



Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na metabolizm mikroorganizmów

Małgorzata Giel-Pietraszuk

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Effect of high hydrostatic pressure on metabolism of microorganisms

Summary

During last years a renewed interest in high hydrostatic pressure (HHP) has been observed particularly in food and pharmaceutical industry where is uses for preservation and sterilization of products. Pressure is a physical factor affecting conformation of biological macromolecules and influencing chemical reactions without introduction of any additional agents, e.g. salts. So it is a considerable factor in basic research, which enables analysis of the mechanism of conformational changes of nucleic acids, proteins and lipids as well as interactions between molecules. Detailed analysis of these processes is valuable not only from cognitive point of view but it has very important practical aspect. HHP become wider and wider used for inactivation of bacteria so recognition of its influence on entire cell is important for safety of consumers and patients.

Key words:

high hydrostatic pressure, microorganisms.

1. Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania wysokim ciśnieniem hydrostatycznym (HHP, ang. *High Hydrostatic Pressure*) zarówno w przemyśle spożywczym jak i farmaceutycznym, gdzie wykorzystywane jest do konserwacji żywności i sterylizacji produktów medycznych. Ciśnienie jest czynnikiem fizycznym, który modyfikuje strukturę makrocząsteczek biologicznych oraz wpływa na reakcje chemiczne bez konieczności wprowadzania do układu innych związków chemicznych, jak

Adres do korespondencji

Małgorzata
Giel-Pietraszuk,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań.

np. sole. Jest, zatem istotnym czynnikiem w badaniach podstawowych pozwalającym na analizę mechanizmu zmiany konformacji białek, kwasów nukleinowych i lipidów. Pozwala również lepiej poznać mechanizmy rządzące oddziaływaniami pomiędzy pojedynczymi cząsteczkami oraz ich kompleksami. W pracy tej omówione będą wyniki badań wpływu HHP na komórki mikroorganizmów i procesy w nich zachodzące. Poznanie tych procesów ma nie tylko walor poznawczy, ale również praktyczny z punktu widzenia bezpieczeństwa produktów żywnościowych czy farmaceutycznych sterylizowanych za pomocą HHP.

2. Wpływ HHP na mikroorganizmy

Ciśnienie powoduje zmianę metabolizmu mikroorganizmów bądź ich inaktywację. W szeroko zakrojonych badaniach mających na celu poznanie jego wpływu na organizmy żywe prowadzonych na bakteriach i grzybach różnych gatunków wykazano, że mikroorganizmy są odporne na kompresję w pewnych zakresach ciśnienia. Najbardziej odporne są spory, czyli formy przetrwalnikowe w stanie spoczynku, formy czynne (kiełkujące spory) wykazują większą wrażliwość. Generalnie wzrost i podział komórek organizmów mezofilnych, przystosowanych do życia pod ciśnieniem atmosferycznym (0,1 MPa) w zakresie 0,1-50 MPa ulega zahamowaniu proporcjonalnie do wzrostu ciśnienia (1,2). Na przykładzie *E. coli* pokazano, że ruchliwość bakterii zmniejsza się wraz ze wzrostem ciśnienia co spowodowane jest inhibicją tworzenia nowych wici oraz zaburzeniem funkcjonowania już istniejących (2). Wraz ze wzrostem ciśnienia inhibicji ulegają również tak istotne dla życia procesy, jak replikacja, transkrypcja i translacja oraz transport wewnątrzkomórkowy wartości ciśnienia, w których zahamowanie danego procesu następuje w 100% przedstawiono w tabeli 1 (2-6). Ciśnienie powyżej 200 MPa powoduje całkowitą inaktywację większości mikroorganizmów (7-10).

