

УДК: 577.23: 576.333: 582.232

Погорелов Д. І., асп., Броун І. Й., канд. біол. наук, провід. наук. сп.  
Кафедра біохімії, Одеський державний університет,  
вул. Дворянська 2, Одеса, 65026, Україна

## СИСТЕМА ТАКСИСУ У ГАЛО- ТА АЛКАЛО- ТОЛЕРАНТНОЇ ЦІАНОБАКТЕРІЇ *OSCILLATORIA* *BREVIS*. ФЕНОТИПОВИЙ ПОШУК “НАТРОМЕТРА”

Швидкість ковзкого руху трихомів ціанобактерії *Oscillatoria brevis* залежить від рН середовища та вмісту іонів натрію. За умов лужної рН та концентрації  $\text{Na}^+$  10 мМ швидкість руху трихомів зменшувалась на 50%.

Зниження рівня трансмембранного електричного потенціалу за допомогою протонофора карбонілціанід-*m*-хлорфенілгідрозону (ХКФ) або трансмембранного хімічного потенціалу натрію за допомогою  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортера моненсину призводило до значного підвищення частоти змін напрямку руху (реверсій) трихомами *Oscillatoria brevis*.

Вперше отримано експериментальні дані, що свідчать про існування механізму рецепції рівня трансмембранного електрохімічного потенціалу іонів  $\text{Na}^+$  ( $\Delta\mu\text{Na}^+$ ) у клітинах *Oscillatoria brevis*.

Подібна система була передбачена В.П. Скулачовим [8] і отримала назву “натрометр”.

**Ключові слова:** ціанобактерії, таксис, “натрометр”.

Одним із засобів пристосування бактерій до зміни умов навколишнього середовища є система таксису. Рецепція змін умов оточуючого середовища бактеріями та відповідна зміна частоти реверсій (реверсія — зміна напрямку руху бактерії) є найважливішими етапами таксису бактерій.

Раніше було з'ясовано, що протонний насос фотосинтетичного апарату галобактерій (галородопсин) здатний функціонувати як фоторецептор [6].

Зроблено припущення, що рецепторна функція галородопсину реалізується як пристрій, який вимірює електрохімічний градієнт протонів на мембрані. Цей гіпотетичний пристрій отримав назву “протометра” [1, 4]. Відповідно до гіпотези В. П. Скулачова про молекулярний протометр, підвищення рівня трансмембранного електрохімічного потенціалу протонів ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) індукує атрактантні відповіді, а зменшення рівня  $\Delta\mu\text{H}^+$  індукує репелентні відповіді бактеріальної клітини. При низьких рівнях  $\Delta\mu\text{H}^+$  реверсії повністю пригнічуються. Ця гіпотеза добре корелює з результатами досліджень аеро- та фототаксису у різноманітних бактерій [9].

Відомо, що ковзкий рух ціанобактерій періодично зупиняється реверсіями, частота яких залежить від умов культивування та властивостей культури [4, 5]. Нещодавно було доведено, що велика кількість ціанобактерій не спроможна генерувати  $\Delta\mu\text{H}^+$  за умов лужного середовища з підвищеним вмістом натрію [2]. Відомо, що за таких умов ефективним джерелом біологічної енергії є електрохімічний градієнт іонів натрію ( $\Delta\mu\text{Na}^+$ ).

Відповідно до цього, у ціанобактерій, які мешкають в екстремальних умовах, що сприяють генерації  $\Delta\mu\text{Na}^+$ , повинен існувати інший молекулярний пристрій

для вимірювання  $\Delta\mu\text{Na}^+$  на цитоплазматичній мембрані — “натрометр” або, за В. П. Скулачовим, “содіометр” [8].

Гало- та алкалотолерантна ціанобактерія *Oscillatoria brevis*, для якої була продемонстрована здатність до генерації та утилізації  $\Delta\mu\text{Na}^+$  [3], обрана нами як об’єкт дослідження в експериментах по виявленню системи “натрометра” на спрягаючих мембранах ціанобактерій, що мешкають у лужному середовищі.

