных систем клеточной мембраны.

В то же время известно, что для роста бактерий в анаэробных условиях более благоприятны нейтральный pH и более восстановленная среда [4–10]. При снижении pH, по-видимому, происходит падение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) у молочнокислых бактерий. Показано, что изменение ОВП в суспензии бактерий отражает процессы на поверхности клеток [11]. Предполагается, что значение ОВП может определять пути переноса электронов и транспорт H^+ через мембраны бактерий, генерацию $\Delta\mu_{H^+}$ и другие процессы [9, 10]. Например, от окисленного или восстановленного состояния тиоловых групп белков определяемого ОВП может зависеть активность некоторых транспортных систем и мембраносвязанных ферментов [9, 10].

На *Escherichia coli* и других бактериях, растущих в анаэробных условиях, была выявлена роль ОВП, различных окислителей и восстановителей при их росте [4, 7–10, 12]. Действие этих соединений связано либо с изменением величины ОВП, особенно в случае непроницающих веществ, таких, как, напри-

мер, феррицианид, либо с их непосредственным взаимодействием с поверхностью клетки и последующим влиянием на внутриклеточные процессы. Можно предполагать, что восстановители должны стимулировать рост бактерий, однако DL-дитиотреитол (ДТТ), как недавно показано для *E. coli* [13], ингибирует их рост, а при относительно высоких концентрациях становится токсичным [9].

Изучение изменений pH и ОВП в различных условиях, а также эффектов окислителей и восстановителей на показатели роста молочнокислых бактерий и сопряженные с переносом H^+ процессы могут иметь важное значение в механизмах регуляции роста, в оценке функциональных процессов в кишечнике животных и человека, применении этих бактерий в технологических целях.

Цель работы – поиск корреляции между величиной pH и значением ОВП среды для выращивания некоторых молочнокислых бактерий и динамикой их роста в анаэробных условиях, а также установление действия окислителей и восстановителей.

МЕТОДИКА

Бактерии и их выращивание. В работе использовали молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* 101, *L. salivarius* 1588 и 3823, *Lactococcus lactis* 3690, которые были предоставлены Ф. Асатрянном (кафедра технологии молока и молочных продуктов Армянского государственного аграрного университета, г. Ереван, Армения).

Выращивание бактерий проводили в анаэробных условиях в среде с глюкозой (начальный pH

Динамика ОВП и μ при росте молочнокислых бактерий при различных значениях рН

Бактерия	рН	μ , ч ⁻¹	ОВП, мВ	
			в начале лог-фазы	в середине лог-фазы
<i>L. acidophilus</i> 101	6.5	0.70	+17	-380
	8.0	0.71	+15	-382
<i>L. lactis</i> 3690	6.5	0.75	+16	-300
	8.0	0.76	+17	-310
<i>L. salivarius</i> 1588	6.5	1.03	+50	-234
	8.0	1.05	+40	-235
<i>L. salivarius</i> 3823	6.5	0.75	+28	-266
	8.0	0.76	+18	-281

6.5 или как отмечено в тексте), при 40°C [2, 3]. Начальный рН среды определяли с помощью чувствительного рН-метра с соответствующим селективным электродом (“Hanna Instruments”, Португалия) и регулировали с помощью NaOH и HCl. В среду вносили феррицианид или ДТТ в концентрациях от 1 до 5 мМ. За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности (ОП) суспензии с помощью фотоэлектрического фотометра КФК-3 (Загорский оптико-механический завод, Россия) при длине волны 650 нм. Продолжительность лаг-фазы определяли графически, как время до начала логарифмической фазы (лог-фаза, пересечение касательных к кривым роста) [14, 15]. Удельную скорость роста (μ) определяли, как частное от деления $0.693 (\ln 2)$ на время удвоения ОП в интервале, когда изменение логарифма ОП во времени носило линейный характер (логарифмическая фаза роста) [14, 15]; μ выражали в ч⁻¹ или мин⁻¹. Значения ОП линейно зависели от количества бактерий в единице объема, определяемого методом разведений с помощью таблиц Мак-Креди [16]. Размеры и форму клеток бактерий изучали с помощью микроскопа БиоЛАМ с окуляр-микрометром типа МОВ-1-15х4 (“ЛОМО”, Россия) и водной иммерсии [2]: они были практически одинаковы для каждого вида бактерий при росте в средах с рН 6.5 или 8.0 (не приведено). Реактивы, использованные в работе, не приводили к агрегации клеток.