Tabela 1

Procesy komórek *E. coli* wrażliwe na działanie wysokiego ciśnienia

Proces	HHP(MPa) w którym następuje 100% inhibicja procesu	Uwagi Badany proces oceniano na podstawie:	Literatura
1	2	3	4
ruchliwość	61,2	drogi przebytej przez bakterie w kapilarze wypełnionej agarrem	(2)
transport wewnątrzkomórkowy	26,5	transportu IPTG w komórce	(3)
podział komórkowy	50	obserwacji tworzenia filamentów	(4)
wzrost	50	oznaczenia wartości cfu/ml	(5)

1	2	3	4
replikacja	50	inkorporacji [¹⁴ C]tyminy do DNA	(5)
translacja	67	inkorporacji [¹⁴ C]uracylu do RNA	(5)
transkrypcja	77	inkorporacji [¹⁴ C]leucyny do białka	(5)
zdolność utrzymania przy życiu	100	oznaczenia wartości OD ₆₀₀ i cfu/ml	(6)

2.1. Wpływ HHP na bakterie mezofilne

Bakterie *E. coli* są najbardziej popularnym modelem w badaniach wpływu HHP z uwagi na pokrewieństwo z barofilami (organizmy przystosowane do życia w warunkach zwiększonego ciśnienia). W zakresie 10–40 MPa obserwowano wydłużanie się komórek *E. coli*. Ich długość pod ciśnieniem 40 MPa zwiększała się 7-krotnie. Efekt ten powoduje pozorny wzrost stężenia bakterii po kompresji obserwowany jako wzrost wartości absorbancji zawiesiny. Zjawisko to jest całkowicie odwracalne po obniżeniu ciśnienia do 0,1 MPa (11). Morfologiczne różnice w wyglądzie bakterii sugerują zmiany na poziomie molekularnym i te głównie skupiają uwagę badaczy (4). Wydłużanie się komórek jest konsekwencją zaburzeń w cytoszkielecie. Pierwszym etapem w podziale komórek *E. coli* jest utworzenie pierścienia białka FtsZ. Ciśnienie 50 MPa powoduje inhibicję tego procesu, a to manifestuje się właśnie filamentowym wzrostem bakterii, który trwa jeszcze przez ok. 90 min po dekompresji (12). Filamentowy wzrost pod ciśnieniem nie jest zależny od białka SulA, inhibitora polimeryzacji FtsZ. *E. coli* pozbawiona proteazy Lon charakteryzowała się hiperfilamentowym wzrostem, podczas gdy podwójna mutacja *lon::sula*⁻ spowodowała inhibicję wzrostu (13). Mechanizm tego zjawiska nie został w pełni poznany. Konsekwencją zaburzeń w obrębie cytoszkieletu jest również ograniczenie transportu wewnątrzkomórkowego. Transport pomiędzy poszczególnymi organellami może być zaburzony wskutek destrukcyjnego wpływu ciśnienia na mikrotubule, a także inne elementy cytoszkieletu (14).

Uszkodzenie cytoszkieletu powoduje także wzrost płynności cytoplazmy, co jest bezpośrednim powodem „ucieczki” z komórki szeregu związków. W komórkach poddanych kompresji pod ciśnieniem 200 MPa z jednoczesnym gwałtownym obniżeniem temperatury i pH obserwowano obniżony poziom aminokwasów i kwasu pikolinowego w porównaniu z bakteriami poddanymi lizie z użyciem metody zamrażania-rozmrażania (ang. *freeze-thaw*). Zjawisku temu przeciwdziałało dodanie do roztworu diamin, które oddziałują z elementami cytoszkieletu poprzez wytwarzanie wiązań poprzecznych (15). Oprócz dystrybucji różnych związków wewnątrz komórki, cytoszkielec pełni także bardzo ważną funkcję w tworzeniu wrzeciona podziałowego, co umożliwia rozdział materiału genetycznego do potomnych komórek i wyznacza miejsce wytworzenia się przegrody wtórnej. Zaburzenie zatem funkcji cytoszkieletu powoduje zahamowanie podziału komórkowego (16).

