

## ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ТЕРМОЗАЩИТНОГО ВЛИЯНИЯ ОСМОЛИТОВ НА БАКТЕРИИ

© И. И. Морозов, В. Г. Петин

Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск;  
электронный адрес: mrrc@obninsk.ru

Исследовали влияние продолжительности пребывания бактерий *Escherichia coli* В/г в гипертоническом растворе NaCl на объем солевой термозащиты клеток в процессе последующего прогрева при 52 и 60 °С. Кроме того, изучали зависимость значений изотонической и термозащитной концентраций NaCl от температуры суспензионной среды, окружающей *E. coli* В/г. Установлено, что объем солевой термозащиты остается постоянным независимо от продолжительности предварительного пребывания микроорганизмов в условиях гипертонии. Показано, что с повышением температуры среды, окружающей клетки, величины изотонической и термозащитной концентраций осмолита возрастают. Анализ полученных и литературных данных свидетельствует не о дегидратационном, а о компенсационном механизме солевой термозащиты бактерий.

Ключевые слова: выживаемость бактерий, дегидратация, осмотический гомеостаз, прогрев, солевая термозащита.

Согласно данным литературы, многие соединения, существенно различающиеся по химическим свойствам, защищают клетки про- и эукариот от термповреждений, если их применяют в гипертонической концентрации (Covert, Woodburn, 1972, Beuchat, Worthington, 1978; Henle et al., 1984; Морозов, 1992). Для объяснения этого феномена традиционно руководствуются точкой зрения, согласно которой термозащитное действие подобных соединений обусловлено дегидратацией клеток и снижением активности воды (Koshikawa et al., 1986). В работах Морозова и соавторов (1990, 1999) и Морозова (1992) были получены данные, позволившие высказать другую гипотезу в отношении природы термозащитного влияния гипертонических растворов некоторых химических соединений, в соответствии с которой механизм термозащитного действия гипертонических растворов осмолитов состоит не просто в дегидратации прогреваемых клеток и снижении активности воды, а в компенсации с помощью этих растворов избытка осмотического давления в клетках в процессе прогрева.

Целью исследования являлось изучение природы термозащитного влияния гипертонических растворов осмолитов на клетки. Для достижения этой цели исследовали зависимость термоустойчивости бактерий *Escherichia coli* В/г от продолжительности пребывания их в изотоническом и гипертоническом фосфатных буферах перед прогревом при разных значениях температуры. Кроме того, с этой же целью изучали зависимость значений изотонической и термозащитной концентраций NaCl от величины температуры суспензионной среды, окружающей *E. coli* В/г.

### Материал и методика

Объектом исследования служили бактерии *E. coli* В/г. Бактерии инкубировали в питательном бульоне (1 % пептона, 1 % дрожжевого экстракта и 0.9 % NaCl) в течение

18 ч при 37 °С. Суспензии клеток разводили до концентрации 10<sup>8</sup> кл./мл в изотоническом фосфатном буфере (0.01 моль/л, pH 7.0) либо в фосфатном буфере (0.01 моль/л, pH 7.0), содержащем 4 % NaCl. После этого через определенные промежутки времени, в течение которых достигалась различная степень дегидратации клеток, осуществляли термогенное воздействие в ультратермостате ТА-150 при 52 и 60 °С. Процедура нагрева заключалась в следующем. С помощью микрошприца типа А-РН (Scientific Glass Engineering PTY LTD, Австралия) брали бактериальные пробы объемом 0.05 мл и переносили их в пластиковые пробирки с 5 мл подогретого до соответствующей температуры изотонического либо гипертонического фосфатного буфера. Время нагрева при 52 и 60 °С составляло 20 мин и 50 с соответственно. По окончании нагрева суспензии клеток охлаждали путем помещения пробирок с суспензиями в воду при комнатной температуре.

Исследования зависимости выживаемости бактериальных клеток от концентрации NaCl в среде нагрева проводили при низколетальной (50 °С), среднелетальной (52 °С) и высоколетальной (60 °С) температурах.

О выживаемости клеток судили по числу сформированных колоний после 18 ч инкубации посевов при 37 °С, осуществленных с помощью капельного метода определения числа жизнеспособных микроорганизмов (Морозов, 1983).

