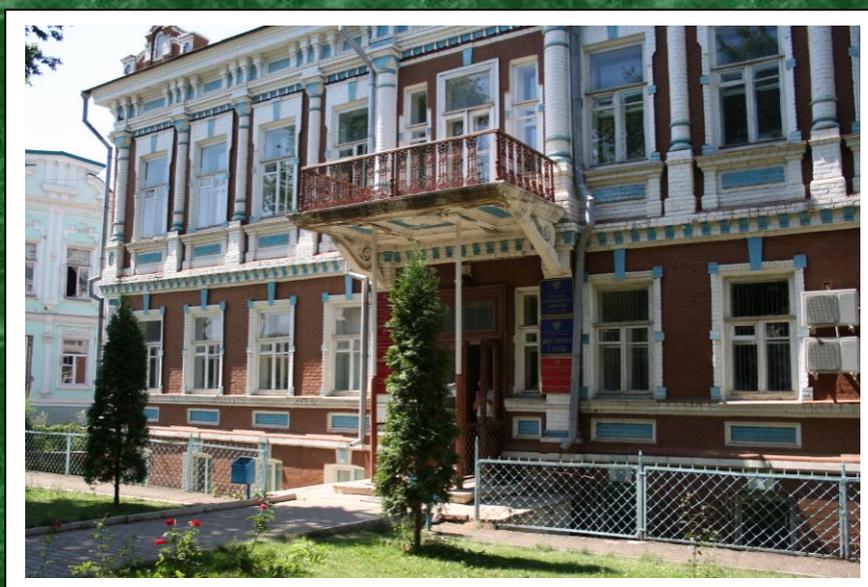


ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2012 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Е.А. Селиванова, 2012

УДК 574.58

Е.А. Селиванова

МЕХАНИЗМЫ ВЫЖИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия
Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург, России,

В статье проанализированы литературные данные о механизмах функционирования микроорганизмов и их сообществ в гиперосмотических условиях. Показано, что выживание микроорганизмов в экстремальных условиях водоемов с повышенной минерализацией обеспечивается за счет механизмов, реализуемых на клеточном, популяционном и биоценоотическом уровнях.

Ключевые слова: гиперосмотические условия, галофильные микроорганизмы, механизмы выживания.

E.A. Selivanova

MECHANISMS OF MICROORGANISMS SURVIVAL IN CONDITIONS OF HIGH OSMOTIC PRESSURE

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia
Orenburg State Medical Academy, Orenburg, Russia

Literary data on the mechanisms of functioning of microorganisms and their communities in hyper osmotic conditions are summarized in the article. It is shown that the survival of microorganisms in extreme conditions of saline reservoirs is provided at the expense of the mechanisms realized at cellular, population and biocenosis levels.

Key words: hyper osmotic conditions, halophilic microorganisms, mechanisms of survival.

Условия повышенного осмотического давления традиционно рассматриваются как экстремальные для существования живых организмов [11]. Лимитирующее влияние высокой солености связано со снижением активности воды, так как растворенные соли притягивают на себя молекулы воды, и таким образом, снижают их подвижность, конкурируя с клеточными компонентами за доступные молекулы воды [1, 11]. В условиях осмотического стресса микроорганизмы должны быть способными поддерживать свой объем и тургор [11].

Накопленный материал свидетельствует о существовании различных

факторов, способствующих успешному выживанию микроорганизмов в гиперосмотических условиях [11]. Наиболее изученными в этом аспекте оказались умеренные галофильные бактерии и экстремальные галофилы, представленные, в основном, археями, которые выделяются как из Мертвого моря с минерализацией 34% [39], так и из лагун для выпаривания соли и из древних соляных отложений [31]. Показано, что кроме архей к группе экстремальных галофилов относятся некоторые бактерии, например, *Salinibacter ruber* [36]. Большинство умеренных галофилов – это бактерии, некоторые археи, а также эукариотические организмы, среди которых отмечены как автотрофные, так и гетеротрофные протисты [21].