Wspomniano, że podstawowe procesy życiowe komórki replikacja, transkrypcja i translacja ulegają całkowitemu zahamowaniu pod ciśnieniem 50, 77 i 67 MPa, odpowiednio (tab. 1), są to procesy złożone z trzech etapów inicjacji, elongacji i terminacji, w których uczestniczy wiele różnych białek, co powoduje, że nie na każdym etapie są tak samo wrażliwe. Najbardziej wrażliwe są etapy inicjacji i terminacji aniżeli etap elongacji łańcucha (1). Hodowla bakterii *E. coli* w 40 MPa skutkuje obniżeniem ilości DNA i wzrostem stężenia RNA, nie zmienia się natomiast całkowita ilość białka (1). Częściowym wyjaśnieniem tego zjawiska może być obserwowana już w 27 MPa inaktywacja gyrazy DNA (13). Na podstawie analizy *in vitro* wpływu HHP na polimerazę RNA u *E. coli* wykazano inhibicję etapu elongacji łańcucha w przeciwieństwie do *S. violacea* (barofile). Stwierdzono, że enzym ten u bakterii barofilnych tworzy kompleks z czynnikiem *s70*, dzięki czemu jest stabilny w podwyższonym ciśnieniu (14).

HHP powoduje również odwracalną inhibicję wiązania aminoacylo-tRNA do kompleksu rybosom-mRNA i transferu tRNA z miejsca A do P. Stabilność rybosomów pod ciśnieniem w warunkach *in vitro* zależy w znacznej mierze od stężenia jonów magnezowych, im wyższe, tym większa wrażliwość rybosomów na kompresję. Zależności tej nie potwierdzono w badaniach *in vivo* (19,20).

Poddanie bakterii *E. coli* W3110 krótkiemu szokowi ciśnieniowemu (kompresja-dekompresja ok. 30 s) nie wywołało żadnych zakłóceń w ich cyklu życiowym. Natomiast inkubacja tego szczepu pod ciśnieniem 54,6 MPa w czasie 400 min spowodowała prawie trzykrotne spowolnienie rozwoju bakterii ($A_{600} = 0,08$; $1,3 \cdot 10^7$ cfu/ml) (cfu- jednostka tworząca kolonię) w porównaniu z kulturą kontrolną hodowaną pod ciśnieniem atmosferycznym ($A_{600} = 0,3$; $4 \cdot 10^7$ cfu/ml) (21).

2.1.1. Synteza białek szoku ciśnieniowego

Poddanie *E. coli* szokowi ciśnieniowemu 54,6 MPa spowodowało spadek syntezy białek do ok. 13% ilości produkowanej w warunkach naturalnych (21). Za pomocą elektroforezy dwukierunkowej na żelu poliakrylamidowym zidentyfikowano 55 białek, których ekspresja indukowana jest przez HHP, określono je jako białka szoku ciśnieniowego (PIP, ang. *Pressure Induced Protein*). Synteza PIP była najbardziej efektywna po kompresji w 81,9 MPa. Szczególną uwagę zwrócono na trzy białka (16, 66 i 54 kDa), których ilość wzrastała wraz ze wzrostem ciśnienia. Białka o masach 66 kDa i 54 kDa zidentyfikowano jako białka szoku termicznego (HSP, ang. *Heat Shock Protein*). Pierwsze z nich okazało się białkiem opiekuńczym DnaK, a drugie GroEL. Oprócz HSP zidentyfikowano cztery białka szoku zimnego (CSP, ang. *Cold Shock Protein*) w szczególności CspA (21). Rola pozostałych białek PIP nadal jednak pozostaje nieznana. Ciśnienie jest jedynym jak dotąd czynnikiem powodującym indukację syntezy tylu białek szoku termicznego. Nie obserwowano inhibicji syntezy białek kontrolujących procesy transkrypcji i translacji, mimo zmniejszenia tempa wzrostu ko-

mórek. Indukcja syntezy białek HSP i CSP odbywa się na drodze aktywacji wszystkich rybosomów znajdujących się w komórce, przez wpływ na fosforylację lub aktywność ATPazową białka DnaK (21).