### Результаты и обсуждение

Если термозащитное влияние гипертонических растворов химических соединений действительно обусловлено дегидратацией клеток и снижением водной активности (Koshikawa et al., 1986), то в таком случае эффективность этой защиты должна зависеть от продол-

жительности пребывания клеток в гипертоническом растворе таких соединений перед нагревом, поскольку глубина клеточной дегидратации будет нарастать во времени по сравнению с начальным периодом помещения клеток в прогретый гипертонический буфер. Такое допущение вполне вероятно, поскольку скорость выхода воды из клеток, помещенных в гипертонический раствор, далеко не так велика и составляет величины от нескольких секунд (Перт, 1978) до нескольких минут (Рубинштейн, 1947).

На рис. 1, а приведены кривые зависимости выживаемости бактерий *E. coli* В/г при 52 °С от продолжительности их пребывания в изотоническом или гипертоническом фосфатном буфере перед прогревом в течение 20 мин в тех же средах. Видно, что выживаемость микроорганизмов, прогретых в условиях гипертонии, существенно выше по сравнению с таковой в случае прогрева их в условиях изотонии вследствие термозащитного влияния гипертонического раствора NaCl. Эти данные согласуются и с данными литературы (Beuchat, Worthington, 1978; Морозов и др., 1990; Morozov et al., 1997; Морозов, Петин, 2002). На рис. 1 также видно, что с увеличением продолжительности пребывания клеток в среде с повышенным осмотическим давлением объем термозащиты не только не возрастает, как этого следовало бы ожидать в случае дегидратационного механизма термозащиты (Koshikawa et al., 1986), но остается постоянным в течение 0.5 ч с последующим незначительным спадом, несмотря на то что глубина осмотической дегидратации клеток в этом случае должна нарастать в процессе их предварительного пребывания перед нагревом в условиях гипертонии. Во всяком случае, в рамках представлений о дегидратационном механизме повышения термоустойчивости клеток в гипертонических средах объем солевой термозащиты должен был бы нарастать в процессе выдерживания клеток в гипертоническом фосфатном буфере хотя бы по сравнению с таковым на начальном этапе подобной солевой обработки клеток, когда последние переносили из условий изотонии непосредственно в нагретый до 52 °С гипертонический фосфатный буфер и, следовательно, характеризовались перед прогревом нормальным уровнем насыщения водой. Тем не менее, как это видно на рис. 1, даже в первоначальный момент помещения клеток из условий изотонии в прогретый гипертонический фосфатный буфер объем солевой термозащиты уже максимален, несмотря на то что осмотическое давление клеток в этом случае изменялось и, следовательно, полной глубины дегидратации клетки еще не достигли.

Можно, конечно, допустить, что отсутствие влияния длительности пребывания клеток в гипертоническом растворе NaCl на величину термозащитного влияния осмолита обусловлено медленным (минуты) протеканием процессов термического повреждения микроорганизмов при 52 °С, в результате чего дегидратация клеток успевает реализоваться уже на ранней стадии прогрева, предшествующей развитию процессов клеточной гибели.

Для верификации этого допущения проведены подобные исследования при высокотемпературной температуре 60 °С, при которой летальные выдержки составляют не минуты, как в случае прогрева при 52 °С, а секунды, т. е. длительности, сопоставимые со временем дегидратации микроорганизмов в гипертоническом растворе осмолита (Перт, 1978).

Результаты этих исследований проиллюстрированы на рис. 1, б, на котором приведены кривые зависимости выживаемости бактерий *E. coli* В/г при 60 °С от продол-