Значительный объем накопленной информации о факторах выживания микроорганизмов в условиях повышенной минерализации нуждается в систематизации. Наиболее естественной представляется классификация по уровням организации живого, которая отражает формирующиеся на разных этапах эволюции механизмы адаптации микроорганизмов к гиперосмотическим условиям: клеточный, популяционный и биоценотический уровни адаптации.

К механизмам выживания, реализуемым микроорганизмами на клеточном уровне, можно отнести:

1. Модификация механизмов транспорта ионов через цитоплазматическую мембрану.

Одним из примеров подобного механизма является эффективная система транспорта ионов, обнаруженная у экстремально галофильных архей [10], у которых ионы Na^+ активно выводится из клетки в обмен на поступление ионов K^+ . Высокая внутриклеточная концентрация ионов K^+ компенсирует осмотическое давление среды и поддерживает тургор клетки. Подобная стратегия осмоадаптации была обнаружена также у бактерий рода *Salinibacter* [35], обладающих галотолерантностью, сравнимой с экстремально галофильными археями.

Другим способом осмоадаптации является уменьшение проницаемости цитоплазматической мембраны для ионов. Стабилизация мембраны может происходить за счет увеличения содержания кислых фосфолипидов, описанного у большинства галотолерантных и галофильных бактерий [24]. Высказано предположение, что снижение проницаемости мембраны для ионов, поступающих извне, может быть связано с присутствием в ней особых белков

AcсrA [32].

2. Устойчивость внутриклеточных структур и ферментов к высоким концентрациям ионов.

Этот механизм эволюционно сложился у экстремальных галофилов. В клетке этих микроорганизмов, обитающих в гиперосмотических условиях, содержание KCl может достигать 5 М, что превышает концентрацию данного вещества в окружающей среде более чем в 100 раз [10]. Ферменты и рибосомы экстремальных галофилов не только не чувствительны к соли, но и эффективно функционируют в насыщенных солевых растворах [16]. Наоборот, при снижении осмотического давления ферментативные системы галобактерий дестабилизируются.

3. Синтез и накопление осмопротекторов - низкомолекулярных осмотически активных веществ.

Этот механизм является, пожалуй, наиболее гибким ответом организмов на проблему ограниченной доступности воды [26]. Совместимые растворимые вещества синтезируются в ответ на повышенную осмолярность и накапливаются в цитоплазме в концентрациях до 1 М для защиты клетки от дегидратации и поддержания внутриклеточной активности биомолекул [11]. Осмопротекторы, представляя собой конечные метаболиты, характеризуются общими признаками: высокая растворимость, отсутствие разноименно заряженных центров и влияния на ферментативную активность [1]. Этот механизм поддержания тургорного давления клетки в условиях сниженной активности воды использует большинство аэробных гетеротрофных галофильных бактерий [40], фотосинтетических прокариот и эукариот, грибов, а также галофильные метаногенные археи [34] и некоторые эукариоты. К осмопротекторным соединениям относятся сахароза, трегалоза, гликозилглицерол, диметилсульфониопропионат, пролин, эктоин, N α -ацетилорнитин, гидроксиэктоин, N δ -ацетилглутамилглутаминамид, N δ -кабамоилглутаминамид, N α -ацетиллизин, D-маннитол, D-глюцитол, L-таурин. Наиболее эффективными из них являются трегалоза, бетаин, эктоин и пролин, создающие высокое осмотическое давление при сравнительно низких концентрациях [1]. В этом ряду выделяется трегалоза, относящаяся к убиквитарным дисахаридам биосферы, изолируемым из широкого круга организмов как эукариотических, так и прокариотических. Ее протективный

эффект связан со стабилизацией мембран и предохранением их от энзиматической активности. Трегалоза, как и другие полиолы, может действовать за счет перемещения молекул воды, вовлеченных в поддержание третичной структуры белков, через множество водородных связей [27].