Białko GroEL wiąże się z błoną komórkową i powoduje wzrost jej uporządkowania i stabilności, co zapobiega penetracji wnętrza struktury przez wodę (22). Tym samym GroEL wpływa ochronnie na błony lipidowe i minimalizuje zmiany w strukturze pod wpływem HHP. Białka HSP i CSP pełnią rolę „opiekuńczą” przeciwdziałając denaturacji ciśnieniowej innych białek i tworzeniu agregatów, a po przywróceniu warunków fizjologicznych umożliwiają ich powtórne poprawne sfałdowanie. Wykazano również, że bakterie poddane wstępnie lekkiemu szokowi termicznemu charakteryzowały się znacznie większą odpornością na działanie ciśnienia (23). Duże znaczenie odgrywał także skład medium, w którym bakterie były poddawane kompresji. Gdy zawierało ono niewielką ilość składników odżywczych indukcja syntezy PIP była efektywniejsza (23).

Obok zwiększania poziomu ekspresji HSP, wzrost ciśnienia powoduje także indukcję czynnika σ^{32} . Czynnikiem ten rozpoznaje specyficzne sekwencje promotorowe genów, które nie są aktywne w warunkach fizjologicznych. Ich ekspresja następuje dopiero w momencie zaistnienia sytuacji stresowej. Należą do nich białka DnaK, Lon i ClpPX, ich zwiększoną syntezę obserwowano po ekspozycji bakterii na ciśnienie 150 MPa (23).

2.1.2. Indukcja odpowiedzi SOS

Odpowiedź SOS w komórkach bakteryjnych indukowana jest najczęściej przez promieniowanie ultrafioletowe lub działanie mitomycyny C, ale również przez wzrost ciśnienia (24,25). Ciśnienie w zakresie 0,1-100 MPa, powoduje szereg zaburzeń w cyklu życiowym bakterii prowadzących do jej inaktywacji, ale nie powoduje to rozerwania błony komórkowej. Uważa się, że głównym powodem śmierci komórki spowodowanej przez ciśnienie jest kumulacja uszkodzeń białek i błon komórkowych (26). W alternatywnym modelu opartym na porównaniu danych dla bakterii *Salmonella* zakłada się, że główną przyczyną śmierci jest zakłócenie równowagi metabolicznej efektem czego jest uwolnienie dużej ilości wolnych rodników tlenowych (27). Dowodem potwierdzającym słuszność tej hipotezy jest eksperyment, w którym wykorzystano alkaliczną fosfatazę (AP). W warunkach naturalnych aktywacji tego enzymu następuje wskutek utlenienia grup SH, które zachodzi w peryplazmie, do kąd białko to jest kierowane przez peptyd liderowy. AP pozbawiona tego peptydu pozostaje na terenie cytoplazmy. W komórkach poddanych działaniu HHP uległa jednak aktywacji, świadczy to o obecności tlenu w cytoplazmie, a zatem ciśnienie generuje tworzenie reaktywnych form tlenu (28). Ponadto mutanty posiadające uszkodzone geny *katE*, *katF*, *oxyR*, *sodAB* i *soxS* były znacznie bardziej wrażliwe na HHP aniżeli szczepy dzikie (29).

Początkowo uważano, że odpowiedź SOS komórki wywołana przez ciśnienie jest wynikiem denaturacji represora LexA. Okazało się jednak, że spowodowana jest ona nie denaturacją a wzrostem jego aktywności, jak również wzrostem aktywności RecA. Wzrost aktywności tych czynników prowadzi do indukcji cyklu litycznego profaga λ oraz profaga toksyny Shiga, co należy mieć na uwadze stosując HHP do sterylizacji produktów żywnościowych i farmaceutycznych (23,30).