Определение ОВП. Величину ОВП суспензии бактерий измеряли с помощью платиновых электродов (E_h) типа ЭПВ-01 (Гомельский завод измерительных приборов ГЗИП, Беларусь) или типа РТ42ВНС (“Hanna Instruments”, Португалия), как описано ранее [4–8]. Поскольку ОВП отражает соотношение окисленных и восстановленных веществ в среде [10, 17], то его величина мало зависит от количества бактерий в единице объема: при увеличении такого количества бактерий в 2 раза значе-

ние ОВП возрастает лишь на 25–27 мВ, что нами не учитывалось.

При использовании платинового электрода в паре с титан-силикатным (E_h') типа ЭО-021 (“ГЗИП”, Беларусь), который в отличие от платинового нечувствителен к молекулярному кислороду или молекулярному водороду [7, 8, 14, 18], регистрировали существенные различия в показаниях электродов. Выделение H_2 в суспензии бактерий определяли также химическим методом, основанным на обесцвечивании 0.2 мМ раствора перманганата калия в 1 н. H_2SO_4 в присутствии H_2 [18].

Определение протонной проводимости мембраны бактерий ($C_m^{H^+}$). $C_m^{H^+}$ определяли путем реги-

страции потока H^+ через мембрану до установления равновесия при введении в среду малых порций HCl (кислотный удар), как описано ранее [19, 20]. О достижении электрохимического равновесия в распределении H^+ по обе стороны мембраны судили по отсутствию изменений рН при введении протонофора карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидраза (2 мкМ) через 30 с после кислотного удара. Изменение буферной емкости при кислотном ударе было мало и практически не влияло на величину потока H^+ . Увеличение проницаемости мембраны для других ионов с помощью валиномицина и использования растворов с высоким содержанием K^+ приводили к резкому падению градиента их концентрации через мембрану. Наличие проникающих анионов в среде обеспечивало прохождение H^+ через мембрану.

$C_m^{H^+}$ выражали в количестве переносимых H^+ в единицу времени (мкмоль/с) в пересчете на единицу рН и единицу сухой массы бактерий. Сухую массу бактерий определяли взвешиванием суспензии после выдерживания при 60°C в течение 3 ч и более (до постоянного веса) [8, 14, 18].

Определение потока протонов и ионов калия через мембрану бактерий. Потоки H^+ и K^+ через мембрану бактерий определяли с помощью соответствующих селективных электродов, как описано [2, 3, 7, 8], в экспериментальных условиях, когда бактерии отмывали в дистиллированной воде и переносили в 150 мМ трис-фосфатный буфер (рН 7.5), содержащий 0.4 мМ $MgSO_4$, 1 мМ NaCl и 1 мМ KCl, и затем добавляли экзогенный источник энергии (глюкоза). Изменение показаний электродов калибровали с помощью малых количеств 0.1 н. HCl и 0.1 М KCl.

Другие методы. Все измерения проводили в закрытой термостатируемой камере, в которой анаэробные условия оценивали по появлению синей окраски экспериментального буфера при добавлении 1.5 мМ метилвиологена и его титрования с помощью 0.1 М дитионита. Реактивы, использованные

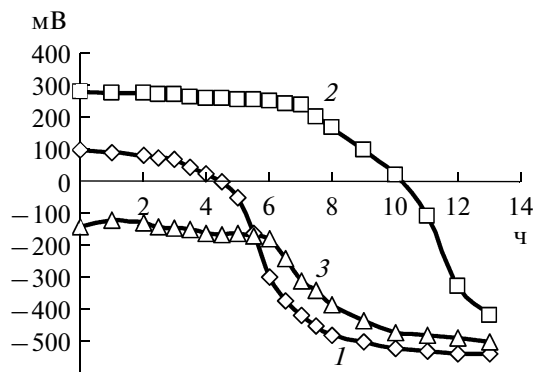


Рис. 1. Падение ОВП, регистрируемое с помощью платинового электрода (E_h), в процессе анаэробного роста *L. salivarius* 1588 в слабокислой среде (pH 6.5): 1 – контроль, без феррицианида или ДТТ; 2 – в присутствии 1 мМ феррицианида; 3 – в присутствии 1 мМ ДТТ. Феррицианид или ДТТ вводили в ростовую среду непосредственно перед инокуляцией бактерий.