Разные группы микроорганизмов накапливают определенные осмопротекторы. Так, углеводы и спирты наиболее характерны для эукариот. Зеленые водоросли рода *Dunaliella* накапливают глицерин [17], причем его содержание у галофильной *Dunaliella viridis* выше, чем у морской водоросли *Dunaliella tertiolecta* [11], и при солености 24,7% - составляет 4,4 М [19]. Дрожжи содержат повышенные концентрации арабинозы и маннита. У сине-зеленой водоросли *Microcoleus chthonoplastes* в гиперосмотических условиях накапливаются гликозилглицерин и трегалоза, *Synechococcus* накапливает α -гликозилглицерол [20], а *Aphanothese halophytica* – бетаин и глутамат [19]. Бактерии в условиях повышенной солености накапливают азотсодержащие вещества. Глутаминовая кислота, пролин и бетаин концентрируются в клетках галотолерантов и умеренных галофилов. Описано, что глутамин наиболее характерен для *Micrococcus varians* и бактерий рода *Planococcus*, пролин - для галотолерантных стрептомицетов и *Staphylococcus aureus* [13], у *Halomonas elongata* обнаружен эктоин [33]. Что касается механизмов управления, то регуляция синтеза эктоина и глутамата у *Halomonas elongata* осуществляется на уровне энзиматической активности, поэтому его концентрация быстро нарастает в условиях осмотического шока [30]. Известно, что при элиминации плазмид из *Halomonas elongata* бактериальные клетки утрачивают способность к росту в присутствии высоких концентраций NaCl, с другой стороны, у *Marinococcus halophilus* расшифрована последовательность ДНК, охарактеризованная как стресс-ответственный промоторный регион, контролирующий синтез эктоина [18].

Инфузория *Paramecium calkinsi* и *Acanthamoeba castellanii* реагируют на осмотический стресс повышением содержания внутриклеточных аминокислот [22, 25].

К механизмам выживания, реализуемым галотолерантными и галофильными микроорганизмами на популяционном уровне, относятся:

1. *Гетерогенность популяции, в том числе образование покоящихся стадий (споры, некультивируемые формы бактерий, цисты простейших и*

микроводорослей).

Образование спор способствует сохранению бактерий в неблагоприятных условиях. Показана их хорошая выживаемость в соленой воде [11], а также постоянное присутствие в галофильном сообществе.

Возможность перехода в некультивируемое состояние с сохранением жизнеспособности описана для *Escherichia coli* и некоторых других фекальных микроорганизмов в морских местообитаниях [23]. Накоплено множество фактов, подтверждающих длительное сохранение покоящихся форм древних галобактерий в соляных отложениях Пермского периода [28].

2. Обособление в колониях, биопленках и микробных матах.

В настоящее время, накоплены факты, подтверждающие, что отдельная бактериальная клетка – это не автономное существо, а единица сложного сообщества [2]. Несомненно, внутривидовые взаимодействия приобретают особую роль для выживания микроорганизмов в экстремальных условиях среды. Одним из проявлений «социального поведения» бактерий является их микроразнообразие в виде бактериальных пленок, микроколоний и т.д., обеспечивающее обособление от губительно действующих факторов среды [6]. Наиболее изученными являются галофильные маты, формирующиеся в гиперсоленых морских лагунах, представляющие собой прокариотное сообщество, объединенное неклеточным матриксом и имеющее слоистую структуру [8]. Сравнение послойного распределения микроорганизмов в галофильных матах соленых водоемов показало их значительное сходство во всех странах света [3]. Галофильные маты представляют собой особый пример сообщества бактерий и сине-зеленых водорослей, объединенных не только тесными структурными связями, но и функциональными взаимодействиями, формирующимися на основе трофических связей между организмом-эдификатором и различными группами бактерий – пурпурными бактериями-фотосинтетиками *Chromatium*, серобактериями *Thiothrix* и цианобактериями *Aphanothese* [5].