### Матеріали та методи дослідження

Морська гало- та алкалотолерантна ціанобактерія *Oscillatoria brevis* була виділена із солонowodного Куяльницького лиману (м. Одеса). Альгологічно чисту культуру вирощували в люміностації за умов постійного освітлення (1000 люкс) та температури 25 °С. Культивування ціанобактерії провадили в середовищі ASN III такого складу (в г/л):  $\text{NaCl}$  — 25;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 0,02;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 3,5;  $\text{KCl}$  — 0,5;  $\text{MgCl}_2$  — 2,5;  $\text{NaNO}_3$  — 0,75;  $\text{CaCl}_2$  — 0,5;  $\text{KBr}$  — 0,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,003;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,002;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -5 мг/л; вітамін  $\text{B}_{12}$  — 2 мкг/л; розчин мікроелементів — 1 мл/л. Склад розчину мікроелементів (г/л):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  — 2,86;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 1,86;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  — 0,02;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,04. Реакцію середовища (рН) встановлювали 9,5 або 7 за допомогою CAPS буферної системи.

Розчини для експериментів готували на основі модифікованого ростового середовища, в якому змінювали концентрації солей  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  відповідно до вимог експерименту. У випадку повного виключення  $\text{Na}^+$  із середовища, солі, що містять  $\text{Na}^+$ , замінювали на аналогічні солі  $\text{K}^+$ .

Для підготовки трихомів *O. brevis* до мікроскопування суспензію трихомів наносили на покривне скельце, занурене в 0,5 мл середовища культивування. Тривалість та умови інкубації культури змінювали залежно від мети експерименту. Перед експериментом готували тимчасові відкриті або герметично закриті препарати. В останньому випадку препарати зберігали у вологій камері.

Швидкість руху трихомів ціанобактерій вимірювали за допомогою окулярної лінійки, об’єкт-мікрометра та секундоміра, вимірюючи час, протягом якого трихом переміщується на певну відстань.

Вибірку з 20—25 вимірів швидкості руху трихомів оцінювали за стандартними статистичними параметрами. Оцінювання довірчого інтервалу середнього арифметичного провадили, використовуючи критерій Стьюдента за рівня значності 0,1.

Оцінку інтенсивності світлового потоку провадили за допомогою фотометричної насадки (ФМЕЛ-1а) до мікроскопу ЛЮМАМ-ИЗ та цифрового вольтметра. Виміри здійснювали при діаметрі зонду 0,5 мкм.

### Результати та аналіз результатів дослідження

Для проведення фенотипового пошуку “натрометра” у ціанобактерії *Oscillatoria brevis* на першому етапі було необхідно визначити діапазон рН та концентрації іонів  $\text{Na}^+$  у середовищі, які б сприяли максимальній таксисній реакції гало- та алкалотолерантної ціанобактерії *Oscillatoria brevis*, яка в лужних умовах генерує електрохімічний градієнт іонів натрію замість  $\Delta\mu\text{H}^+$ . При цьому враховувалось, що максимальні таксисні реакції будуть спостерігатися за умови зменшення швид-

кості руху трихомів до 20—50% від швидкості руху у стандартному ростовому середовищі, що теоретично мусить співпадати з відповідним зниженням рівня електрохімічного трансмембранного градієнту іонів натрію. Тому вивчали залежність швидкості руху трихомів від концентрації  $\text{Na}^+$  у середовищах з двома фіксованими рН: 7,0 та 9,5.

Результати експериментів відображені на рис. 1. Низька швидкість руху трихомів спостерігалася в діапазоні концентрацій  $\text{Na}^+$  від 1 до 10 мМ, коли значення рН дорівнювало 7. За лужних умов рух бактерій блокувався майже повністю.