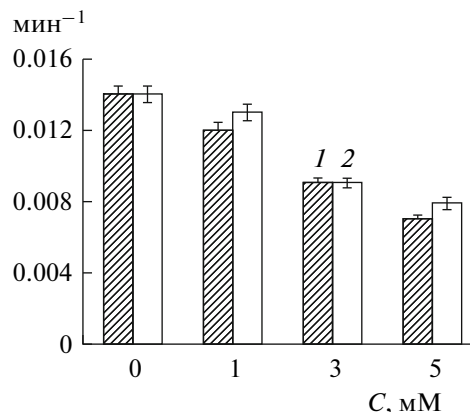


Рис. 2. Изменение скорости роста *L. salivarius* 1588 в присутствии феррицианида или ДТТ различных концентраций: 1 – феррицианид; 2 – ДТТ. Другие условия те же, что и на рис. 1.

в работе, не влияли на показания селективных электродов.

В работе приведены данные по средним арифметическим 2–3 независимых измерений, стандартная ошибка которых не превышала 5%.

Реактивы. В исследованиях применяли D-глюкозу (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь), бактериологический агар-агар, дрожжевой экстракт, триптон, трис (“Carl Roth GmbH & Co”, Германия), валиномицин, N,N'-дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД), DL-дитиотреитол (ДТТ), дитионит, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (КХФГ), метилвиологен (“Sigma”, США) и другие реактивы аналитической чистоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Закисление среды и падение ОВП при росте молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии, изученные в настоящей работе, росли с высокой скоростью в анаэробных условиях при сбраживании глюкозы как в слабокислой (pH 6.5), так и в щелочной (pH 8.0) среде (таблица). При этом в стационарной фазе роста в обоих средах наблюдалось закисление на 1–1.5 единицы pH от исходной величины (не приведено) и одновременное падение ОВП до низких отрицательных значений (E_h , регистрируемое с помощью платинового электрода, таблица). Такое падение E_h при росте, например, *L. salivarius* 1588, имело место от положительных ($+50 \pm 7$ мВ) в начале лог-фазы до отрицательных (до -565 ± 23 мВ) значений (рис. 1) с переходом культуры в стационарную фазу (10–12 ч); такое падение больше в слабокислой среде (не приведено).

При росте бактерий выделялись кислоты и другие продукты брожения [1], которые определяют закисление среды и падение ОВП, показанные для разных

бактерий [3–8, 10]. Связь между изменением этих величин в бактериальных средах представляется неоднозначной [10], хотя теория окислительно-восстановительных процессов для относительно простых окислительно-восстановительных систем предполагает разнонаправленность изменения pH и ОВП [10, 17]. Динамика изменений этих величин указывает на важность восстановительных условий для роста бактерий и позволяет допустить, что падение ОВП определяет рост культуры и его последующий переход в стационарную фазу. В позднюю стационарную фазу (через 22–24 ч) величина E_h несколько повышается (на 125 ± 12 мВ), что указывает на усиление окислительных процессов в культуре.

Окислитель феррицианид, плохо проникающий в клетку и поддерживающий положительные значения ОВП ($+280 \pm 10$ мВ, рис. 1), влиял на рост *L. salivarius*, увеличивая почти в 2 раза продолжительность лаг-фазы и уменьшая скорость роста (рис. 2). Такое влияние наблюдалось при pH среды 6.5, но не 8.0 (не приведено) и зависело от концентрации окислителя в диапазоне от 1 до 5 мМ (рис. 2). При этом закисление среды уменьшалось, а падение E_h до отрицательных значений (до -490 мВ) наблюдалось значительно позднее – уже в логарифмическую фазу роста. В присутствии феррицианида (3 мМ) падение ОВП более выражено (почти до -200 мВ) при pH 8.0, нежели при pH 6.5.