К механизмам выживания, реализуемым на биоценотическом уровне, можно отнести:

1. Трофические взаимодействия, объединяющие функциональные группы микроорганизмов с различными пищевыми ресурсами в полноценное микробное сообщество.

В процессе такого взаимодействия продукты обмена одного организма являются субстратом для другого [9], что лежит в основе формирования трофических цепей. В результате в водоеме осуществляется непрерывный круговорот биогенных элементов. В водоемах с экстремальными условиями формируются особые высокоприспособленные прокариотные реликтовые сообщества микроорганизмов. Наиболее яркими примерами высокоструктурированных объединений микроорганизмов на основе трофических цепей являются микробные маты, представляющие собой особый пример сообщества бактерий и цианобактерий, объединенных не только тесными структурными связями, но и функциональными взаимодействиями, формирующимися на основе трофических связей между организмом-эдификатором и различными группами бактерий – пурпурными бактериями-фотосинтетиками *Chromatium*, серобактериями *Thiothrix* и цианобактериями *Arphanothese* [5]. Роль взаимодействия различных трофических групп микроорганизмов в гипергалинных условиях была проиллюстрирована на примере утилизации органических и неорганических источников азота альго-бактериальной группировкой в Большом Соленом озере с использованием микрокосмов [37].

2. Обмен осмопротекторами в ассоциациях микроорганизмов.

Совместимые регуляторные вещества обычно присутствуют в окружающей среде, так как их синтезируют *de novo* многие бактерии, растения и животные. К тому же в эвтрофных водоемах некоторые типичные компоненты клеток (липиды, белки) могут гидролизоваться с образованием предшественников специфических осморегуляторов [1]. У галофильных бактерий *Marinococcus halophilus*, синтезирующих эктоин как основное совместимое растворимое вещество, доказано и одновременное поглощение его из среды, так как этот путь пополнения эктоина энергетически более выгодный. Причем, повышение солености среды ведет к более интенсивному поглощению эктоина и глицинбетаина через соответствующие осморегуляторные транспортные системы [41]. У *Halomonas elongata* также описана осморегуляторная транспортная система для эктоина, которая позволяет не только поглощать внешний эктоин, но и восполнять собственные потери за счет утечки через клеточную мембрану. Установлено, что и для транспорта глицинбетаина существует специфическая система [38]. Наряду с галофилами

осморегуляторные транспортные системы были изучены у негалофильных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Corynebacterium glutamicum* [41]. В то же время, показано влияние эктоина на выживание негалофильных бактерий в гиперосмотических условиях, в том числе санитарно-показательных, например *E. coli* [29].

Таким образом, в гиперосмотических местообитаниях складывается возможность обмена осмопротекторами между различными микроорганизмами. Так, энтеробактерии, не имеющие достаточно эффективных собственных клеточных механизмов выживания в гиперосмотических условиях, взаимодействуют с галофилами, что способствует их более успешному выживанию в этой экологической нише. Характерно, что протективный эффект по отношению к аллохтонной микрофлоре могут обеспечивать не только прокариотические, но и эукариотические микроорганизмы [12].

3. Межмикробный антагонизм.

Межмикробный антагонизм является частным проявлением межвидовой борьбы за существование. В микробных биоценозах эта борьба реализуется как за счет конкуренции за трофический субстрат, так и путем образования вторичных микробных метаболитов, в том числе антибиотиков. Явление это широко распространено, и галофильное сообщество не является исключением. Образование вторичных микробных метаболитов, в том числе антибиотиков активно исследуется у патогенных бактерий и бактерий-симбионтов [14]. Выделение антибиотиков и бактериоцинов дает преимущество в конкурентной борьбе за экологическую нишу, направлено на выживание и обеспечивает доминирование образующих их микроорганизмов в сообществе. Антагонистическое влияние представителей автохтонной микрофлоры обеспечивает колонизационную резистентность биотопа, предотвращая его заселение аллохтонными видами. Подобный эффект отмечен при воздействии водорослей рода *Dunaliella* на бактерии *Pseudomonas saccharophila* [4]. Антагонистическое действие *D. maritima* авторы предположительно связывают с бактерицидным действием белково-хлорофильного комплекса.