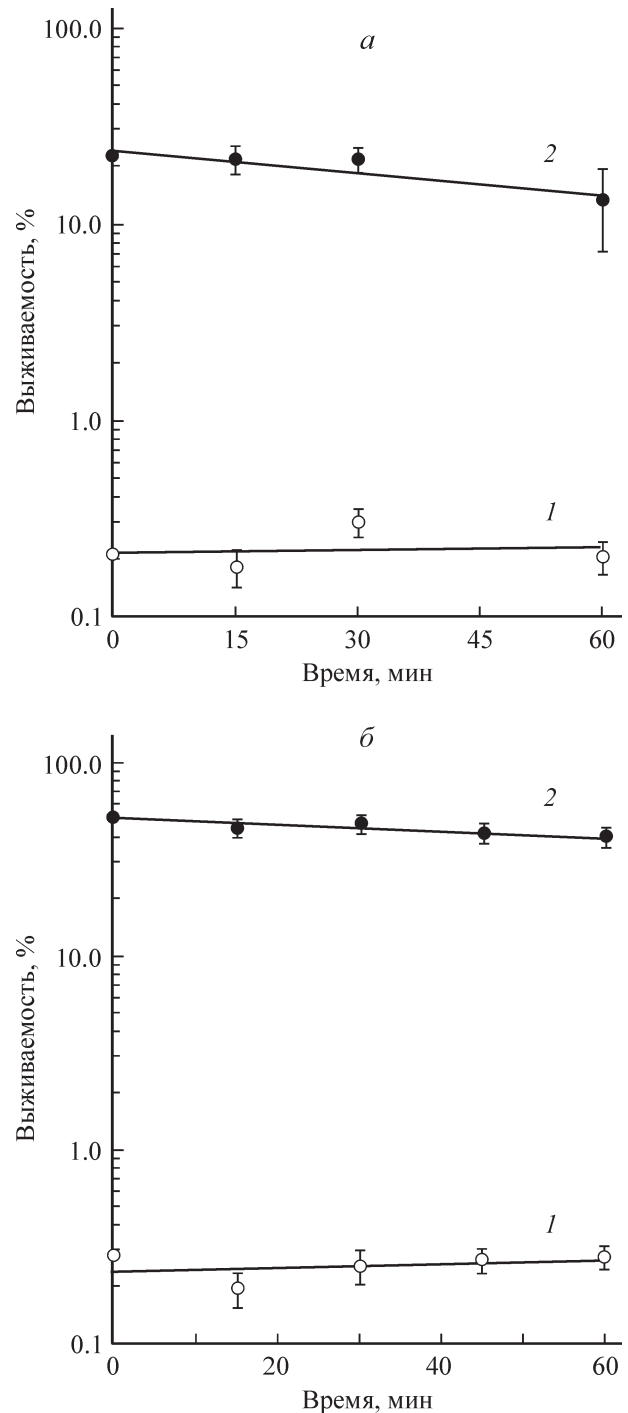


Рис. 1. Зависимость выживаемости бактерий *E. coli* В/г при 52 (а) или 60 (б) °С от продолжительности предварительного пребывания их в изотоническом фосфатном буфере (0.01 моль/л, рН 7.0), не содержащем (1) или содержащем (2) 4 % NaCl. Время нагрева 15 мин (а) или 50 с (б); вертикальные отрезки — 95%-ные доверительные интервалы средних значений.

жительности их пребывания в изотоническом или гипертоническом фосфатном буфере перед прогревом в течение 50 с в тех же средах.

На рис. 2 видно, что выживаемость бактерий, прогретых при более высокотемпературной температуре 60 °С, даже несколько выше, чем в случае прогрева при более низкотемпературной температуре 52 °С (рис. 1). Это обусловлено существенно менее длительной экспозиционной дозой,

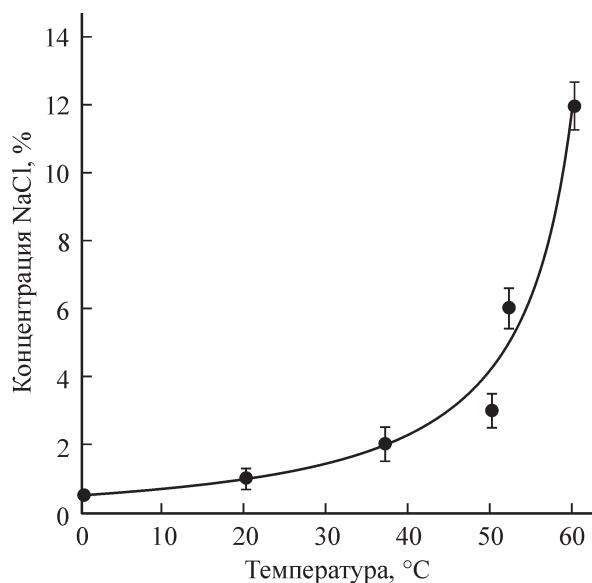


Рис. 2. Зависимость величины изотонической и максимально термозащитной концентрации NaCl, определяемой по максимальной выживаемости клеток, от температуры суспензионной среды бактерий *E. coli*.