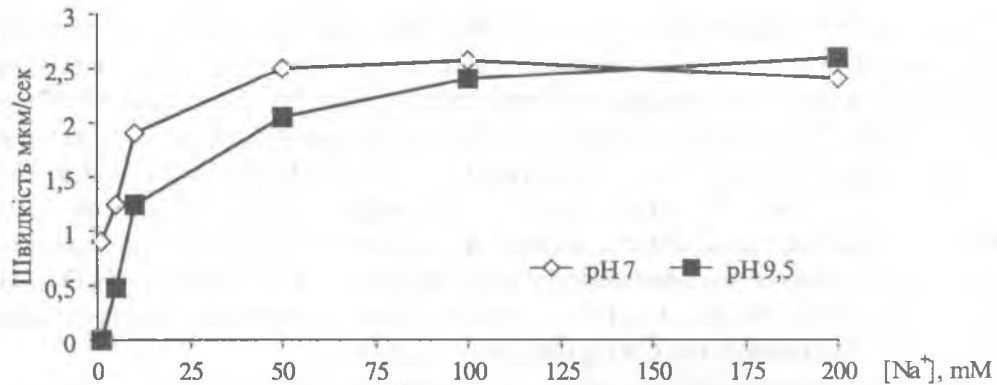


Рис. 1. Залежність швидкості руху трихомів *O. brevis* від концентрації  $\text{Na}^+$  при рН 7 та рН 9,5

В діапазоні концентрацій  $\text{Na}^+$  від 10 до 50 мМ та рН 9,5 швидкість руху трихомів *O. brevis* складала 50—80% від максимальної. Максимальна швидкість руху спостерігалася, коли концентрація  $\text{Na}^+$  перевищувала 100 мМ. Виходячи з цих результатів, для подальших досліджень ми використовували середовище з концентрацією  $\text{Na}^+$  10 мМ та рН 9,5.

З метою знайти ефективний інструмент для модуляції рівня електрохімічного потенціалу іонів натрію на цитоплазматичній мембрані *O. brevis* при пороговій концентрації натрію у середовищі, з'ясували вплив додатку проникаючого катіону  $\text{K}^+$  на фоні 10 мМ  $\text{Na}^+$ .

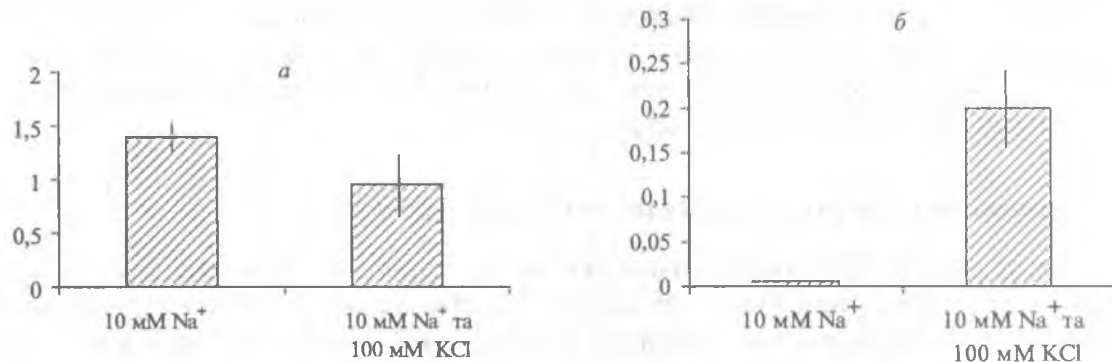


Рис. 2. Вплив додатку 100 мМ КСІ до середовища на швидкість руху та частоту реверсій трихомів *Oscillatoria brevis*: а — швидкість руху трихомів, б — частота реверсій трихомів

При порівнянні швидкостей руху трихомів у середовищах з 10 мМ Na<sup>+</sup> та 100 мМ KCl виявлено зменшення швидкості руху трихомів з 1,4 до 0,96 мкм/с (рис. 2, а).

Зменшення швидкості руху трихомів трапляється завдяки зниженню загального рівня мембранного потенціалу за додатку 100 мМ хлориду калію до середовища. При вивченні частоти реверсій трихомів у середовищі з хлоридом калію було з'ясовано, що близько 30% трихомів змінюють напрямок руху з частотою 1/50 с<sup>-1</sup> (рис. 2, б). Наведена частота значно більша частоти реверсій трихомів у контрольному середовищі без хлориду калію (1/160 с<sup>-1</sup>).

Цей факт можна пояснити тим, що за наявності хлориду калію у середовищі знижується рівень мембранного потенціалу у *O. brevis* і це призводить до підвищення частоти реверсій напрямку руху у трихомів.