ДТТ известен как восстановитель тиоловых групп белков [9, 13, 20]. Этот реагент, понижающий величину ОВП до отрицательных значений (-160 мВ при концентрации ДТТ в 1 мМ, рис. 1), также влиял на рост бактерий, уменьшая скорость роста в зависимости от концентрации ДТТ (от 1 до 5 мМ, рис. 2). Такой эффект наблюдался при pH 6.5 и не отличался от действия ДТТ на параметры роста *E. coli* [5, 9]. Однако при щелочном pH ДТТ (1 мМ),

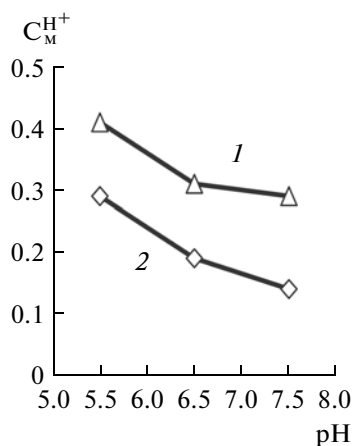


Рис. 3. $C_M^{H^+}$ у *L. acidophilus* 101 (1) и *L. salivarius* 1588 (2), выращенных в средах с различным рН. По оси ординат – $C_M^{H^+}$, мкмоль H^+ /мг сух. массы/ед. рН. Другие условия те же, что и на рис. 1.

понижающий ОВП до отрицательных значений, несколько стимулировал рост молочнокислых бактерий. Возможно, что восстановление тиоловых групп мембранных белков на поверхности бактерий с помощью ДТТ более выражено в щелочной среде.

Таким образом, можно отметить, что при достижении стационарной фазы роста молочнокислых бактерий ОВП падает до низких отрицательных значений, однако природа такого падения не ясна.

Изменение протонной проводимости мембраны при

росте бактерий в разных условиях. $C_M^{H^+}$ молочнокислых бактерий может служить показателем состояния мембраны. Этот параметр играет роль в процессах трансформации энергии, связанных с трансмембранным переносом H^+ . Он претерпевает заметные изменения при росте *L. acidophilus*, *L. salivarius* (рис. 3) и других молочнокислых бактерий (не приведено) в средах с разным рН. Значения $C_M^{H^+}$ весьма различны у разных молочнокислых бактерий и их штаммов: $C_M^{H^+}$ у *L. salivarius* 3823 выше, чем у *L. salivarius* 1588, почти в 1.3–1.6 раз в зависимости от рН.

Значение $C_M^{H^+}$ увеличивалось почти в 1.4–2.1 раза (в зависимости от вида бактерий) при понижении рН от слабощелочных до кислых (рис. 3), что показано и у других бактерий [19–21]. Разные значения $C_M^{H^+}$ могли быть связаны с изменением липидного и белкового состава мембраны при росте бактерий в различных средах [22]. Изменения $C_M^{H^+}$ коррелировали с падением ОВП.

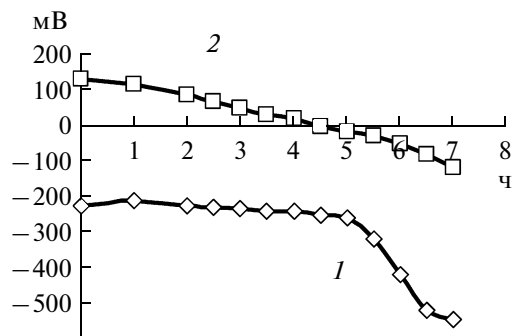


Рис. 4. Динамика ОВП, определяемого с помощью пары электродов – платинового и титан-силикатного в процессе роста *L. salivarius* 1588: 1 – показания платинового электрода (E_h); 2 – показания титан-силикатного электрода (E_h'). Другие условия те же, что и на рис. 1.

Более того, феррицианид и ДТТ вызывали разнонаправленные изменения $C_M^{H^+}$ у *L. salivarius* 1588, уменьшая в 1.2 и увеличивая в 1.3 раза ее значения при рН 6.5. Такие эффекты окислителя и восстановителя приводят, возможно, к сдвигам в величинах потока ионов через мембрану бактерий и могут лежать в основе изменений в росте бактерий. Последнее предположение согласуется с тем, что протонофоры и слабые кислоты, приводящие к увеличению $C_M^{H^+}$, подавляют рост бактерий [23, 24].