4. Функциональные связи.

Малоизученными для галофильного сообщества остаются функциональные взаимодействия «лизосим-антилизосим», «гистон-антигистон», «пероксид водорода-каталаза». В литературе имеются данные о

взаимосвязи синезеленой водоросли *Microcoleus chthonoplastes*, характеризующейся высокой продукцией пероксида водорода и отсутствием каталазы, и галофильных бактерий с высокой каталазной активностью [7]. В условиях повышенной солености показано существование взаимодействий по типу «лизоцим-антилизоцим» и «гистон-антигистон», способствующих выживанию бактерий [15].

Таким образом, выживание микроорганизмов в экстремальных условиях водоемов с повышенной минерализацией обеспечивается за счет механизмов, реализуемых на клеточном, популяционном и биоценоотическом уровнях. Автохтонные и аллохтонные негалофильные микроорганизмы, не имеющие достаточно эффективных собственных клеточных механизмов адаптации к гиперосмотическим условиям, выживают в сообществе за счет симбиотических связей с галофилами.

(Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа» (проект № 12-П-4-1039) и гранта УрО РАН № 12-И-4-2034).

Литература.

1. Адхья С., Альперт К.-А., Буккель В. и др. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах. Пер. с англ. Под ред. Й.Ленгелера, Г.Древса, Г.Шлегеля. М., Мир, 2005.
2. Бухарин О.В., Гинзбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М., Медицина, 2005.
3. Венецкая С.Л., Герасименко Л.М. Электронно-микроскопическое изучение микроорганизмов в галофильном цианобактериальном сообществе. Микробиология. 1988, 57 (3): 450-457.
4. Вольберг М.М. Взаимодействие популяций микроводорослей и бактерий в модельной системе. Автореферат ... канд. биол. наук. Москва, 1988.
5. Герасименко Л.М., Митюшина Л.Л., Намсараев Б.Б. Маты *Microcoleus* из алкалофильных и галофильных сообществ. Микробиология. 2003, 72 (1): 84-92.
6. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum-sensing», или социальная жизнь бактерий. Журн. микробиол. 2003, 4: 86-93.
7. Дубинин А.В., Застрижная О.М., Гусев М.В. Продукция перекиси водорода галофильной цианобактерией *Microcoleus chthonoplastes*. Успехи современной биологии. 1992, 61 (3): 384-389.
8. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М., Наука, 2003.
9. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М., Книжный дом «Университет», 2001.
10. Звягинцева И.С. Галобактерии. Успехи микробиологии. М., Наука, 1989, 23: 112-137.
11. Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М., Мир, 1981.
12. Немцева Н.В., Селиванова Е.А., Плотников А.О. Роль симбиотических взаимодействий в выживании микроорганизмов в гипергалинных водоемах. Журн. микробиол. 2006, 4: 117-120.
13. Николаев Ю.А., Матвеева Н.И., Плакунов В.К. Влияние солености среды на содержание