W polu zainteresowania badaczy znalazły się także elementy łańcucha oddechowego. Większość z nich jest na stałe zakotwiczona w błonie mitochondrialnej. Wraz ze wzrostem ciśnienia w błonach rośnie udział frakcji nienasyconych kwasów tłuszczowych, tym samym modyfikacji ulegają oddziaływania błona mitochondrialna – elementy łańcucha oddechowego, co prowadzi do zaburzeń w jego pracy i upośledzenia w dostarczaniu energii. W celu dokładniejszego scharakteryzowania udziału łańcucha oddechowego w tolerancji niektórych bakterii na ciśnienie badano mutanty *E. coli* pozbawione genu *cydD*, którego produkt jest niezbędny w formowaniu prawidłowo działającego kompleksu cytochromów *bd*. Okazało się, że mutanty wykazywały większą wrażliwość na HHP aniżeli szczep rodzicielski (31).

2.1.3. Wpływ HHP na ekspresję genów *E. coli*

Analizując wpływ HHP na ekspresję genów wykorzystano promotory *lac* i *tac* operonu laktozowego (32). W tym celu do komórek bakteryjnych wprowadzono plazmid kodujący gen acylotransferazy chloramfenikolu (CAT) pod kontrolą promotora *lac*. Stransformowane bakterie poddano działaniu ciśnienia 30 MPa (33). Ekspresja CAT pod wpływem kompresji była średnio 80-90 razy wyższa, w porównaniu z poziomem uzyskanym w wyniku indukcji za pomocą IPTG w warunkach ciśnienia atmosferycznego (0,1 MPa), podczas gdy ekspresja genu β -galaktozydazy była jedynie 2,7-rza wyższa (32). Podobne wyniki otrzymano, gdy wspomniane geny umieszczono za promotorem *tac* (33). Indukcja ekspresji obu tych genów świadczy o wpływie HHP na represor LacI. W badaniach *in vitro* represora LacI wykazano, że pod wpływem ciśnienia aktywna forma tetrameryczna ulega dysocjacji do nieaktywnej formy dimerycznej (34).

Za pomocą techniki mikromacierzy zbadano zmiany w profilu ekspresji genów *E. coli* poddanych działaniu HHP. Badano frakcje bakterii w wykładniczej i stacjonarnej fazie wzrostu poddane kompresji w 30 i 50 MPa. Próbę odniesienia stanowiły kultury *E. coli* hodowane w 0,1 MPa (tab. 2) (35). W fazie wzrostu wykładniczego aktywnych było 469 i 313 genów w ciśnieniu 30 i 50 MPa, a w stacjonarnej 698 i 662 odpowiednio. W obu fazach aktywacji lub inhibicji ulegały różne klasy genów, odpowiedzialne za różne procesy wewnątrzkomórkowe (35).

Tabela 2

Liczba genów, których ekspresja ulega zmianie pod wpływem kompresji w różnych warunkach ciśnienia (35)

Kategoria genu ¹⁾	Liczba analizowanych genów	Wczesna faza wykładnicza				Późna faza wykładnicza			
		30 MPa		50 MPa		30 MPa		50 MPa	
		≥2	≤0,5	≥2	≤0,5	≥2	≤0,5	≥2	≤0,5
metabolizm aminokwasów	118	6	3	2	2	4	9	3	5
biosynteza kofaktorów, grup prostetycznych, nośników	125	6	2	6	1	14	2	14	1
błona komórkowa	188	6	14	4	12	25	7	22	6
procesy komórkowe	101	16	3	7	3	14	7	22	6
metabolizm cząsteczek łączących różne szlaki	148	15	13	7	13	16	13	8	14
metabolizm energii	347	30	64	10	44	38	24	22	39
metabolizm kwasów tłuszczowych i fosfolipidów	58	2	3	3	2	15	2	16	3
metabolizm nukleotydów	114	5	9	5	8	25	6	24	3
funkcje regulatorowe	103	4	6	6	5	8	12	7	9
replikacja	89	2	2	2	3	21	2	17	3
białka transportujące lub wiążące	356	41	28	16	30	25	25	23	32
translacja	143	2	7	2	3	79	2	77	4
transkrypcja	47	1	1	3	1	14	3	10	1
inne kategorie	228	15	12	15	8	23	20	23	19
hipotetyczne	1966	99	52	54	36	93	150	83	146
Ogółem	4131	250	219	142	171	414	284	365	297

¹⁾ klasyfikacja kategorii genów wg Riley M. i Laberdan B., (60).