используемой при 60 °C, которая составляет 15 мин при 52 °C (рис. 1). Кроме того, из данных рис. 2 следует, что при прогреве при 60 °C также имеет место термозащитное влияние условий гипертонии. При этом, как и после нагрева при 52 °C, в зависимости от продолжительности пребывания перед нагревом клеток в условиях гипертонии объем их термозащиты не только не возрастает по сравнению с таковым в начальный момент прогрева микроорганизмов в растворе осмолита, но и несколько снижается, что указывает на недегидратационную природу явления термозащиты бактерий гипертонической средой. Действительно, если бы это было не так, то перенос клеточных суспензий незамедлительно из условий изотонии в предварительно прогретый до 60 °C гипертонический раствор должен был бы сопровождаться менее эффективной термозащитой последнего по сравнению с теми случаями, когда клетки перед нагревом уже были помещены в гипертонический раствор осмолита и, следовательно, характеризовались более полной дегидратацией.

По нашим и литературным данным (Beuchat, Worthington, 1978; Морозов 1996), незамедлительный перенос после прогрева клеточных суспензий в среды, содержащие NaCl и другие осмолиты в гипертонических концентрациях, резко снижается выживаемость микроорганизмов. Следовательно, для проявления термозащитного клеточного эффекта важно присутствие осмолитов в гипертонической концентрации в среде прогрева в начальный момент прогрева и в процессе последующего теплового воздействия на клеточные суспензии, а не перед нагревом и тем более не после такового. Это свидетельствует об ином, а не дегидратационном механизме термозащитного влияния гипертонических растворов на клетки микроорганизмов, суть которого, по-видимому, состоит в компенсации избытка осмотического внутриклеточного давления, возникающего в процессе теплового воздействия в силу ряда причин, а чем подробно изложено ранее (Морозов и др., 1990, 1996; Морозов, 1992; Morozov et al., 1997).

По данным литературы, термозащитным действием обладают многие соединения, различающиеся по химиче-

ским и биохимическим свойствам. К таким соединениям относятся различные (Cotterill, Glauert, 1969; Beuchat, Worthington, 1978), сахара (Goepfert et al., 1970), многоатомные спирты (полиолы) (Henle, Waters, 1982) и белки теплового шока (шапероны) (Georgopoulos, 2006). Показано, что нагрев при сублетальных температурах увеличивает устойчивость бактерий к последующему нагреву при летальных температурах за счет синтеза de novo белков теплового шока (Plesofsky-Vig, Bramble, 1985). Что касается других соединений, то они обладают термозащитными свойствами в процессе однократного теплового воздействия только в определенном диапазоне гипертонических концентраций (Goepfert et al., 1970; Covert, Woodborn, 1972; Henle, Warters, 1982). Именно последнее обстоятельство и побудило некоторых авторов (Cotterill, Glauert, 1969) быть более осторожными при обсуждении водорегулирующих свойств этих соединений в процессах термозащиты. Они указывали, что NaCl регулирует активность воды, но при этом оказывает термозащитный эффект только в определенном диапазоне концентраций. Этот факт свидетельствует, таким образом, о том, что в основе термозащитных свойств осмолитов, по-видимому, лежат не просто процессы снижения водной активности, но компенсационные осмостабилизирующие события, обусловленные изменением осмотического гомеостаза клеток вследствие теплового воздействия.