Изменения ОВП, регистрируемые разными электродами. Весьма интересным оказалось использование пары окислительно-восстановительных электродов – платинового и титан-силикатного (см. Методику). Падение E_h' , регистрируемое с помощью титан-силикатного электрода у *L. salivarius* (рис. 4), происходило с меньшей скоростью, при этом наблюдалась заметная разница в величинах ОВП в логарифмическую фазу роста. Такая разница регистрировалась и в присутствии ДТТ (рис. 4). Возможно, это свидетельствует о выделении H_2 [7, 8, 18], что может быть результатом смешанного брожения [25], однако такой тип брожения у молочнокислых бактерий не описан [1]. Выделение H_2 было подтверждено и химическим методом, а также показано у других видов бактерий [26, 27], хотя наши данные не согласуются с результатами работы Вигнаса и Биллуда [28], согласно которым гидрогенная активность в молочнокислых бактериях отсутствует.

Влияние окислителя и восстановителя на транспорт ионов через мембраны бактерий. Молочнокислые бактерии в экспериментальных условиях в

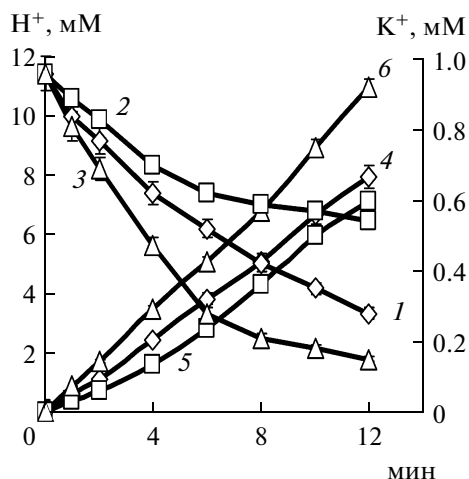


Рис. 5. Кинетика выделения H⁺ (1–3) и поглощения K⁺ (4–6) бактериями *L. salivarius* 1588. 1, 4 – контроль, без феррицианида или ДТТ; 2, 5 – в присутствии 1 мМ феррицианида; 3, 6 – в присутствии 1 мМ ДТТ. Концентрация глюкозы – 20 мМ. Количество бактерий было равно 10⁹ кл./мл.

среде с глюкозой, действительно, осуществляют H⁺–K⁺-обмен (рис. 5). Такой обмен хорошо изучен [2, 3]: он имеет устойчивую стехиометрию ДЦКД-чувствительных потоков H⁺ к K⁺ и, возможно, осуществляется посредством H⁺-транслоцирующей F₀F₁-АТФазы и калиевой транспортной системы, объединенными в H⁺–K⁺-насос. Представление о H⁺–K⁺-насосе подробно обосновано на других бактериях [26, 27]. При этом перенос энергии внутри насоса может осуществляться через дитиол-дисульфидные переходы, зависящие от ДТТ [5, 9].

Феррицианид уменьшал, а ДТТ, наоборот, усиливал потоки H⁺ и K⁺ через мембрану *L. salivarius* (рис. 5). Такое воздействие этих соединений может объясняться как непосредственным действием реагента на одну или обе транспортные системы одновременно, или же опосредованно – на состояние тиоловых групп этих белков, изменяя дитиол-дисульфидный переход между ними [26, 27]. Такие переходы могут приводить к конформационным изменениям в соответствующих белках. Нельзя исключить возможность конформационных изменений в белках за счет изменения величины ОВП (рис. 2), других изменений, приводящих к сдвигам в C_м^{H⁺} (см. выше) и Δμ_{H⁺}.

Таким образом, результаты указывают на связь изменений рН и ОВП среды в процессе роста бактерий и их роль в регуляции транспортных процессов у молочнокислых бактерий.

Окислители и восстановители могут быть использованы для регуляции роста в лабораторных и опытно-промышленных условиях и транспорта

ионов у этих бактерий. Эти реагенты, приводящие к направленным изменениям ОВП, могут быть использованы для оценки процессов роста и метаболизма бактерий в кишечнике животных и человека.

Авторы благодарны Ф. Асатрянцу за предоставление молочнокислых бактерий, а также Г. Киракосян за советы и помощь в проведении измерений.