≥2 liczba genów dla, których stosunek Cy5/Cy3 ≥ 2 (Cy5-geny aktywne w komórkach hodowanych w podwyższonym ciśnieniu, Cy3-geny aktywne w komórkach hodowanych pod ciśnieniem atmosferycznym).

≤0,5 liczba genów dla, których stosunek Cy5/Cy3 ≤ 0,5.

Wartości Cy5/Cy3 ≥ 2 i Cy5/Cy3 ≤ 0,5 traktowano jako zmiany istotne w eksperymencie oznaczające wzrost (*upregulation*) i zahamowanie (*downregulation*) aktywności genu.

Bakterie *E. coli* przystosowane są do życia w warunkach ciśnienia atmosferycznego, jednakże pewne szczepy wykazują większą odporność względem HHP. W badaniach prowadzonych na szczepie MG1655 pokazano, że bakterie te mogą nie tylko przeżyć, ale także mnożyć się w warunkach podwyższonego ciśnienia. W szczepie tym stwierdzono obecność trzech osobnych linii mutantów: LMM1010, LMM1020 i LMM1030, charakteryzujących się wyższym podstawowym poziomem białek Lon, DnaK, ClpPX, GroEL, GroES, GrpE, ClpB i HtpG w porównaniu ze szczepem rodzicielskim (36). Podobne wyniki otrzymano, gdy porównano ilość RpoH u mutantów i szczepu rodzicielskiego, przy czym linia LMM1030 wykazywała najwyższy poziom ekspresji genu *rpoH* kodującego czynnik σ^{32} . Należy jednak pamiętać, że produkt

tego genu podlega wielu potranskrypcyjnym mechanizmom kontroli i badanie tylko poziomu ekspresji może być mylące i nie odpowiadać bezpośrednio ilości końcowego produktu, czyli czynnika σ^{32} . Wykryto także wysoki poziom innych białek, których jak dotąd nie zidentyfikowano (37). Pomimo że mutanty odporne na HHP wykazują wyższy poziom ekspresji genów kodujących białka ściśle kojarzonych ze stresem cieplnym, nie wykazują one większej tolerancji na podwyższoną temperaturę (34). W przeciwieństwie do bakterii, krótki szok temperaturowy u drożdży *S. cerevisiae* powoduje wzrost ich tolerancji względem podwyższonego ciśnienia (38). Wynika stąd, że śmierć bakterii wskutek HHP spowodowana jest przez więcej niż jedno uszkodzenie.

W badaniach prowadzonych na *E. coli* O157:H7 odpornych na HHP wykazano, że szczepy te różnią się pomiędzy sobą poziomem ekspresji genów, a także stopniem tolerancji na wzrost ciśnienia (39). Różnice w przeżywalności bakterii obserwowano tylko w stacjonarnej fazie wzrostu, co prawdopodobnie wynika z odmiennego poziomu syntezy RpoS. Jest to jeden z czynników sigma, odpowiedzialnych za zmianę specyficzności polimerazy RNA. RpoS powoduje aktywację ponad trzydziestu genów, których zadaniem jest zapewnienie przeżycia komórkom bakteryjnym w fazie stacjonarnej znajdującym się w sytuacji stresowej (40).