Не виключено, що ця реакція є адаптивною відповіддю ціанобактерії на несприятливі умови для генерації  $\Delta\mu\text{Na}^+$ . Наведені дані узгоджуються з припущенням, що  $\Delta\mu\text{Na}^+$  є важливим компонентом механізму регуляції таксису у бактерій.

Згідно з концепцією існування у *O. brevis* системи “натрометра”, введення в середовище речовин, знижуючих  $\Delta\mu\text{Na}^+$ , призводить до генерування сигналу таксису та підвищення частоти реверсій трихомів.

Протонофор карбонілціанід-*m*-хлорфенілгідрозон (ХКФ) використовувався для зниження  $\Delta\psi$  ( $\Delta\psi$  — електрична складова  $\Delta\mu\text{Na}^+$ ) на цитоплазматичній мембрані ціанобактерій. Дослідження провадили при двох концентраціях протонофора: 5  $\mu\text{M}$  та 10  $\mu\text{M}$ . При концентрації ХКФ 5  $\mu\text{M}$  швидкість руху трихомів *O. brevis* у порівнянні з контролем зменшувалась незначно — на 15—18%. Дія більшої концентрації ХКФ (10  $\mu\text{M}$ ) призводила до падіння швидкості руху на 40%. Наявність 10  $\mu\text{M}$  ХКФ підвищувала частоту реверсій у частини трихомів з 1/160 (с<sup>-1</sup>) до 1/45 (с<sup>-1</sup>). При подальшій інкубації трихомів з ХКФ, частота реверсій поверталась до контрольного рівня.

Це явище можна пояснити тим, що на початкових етапах дії протонофора відбувається різке падіння  $\Delta\mu\text{Na}^+$  за рахунок зниження  $\Delta\psi$ . Можливо, деполяризація мембрани сприймається “натрометром”, котрий, в свою чергу, генерує внутрішньоклітинний сигнал, який викликає реверсію напрямку руху ціанобактерії. Відновлення вихідної частоти реверсій оброблених ХКФ трихомів можна пояснити подальшою стабілізацією  $\Delta\mu\text{Na}^+$  та адаптацією “натрометра” до його рівня.

Спостережуваний таксисний відгук трихомів залежить від фізіологічного стану культури ціанобактерії. Молодим трихомам, які швидко розмножуються, властива висока здатність до зміни частоти реверсій за наявності ХКФ. Таксисний відгук трихомів за умов стаціонарної фази росту культури був значно менший, можливо завдяки потовщенню клітинної стінки та зниженню її проникливості.

Електронейтральний Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> антипортер моненсин використовувався для зменшення  $\Delta p\text{Na}$  на цитоплазматичній мембрані ціанобактерій. При концентрації моненсину 5  $\mu\text{M}$  швидкість руху трихомів знижувалась на 25%. Характер таксисних відповідей був аналогічним таксисним реакціям у присутності 10  $\mu\text{M}$  ХКФ. Протягом перших 3—5 хвилин після додатку моненсину у деяких трихомах спостерігалось різке підвищення частоти реверсій з 1/160 до 1/15 (с<sup>-1</sup>). Далі частота реверсій цих трихомів знижувалась до початкового рівня. З цього можна зробити висновок, що зниження  $\Delta p\text{Na}$  сприймається системою “натрометра”, де наданий

сигнал трансформується у внутрішньоклітинний сигнал таксису, який викликає реверсію трихома.

Таким чином, з'ясувалось, що таксисні реакції трихомів *Oscillatoria brevis* викликаються зміною рівня  $\Delta\mu\text{Na}^+$ . ЖКФ та моненсин, які частково знижують компоненти  $\Delta\mu\text{Na}^+$ , стимулюють підвищення частоти реверсій трихомів *Oscillatoria brevis*. Цей факт може свідчити про існування механізму рецепції рівня  $\Delta\mu\text{Na}^+$  у гало- та алкалотолерантної ціанобактерії *Oscillatoria brevis*. Феномен рецепції рівня  $\Delta\mu\text{Na}^+$  у алкалотолерантних бактерій, можливо, пов'язаний з функціонуванням системи “натрометра”, яка ще потребує детальних досліджень переважно на молекулярно біологічному рівні.