Работа выполнена в рамках тем (0167-2005 и 1012-2008), финансируемых Министерством образования и науки Республики Армения, и гранта Армянского национального фонда образования и науки (США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975. 384 с.
2. Трчунян А.А., Оганджян Е.С., Мартirosов С.М. // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 292–294.
3. Trchounian A.A., Ogandjanian E.S., Martirosov S.M. // Bioelectrochem. Bioenerg. 1987. V. 17. P. 503–508.
4. Киракосян Г., Баграмян К., Трчунян А. // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 245–251.
5. Киракосян Г., Баграмян К., Трчунян А. // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 1095–1099.
6. Breznak J.A., Costilow R.H. // Methods for General and Molecular Bacteriology / Eds. Gerhardt P, Nurrey R.G., Wood W.A., Krieg N.R. Washington DC.: ASM Press, 1994. P. 137–155.
7. Bagratyan K., Trchounian A. // Bioelectrochem. Bioenerg. 1997. V. 43. P. 129–134.
8. Bagratyan K., Galstyan A., Trchounian A. // Bioelectrochemistry. 2000. V. 51. P. 151–156.
9. Kirakosian G., Bagratyan K., Trchounian A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 325. P. 803–806.
10. Васильян А., Трчунян А. // Биофизика. 2008. Т. 53. С. 281–293.
11. Баграмян К., Карагулян Э., Саргсян Г., Трчунян А. // Биол. журн. Армении. 1988. Т. 41. С. 394–398.
12. Kirakosyan G., Trchounian A. // Bioelectrochemistry 2007. V. 70. P. 58–63.
13. Riondet C., Cachon R., Wache Y., Alcaez G., Divies C. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 262. P. 595–599.
14. Mnatsakanyan N., Bagratyan K., Trchounian A. // Cell Biochem. Biophys. 2004. V. 41. P. 357–366.
15. Mirzoyan N., Pepoyan A., Trchounian A. // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 254. P. 81–86.
16. Кох А. // Методы общей бактериологии / Ред. Герхард Ф. М.: Мир, 1983. Т. 1. С. 442–511.
17. Bagratyan K., Mnatsakanyan N., Poladian A., Vassilian A., Trchounian A. // FEBS Lett. 2002. V. 516. P. 172–178.
18. Дэвис Е.А. Количественные проблемы биохимии. М.: Мир, 1980. 376 с.
19. Акопян К., Захарян Э., Киракосян Г., Мнацакян Н., Баграмян К., Трчунян А. // Биофизика. 2002. Т. 47. С. 1064–1067.

20. Akopyan K., Trchounian A. // Cell Biochem. Biophys. 2006. V. 46. P. 201–208.
21. Акопян К., Трчунян А. // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 680–683.
22. Yohannes E., Barnhart D.M., Slonczewski J.L. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 192–199.
23. Nakano S., Onoda T. // J. Basic. Microbiol. 1989. V. 29. P. 163–169.
24. Kurdi P., Kawanishi K., Mizutani K., Yokota A. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. P. 1979–1986.
25. Sawers G., Bock A. // In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology / Ed. Neidhardt C. Washington DC.: ASM Press, 1996. P. 262–282.
26. Trchounian A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 315. P. 1051–1057.
27. Мнацаканян Н., Захарян Э., Баграмян К., Василян А., Поладян А., Трчунян А. // Биологические мембраны. 2002. Т. 19. С. 181–190.
28. Vignais P.M., Billoud B. // Chem. Rev. 2007. V. 107. P. 4206–4272.

pH and Oxidation-Reduction Potential Change of Environment during a Growth of Lactic Acid Bacteria: Effects of Oxidizers and Reducers

D. Sogomonyan, K. Akopyan, and A. Trchounian

Yerevan State University, Biological Faculty, ul. Manukyan 1A, Yerevan, 0025 Armenia
e-mail: trchounian@ysu.am

Received July 9, 2009

Abstract—Decrease of pH and dropping of oxidation–reduction potential have been observed during growing *Lactobacillus salivarius* 1588 and 3823, *Lactobacillus acidophilus* 101E, and *Lactococcus lactis* 3690 in anaerobic conditions in medium with glucose acidification. These parameters and membrane proton permeability of bacteria ($C_M^{H^+}$) changed in the mediums with different pH. Oxidizer ferricyanide and reducer DL-dithiothreitol affected the bacterial growth and their changed H^+ extrusion from the cells and K^+ uptake by the cells in experiment conditions. Application of oxidizers and reducers are suggested for regulation of growth related with H^+ ion transport in lactic acid bacteria.