2.2. Wpływ HHP na bakterie *B. subtilis*

Bakterie *B. subtilis* używane są na szeroką skalę w przemyśle z uwagi na szczególne zdolności do syntezy enzymów, antybiotyków czy środków owadobójczych. Stanowią także ciekawy materiał dla badaczy, z uwagi na zdolność wytwarzania form przetrwalnikowych (spor) w niesprzyjających dla rozwoju warunkach, np. przy ograniczonej dostępności substancji odżywczych. Wytwarzanie spor odbywa się pod ścisłą kontrolą genetyczną. Szczegółowe poznanie tego procesu przyczyni się do zoptymalizowania procedur zabezpieczania żywności przed zanieczyszczeniem bakteriami chorobotwórczymi i ich formami przetrwalnikowymi.

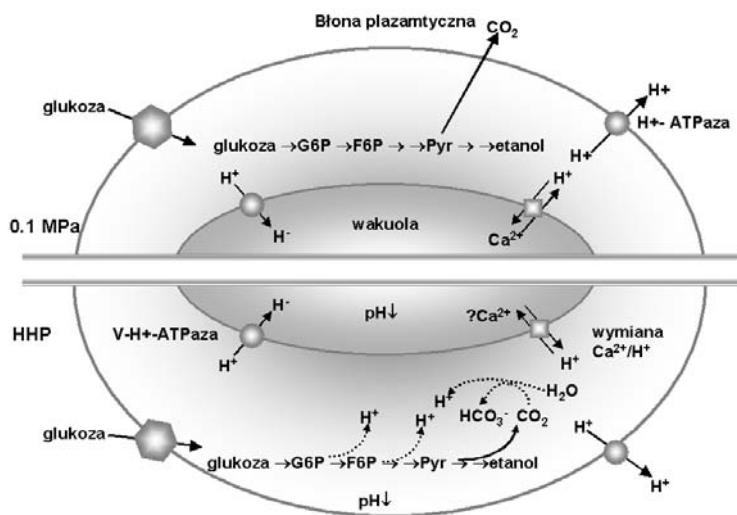
Spory *B. subtilis* są bardzo odporne na wiele czynników fizycznych i chemicznych. Poddanie ich działaniu temperatury 80°C przez 15 min czy napromieniowaniu UV jak również działaniu 0,4 M roztworu H₂O₂ nie ma wpływu na ich przeżywalność (41). Jednakże spory, które dojrzewały przez 0,5 h w 100-600 MPa w temperaturze 40°C wykazywały inną wrażliwość na wymienione czynniki w tym także na ciśnienie. Krytyczne dla przeżywalności okazało się 200 MPa powodujące maksymalną inaktywację, powyżej tej wartości odsetek żywych spor wzrasta i po osiągnięciu 400-600 MPa utrzymuje się na takim samym poziomie jak w 100 MPa. Jednakże spory wstępnie dojrzewające w 100 MPa były znacznie bardziej wrażliwe na podwyższenie ciśnienia do 600 MPa aniżeli dojrzewające w 500 MPa, co wskazuje na pojawienie się jakościowych różnic w komórkach w zależności od warunków eksperymentu. Obydwie grupy (100 i 600 MPa) były natomiast tak samo wrażliwe na temperaturę

i ginęły niemal natychmiastowo w 55°C. Obserwacja ta wskazuje na bardzo zbliżony stopień hydratacji obu grup komórek. Inna była jednak ich wrażliwość na H₂O₂ i UV, grupa dojrzewająca w 100 MPa była znacznie szybciej inaktywowana przez te czynniki aniżeli druga (41). Czynnikiem chroniącym DNA przed uszkodzeniami wywołanymi przez UV i H₂O₂ są małe rozpuszczalne w kwasach białka (SASPs, ang. *Small Acid Soluble Proteins*). W sporach kiełkujących w 100 MPa stwierdzono całkowitą degradację tej frakcji białek, podczas gdy w 600 MPa proces ten był opóźniony lub całkowicie zahamowany, co tłumaczy obserwacje eksperymentalne. Przyczyną tego zjawiska jest prawdopodobnie inaktywacja proteaz degradujących SASPs przez ciśnienie 600 MPa (41). Innym czynnikiem chroniącym spory przed promieniowaniem UV jest kwas dipikolinowy (DPA). Jego stężenie w środowisku zewnętrznym po dojrzewaniu spor w 100 i 600 MPa wynosiło 97,5 i 87,0% odpowiednio, co również tłumaczy różną odporność komórek względem UV. W obu grupach obserwowano również znaczącą różnicę w stężeniu ATP. Oznacza to, że dojrzewanie spor w 100 MPa przebiega w sposób podobny do tego pod ciśnieniem atmosferycznym, podczas gdy w 600 MPa inhibicji ulegają reakcje enzymatyczne co oznacza inaktywację krytycznych enzymów (41).