Компенсационная гипотеза термозащитного влияния осмолитов на клетки представляется особенно убедительной с учетом данных таблицы, в которой представлены результаты исследования зависимости выживаемости бактерий *E. coli* В/г от концентрации NaCl в среде при температурах среды 50, 52 и 60 °C. Видно, что выживаемость клеток зависит от концентрации осмолита в среде прогрева в процессе теплового воздействия при всех приведенных выше температурах. Кроме того, из данных таблицы следует, что независимо от величины, действующей

#### Зависимость выживаемости бактерий *Escherichia coli* В/г от концентрации NaCl в среде при разной температуре среды

Концентрация NaCl, %	Доля клеток, выживших при разной температуре, <sup>а</sup> $\bar{x} \pm s_x$		
	50 °C	52 °C	60 °C
0	0.39 ± 0.03	0.080 ± 0.009 <sup>б</sup>	0.0040 ± 0.0005 <sup>б</sup>
1	0.59 ± 0.06	0.77 ± 0.08	0.018 ± 0.009
2	0.89 ± 0.09	5.60 ± 0.80 <sup>б</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>б</sup>
3	1.55 ± 0.20 <sup>б</sup>	—	—
4	1.48 ± 0.24 <sup>б</sup>	17.81 ± 1.92 <sup>б</sup>	0.89 ± 0.12 <sup>б</sup>
5	0.97 ± 0.08 <sup>б</sup>	—	—
6	0.37 ± 0.04	24.00 ± 2.14 <sup>б</sup>	4.40 ± 0.51 <sup>б</sup>
8	—	2.82 ± 0.29 <sup>б</sup>	14.13 ± 1.62 <sup>б</sup>
10	—	0.44 ± 0.05	26.09 ± 2.58 <sup>б</sup>
13	—	0.060 ± 0.008 <sup>б</sup>	23.92 ± 2.94 <sup>б</sup>
14	—	—	18.64 ± 1.93 <sup>б</sup>
20	—	—	6.72 ± 0.75 <sup>б</sup>

<sup>а</sup> Длительность инкубации при 50 °C — 3 ч, при 52 °C — 15 мин, при 60 °C — 90 с. <sup>б</sup> Достоверно отличается от значений, полученных при изотонической (1%) концентрации NaCl в суспензионной среде ( $P < 0.01$ ).

температуры по достижении определенной концентрации осмолита в среде прогрева термозащитный эффект становится максимальным и в последующем снижается, в результате чего происходит даже термосенсибилизация в процессе прогрева (например, при 50 и 52 °С), хотя глубина дегидратации клеток при этом и нарастает. Очевидно, такая реверсия термозащитного эффекта обусловлена избыточным обезвоживанием клеток с увеличением концентрации осмолита. По-видимому, для реализации термозащитного влияния хлорида натрия необходима не просто дегидратация клеток, но определенный уровень водного насыщения клеток, ниже и выше которого они претерпевают явление осмотического гипотонического либо гипертонического шока со всеми неблагоприятными для клеточной физиологии последствиями, о чем и свидетельствует куполообразная зависимость величины термозащиты от концентрации осмолита в среде нагрева. Такая куполообразная зависимость по форме напоминает кривые осмостойчивости клеток при физиологически нормальных температурах (Перт, 1978; Морозов и др., 1996).

Тот факт, что термосенсибилизирующая концентрация NaCl при 52 °С и термозащитная концентрация этого соединения при 60 °С могут совпадать, например при концентрации NaCl, равной 12 % (см. таблицу), дополнительно свидетельствует о недегидратационной природе явления солевой термозащиты выживаемости микроорганизмов, так как глубина дегидратации клеток при этих концентрациях осмолита одинакова, а термоэффект при нагреве разной интенсивности противоположный. Из данных таблицы также видно, что оптимальные концентрации осмолита, при которых проявляется максимальный эффект термозащиты в процессе теплового воздействия при разных температурах, нарастают с ростом действующей температуры. Аналогичные данные были получены и в работе Морозова и соавторов (1996), в которой было установлено, что изотонические концентрации NaCl в суспензионных средах, при которых наблюдалась максимальная выживаемость бактерий *E. coli* В/г и *E. coli* В/с<sub>1</sub>, также возрастают с ростом температуры окружающей клетки среды от 0 до 37 °С.