- аминокислот в клетках галотолерантной бактерии *Micrococcus varians*. Успехи современной биологии. 1992, 61 (3): 359-362.
14. Рыбальченко О.В., В.М. Бондаренко, Н.Б. Вербицкая Проявление антагонистического действия бактериоциногенных *Lactobacillus acidophilus* на клетки *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* и *Proteus mirabilis*. Журн. микробиол. 2006, 7: 8-11.
 15. Селиванова Е.А. Персистентные свойства микроорганизмов, обитающих в высокоминерализованных водоемах. Журн. микробиол. 2012, 4: 62-66.
 16. Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. М., Мир, 1979.
 17. Ven-Amotz A. *Dunaliella* β -Carotene from Science to Commerce. In: Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments. J. Seckbach (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1999.
 18. Bestvater T., Galinski E.A. Investigation into a stress-inducible promoter region from *Marinococcus halophilus* using green fluorescent protein. *Extremophiles*. 2002, 6: 15–20.
 19. Borowitzka L.J. The microflora. *Hydrobiologia*. 1981, 81: 33-46.
 20. Borowitzka L.J., Demmerle D., Mackay M.A. et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of osmoregulation in a blue-green algae. *Science*. 1980, 210: 650-651.
 21. Cho B.C. Heterotrophic flagellates in hypersaline waters. In: Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. (eds) *Adaptation to life at high salt concentration in Archaea, Bacteria, and Eucaria*. Springer-Verlag, 2005: 543-549.
 22. Cronkite D.I., Neuman J., Walker D., et al. The response of contractile and non-contractile vacuoles of *Paramecium calkinsi* to widely varying salinities. *J. Protozool.* 1991, 38: 565-573.
 23. Davies C.M., Long J.A.H., Donald M., Ashbolt N.J. Survival of Fecal Microorganisms in Marine and Freshwater Sediments. *Appl. and Env. Microbiology*. 1995, 61 (5): 1888-1896.
 24. Doronina N.V., Krauzova V.I., Trotsenko Yu.A. *Methylophaga limanica* sp. nov.: A New Species of Moderately Halophilic, Aerobic, Methylophilic Bacteria. *Microbiology*. 1997, 66 (4): 434-439.
 25. Drainville G. Osmoregulation in *Acanthamoeba castellanii*. Variation of the concentration of free intracellular amino acids and the water content. *Comp. Biochem. Physiol.* 1973, 45A: 379-388
 26. Galinski E.A., Търпер H.G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems // *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, 15: 95–108.
 27. González-Hernández J.C., Jiménez-Estrada M., Peca A. et al. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress // *Extremophiles*. 2005, 9: 7–16.
 28. Gruber C., Legat A., Pfaffenhuemer M. et al. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles*. 2004, 8: 431–439.
 29. Jebbar M., Talibart R., Gloux K. et al. Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J. Bacteriol.* 1992, 174: 5027-5035.
 30. Kraegeloh A., Kunte H. J. Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongate*. *Extremophiles*. 2002, 6: 453–462.
 31. Mormile M.R., Biesen M.A., Gutierrez M.C. et al. Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusion. *Environ. Microbiol.* 2003, 5 (11): 1094–1102.
 32. Nakamura H. Salt sensitivity of cells. In: *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. J. Seckbach (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1999: 369-385.
 33. Ono H., Sawada K., Khunajakr N., Tao T., Yamamoto M., Shinmyo A., Takano M., Murooka Y. Characterization of Biosynthetic Enzymes for Ectoine as a Compatible Solute in a Moderately Halophilic Eubacterium, *Halomonas elongata*. *J. Bacteriol.* 1999, 181 (1): 91-99.
 34. Oren A. The Enigma of Square and Triangular Halophilic Archea // *Enigmatic Microorganisms*

- and Life in Extreme Environments. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1999: 339 – 355.
35. Oren A., Heldal M., Norland et al. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic Bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*. 2002, 6: 491–498.
 36. Peca A., Valens M., Santos F. et al. Intraspecific comparative analysis of the species *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*. 2005, 9: 151–161.
 37. Post F.J., Stube J.C. A microcosm study of nitrogen utilization in the Great Salt Lake, Utah. *Hydrobiologia*. 1988, 158: 89-100.
 38. Tschichholz I., Търпер H.G. Fate of compatible solutes during dilution stress in *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1990, 73: 181-186.
 39. Ventosa A., Arahal D.R. Microbial life in the Dead Sea. In: *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. J. Seckbach (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1999: 357-368.
 40. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62: 504–544.
 41. Vermeulen V., Kunte H.J. *Marinococcus halophilus* DSM 20408T encodes two transporters for compatible solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM. *Extremophiles*. 2004, 8: 175–184.

Поступила 20.09.2012

(Контактная информация: Селиванов Елена Александровна - к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории водной микробиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. (3532) 775417; E-mail: selivanova-81@mail.ru)