Робота виконана за часткової підтримки Фонду фундаментальних досліджень України.

## Література

1. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран. — М.: Наука, 1989. — 567 с.
2. Brown I. I., Chaban Y., Ishmukhametov R., Lovenchuk I., Karakis S., Pogorelov D. The peculiarities of bioenergetics coupling in cyanobacteria under low  $\Delta\mu\text{H}^+$  and  $\Delta\mu\text{Na}^+$  in Marine cyanobacteria / Charpy L. & Larkum A.W. D. (eds) // Bulletin de l'Institut Oceanographique, special issue. — Monaco, 1999. — P. 229—234.
3. Brown I. I., Kirik I. I., Skulachev V. P. Light dependent  $\Delta\mu\text{Na}^+$  generation and utilization in the marine cyanobacterium *Oscillatoria brevis* // FEBS Lett. — 1990. — V. 270. — P. 203—206.
4. Glagolev A.N. Motility and taxis in prokaryotes. — New York: Harwood Acad. Publ., 1984.
5. Glagoleva T. N. Protonmotive force supports gliding in cyanobacteria // FEBS Lett. — 1980. — V. 117. — P. 49—53.
6. Hildebrandt E., Dencher N. Two photosystems controlling behavioral responses of *Halobacterium halobium* // Nature. — 1975. — V. 257. — P. 46—48.
7. Murvanidze G. V., Glagolev A. N. Calcium ions regulate reverse motion in phototactically active *Phormidium uncinatum* and *Halobacterium halobium* // FEMS Microbiology Letters. — 1981. — V. 12, № 1. — P. 3—6.
8. Skulachev V. P. Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts // Antonie Van Leeuwenhoek. — 1994. — V. 65(4). — P. 271—284.
9. Taylor B. L., Zhulin I. B., Johnson M. S. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria // Annual Rev. Microbiol. — 1999. — V. 53. — P. 103—128.

Погорелов Д. И., Броун И. И.

Кафедра биохимии, Одесский государственный университет,  
ул. Дворянская 2, Одесса, 65026, Украина

### СИСТЕМА ТАКСИСА У ГАЛЛО- И АЛКАЛОТОЛЕРАНТНОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ *OSCILLATORIA BREVIS*. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПОИСК “НАТРОМЕТРА”

#### Резюме

Скорость скользящего движения трихомов *Oscillatoria brevis* зависит от pH среды и концентрации  $\text{Na}^+$ . В условиях щелочного pH и концентрации  $\text{Na}^+$  10 мМ скорость движения трихомов ниже максимальной на 50%. В этих условиях снижение уровня  $\Delta\mu\text{Na}^+$  с помощью протонифора ЖКФ или  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортера моненсина приводило к значительному повышению частоты реверсий трихомов *O. brevis*. Таким образом, впервые получены экспериментальные факты о существовании механизма рецепции уровня  $\Delta\mu\text{Na}^+$  клетками *Oscillatoria brevis*.

Подобная система была предсказана В. П. Скулачевым и получила название “натрометр”.

**Ключевые слова:** цианобактерии, таксис, “натрометр”

**Pogoryelov D. I., Brown I. I.**

Odessa State University, Department of Biochemistry,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**TAXIS SYSTEM OF GALLO-ALKALITOLERANT CYANOBACTERIUM  
*OSCILLATORIA BREVIS*. EXPLORATION OF “SODIUMETER” FEATURES**

**Summary**

The dependence of the motility rate and the frequency of reversal motions of trichomes of gallo-alkalitolerant cyanobacterium *Oscillatoria brevis* on  $\Delta\mu\text{Na}^+$  ( $\Delta\mu\text{Na}^+$ ) has been studied. High pH and 10 mM of  $\text{Na}^+$  were found to decrease the motility of trichomes to 50% of the control. Protonophorus CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone) and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter monensin and  $\text{K}^+$  as penetrating cation stimulated the increase of the frequency of reversal motion of trichomes. The obtained data are considered as an evidence of the existence of  $\Delta\mu\text{Na}^+$  level reception on plasma membrane of *Oscillatoria brevis*.

**Key words:** cyanobacteria, taxis, ‘sodiumeter’