Сводные данные предыдущей (Морозов и др., 1996) и настоящей (см. таблицу) работ о зависимости величины изотонической и термозащитной концентраций NaCl от температуры суспензионной среды, окружающей клетки бактерий *E. coli* В/г, представлены на рис. 2, на котором видно, что с увеличением температуры величины изотонической (1—2 %) и термозащитной (3—12 %) концентраций осмолита, определяемые по максимальной выживаемости клеток, возрастают. При этом изотонические концентрации при нелетальных значениях температуры сменяются термозащитными и, очевидно, изотоническими концентрациями при летальных температурах среды, окружающей клетки. Здесь следует подчеркнуть, что использование в данном случае терминов «летальная» и «нелетальная» температуры носит чисто условный характер, поскольку эффективность роста (выживаемость) микроорганизмов зависит от комплексного воздействия на клетки термического и солевого (осмотического) факторов, а количественное соотношение величин этих факторов в любом температурном диапазоне (в том числе и нелетальном) может как снижать, так и повышать эффективность роста клеток микроорганизмов (Морозов и др., 1996, 1999).

Сам факт увеличения изотонических и термозащитных концентраций осмолита с ростом температуры сре-

ды, окружающей клетки, является весьма примечательным и свидетельствует об изменении осмотического гомеостаза клеток, в частности о повышении внутриклеточного давления при повышении температурного фактора. По-видимому, с ростом температуры среды, окружающей клетки, последние для сохранения баланса осмотических давлений в системе клетка—суспензионная жидкость нуждаются в увеличенных концентрациях осмолитов во внешней среде. В пользу этого предположения свидетельствуют и данные литературы, где показано, что при 20 °С клетки *Planococcus halophilus* растут при почти полном отсутствии в среде NaCl (0.01 моль/л). При повышении же температуры до 25 °С или выше для роста этих бактерий концентрация NaCl должна быть увеличена до 0.5 моль/л (Novitsky, Kushner, 1975). Таким образом, если эксперименты проводятся при 25 °С, то данные микроорганизмы можно классифицировать как высокоустойчивые к соли, тогда как при 20 °С их следует рассматривать как умеренные галофилы (Novitsky, Kushner, 1975). В свою очередь повышение концентраций ионов в среде требует более высоких температур для роста экстремальных галофилов *Sarcina litoralis* (Brown, 1964) и бактерий *E. coli* (Морозов и др., 1996).

Следовательно, температурные условия существования клеток микроорганизмов тесно связаны с тоничностью среды обитания таким образом, что увеличение или снижение значений одного из факторов автоматически повышает или снижает потребности клеток в другом факторе. С помощью подобного механизма клеткам, по-видимому, удается сохранять свой осмотический гомеостаз, т. е. определенное соотношение осмотических давлений содержимого клеток и окружающей их среды. Повышенные же температуры, нарушая это соотношение, увеличивают проницаемость клеток, что может быть одной из причин, снижающие их жизнеспособность. Об этом могут свидетельствовать и ранее полученные нами данные, согласно которым гипертонические концентрации NaCl не только повышают выживаемость бактерий *E. coli*, но и снижают их проницаемость, нарушенную в процессе теплового воздействия (Морозов, Петин, 2002).

Анализ всей совокупности полученных и литературных данных свидетельствует, таким образом, о том, что в основе термозащитного влияния повышенных (гипертонических) концентраций осмолита на бактерии лежат, по-видимому, не просто дегидратационные, а компенсационные процессы, позволяющие клеткам в условиях повышенных значений температуры окружающей среды сохранять клеточный осмотический гомеостаз, нарушенный в результате теплового воздействия.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-06-97201) и правительства Калужской обл.

#### Список литературы

- Морозов И. И. 1983. Метод определения числа жизнеспособных микроорганизмов. Лаб. дело. 9 : 60—62.
- Морозов И. И. 1992. Термическое повреждение клеток и их осмотический гомеостаз. Мед. радиология. 37 (11—12) : 39—42.
- Морозов И. И. 1996. Влияние агрегатного состояния, тоничности и содержания питательных веществ в среде на восстановление бактерий *Escherichia coli* от термоповреждений. Биофизика. 41 : 636—641.

- Морозов И. И., Ансимова Н. С., Дергачева И. П., Петин В. Г. 1990. Осмотический гомеостаз и терморadioустойчивость клеток при комбинированных воздействиях. В кн.: Проблемы синергизма в радиобиологии. Пушкино: НЦБИ. 102—112.
- Морозов И. И., Дергачева И. П., Ансимова Н. С., Петин В. Г. 1999. Особенности осмотической модификации последствий различной степени нагрева клеток. Цитология. 41 (7): 605—609.
- Морозов И. И., Морозова Г. В., Петин В. Г. 1996. Зависимость осмотических свойств бактерий *Escherichia coli* от температуры. Цитология. 38 (12): 1269—1273.
- Морозов И. И., Петин В. Г. 2002. О природе повышения термоустойчивости клеток *Escherichia coli* в процессе нагрева. Цитология. 44 (5): 450—454.
- Перт С. Дж. 1978. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. 331 с.
- Рубинштейн Д. Л. 1947. Общая физиология. М.: Медгиз. 646 с.
- Beuchat L. R., Worthington R. E. 1978. Injury and repair of gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. Adv. Appl. Microbiol. 23: 219—243.
- Brown A. D. 1964. Aspects of bacterial response to the ionic environment. Bact. Rev. 28: 296—329.
- Cotterill O. J., Glauert J. 1969. Thermal resistance of *Salmonella* in egg yolk products containing sugar or salt. Poultry Sci. 48: 1156—1166.
- Covert D., Woodburn A. 1972. Relationship of temperature and sodium chloride concentration to the survival of *Vibrio parahaemolyticus* in broth and vish homogenate. Appl. Microbiol. 23: 321—325.
- Georgopoulos C. 2006. Toothpicks, serendipity and the emergence of the *Escherichia coli* Dpa K (Hsp 70) and Gro EL (Hsp 60) chaperone machines. 174: 1699—1707.
- Goepfert J. M., Iskander I. K., Amundson C. H. 1970. Relation of the heat resistance of *Salmonella* to the water activity of the environment. Appl. Microbiol. 19: 429—433.
- Henle K. J., Monson T. P., Moss A. J., Nagle W. A. 1984. Protection against thermal cell death in *Chinese hamster ovary* cell by glucose, galactose, or mannose. Cancer Res. 44: 5499—5504.
- Henle K. J., Warters R. Z. 1982. Heat protection by glycerol *in vitro*. Cancer Res. 42: 2171—2176.
- Koshikawa T., Algie J. E., Tisa Z. S., Gernhardt P. 1986. Effect of water activity on heat resistance of vegetative cell of *Bacillus megaterium*. Spore News Lett. 7: 24—25.
- Morozov I. I., Petin V. D., Dubovick B. V. 1997. Influence of tonicity and chloramphenicol on hyperthermic cytotoxicity and cell permeability under various heating rates. Int. J. Hyperthermia. 13: 49—57.
- Novitsky T. J., Kushner D. J. 1975. Influence of temperature and salt concentration on the growth of a facultatively halophilic «*Micrococcus*» sp. Can. J. Microbiol. 21: 107—110.
- Plesofsky-Vig N., Bramble R. 1985. Heat shock response of *Neurospora crassa*: protein synthesis and induced thermotolerance. J. Bacteriol. 162: 1083—1091.

Поступила 20 II 2007

#### ABOUT THE CHARACTERS OF THERMOPROTECTION IN INFLUENCE OF OSMOLITES ON BACTERIA

I. I. Morozov, V. G. Petin

Medical Radiological Research Center RAMS, Obninsk;  
e-mail: mrrc@obninsk.ru

The influence of the length of staying of *Escherichia coli* B/r cells in hypertonic NaCl solution before heating at 52 and 60 °C on the magnitude of salt thermoprotection was investigated. In addition, the dependence of the isotonic and thermoprotective NaCl concentrations on the exposure temperature was investigated. It was shown that the volume of cell osmotic thermoprotection was independent on the length of preliminary staying of microorganisms in hypertonic NaCl solution. It was also shown that the magnitude of isotonic and thermoprotective osmolite concentrations increased with the increase in the exposure temperature. The analysis of the data obtained and published in literature indicates that the compensating mechanism is involved in salt bacteria thermoprotection rather than the dehydration one.

Key words: heating, salt thermoprotection, dehydration, osmotic homeostasis, bacteria survival.