2.3. Wpływ HHP na drożdże *S. cerevisiae*

Ciśnienie rzędu 150 MPa powoduje szereg uszkodzeń błony komórkowej i białek drożdży, które w konsekwencji prowadzą do ich śmierci, jak w przypadku bakterii (42). Poddanie drożdży wcześniejszemu szokowi termicznemu powoduje wzrost ich odporności na ciśnienie, a dzieje się to za sprawą białka opiekuńczego Hsp104 i cukru trehalozy (43). HHP powoduje także znaczne zakwaszenie wakuoli przyczyną tego zjawiska jest dwutlenek węgla, którego produkcja wzrasta wskutek kompresji. Dwutlenek węgla dobrze rozpuszcza się w wodzie tworząc kwas węglowy, którego dysocjacja ($\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) jest procesem uprzywilejowanym z uwagi na dodatnią wartość ΔV . W konsekwencji produkowane są ogromne ilości protonów, które przedostają się do cytoplazmy (rys. 1) (44-46).

Wzrost kwasowości wakuoli w wyniku HHP powoduje również dysocjacja estrów fosforowych cukrów, znajdujących się w cytoplazmie. Ponieważ wiele procesów przebiegających w cytoplazmie jest wrażliwych na zmiany pH, komórka przeciwdziała jego obniżeniu kierując protony do wakuoli (46). Proces ten wymaga znacznych ilości ATP, którego synteza hamowana jest przez HHP. Brak odpowiedniej ilości ATP może być czynnikiem limitującym przeżywalność mikroorganizmów w warunkach wysokiego ciśnienia. Niektóre szczepy bakterii jak, np. *E. faecalis* i inne blisko spokrewnione z tym gatunkiem, odporne na podwyższone ciśnienie posiadają bardzo aktywne geny deaminazy argininy. Enzym ten bierze udział w syntezie amoniaku, można, zatem przypuszczać, że barotolerancja tych bakterii jest związana m.in. z efektywnie działającym mechanizmem neutralizacji protonów w cytoplazmie (46).

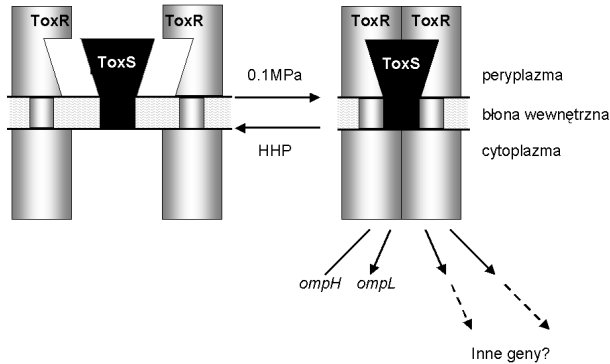


Rys. 1. Model przedstawiający mechanizm obniżenia pH w komórkach *S. cerevisiae*. HHP powoduje dysocjację H_2CO_3 lub estrów fosforanowych cukrów, co prowadzi do gromadzenia się H^+ w cytoplazmie. Aby utrzymać pH cytoplazmatyczne na fizjologicznym poziomie, protony kierowane są do wakuoli. Rysunek zmodyfikowano na podstawie (46).

3. Regulacja metabolizmu bakterii barofilnych

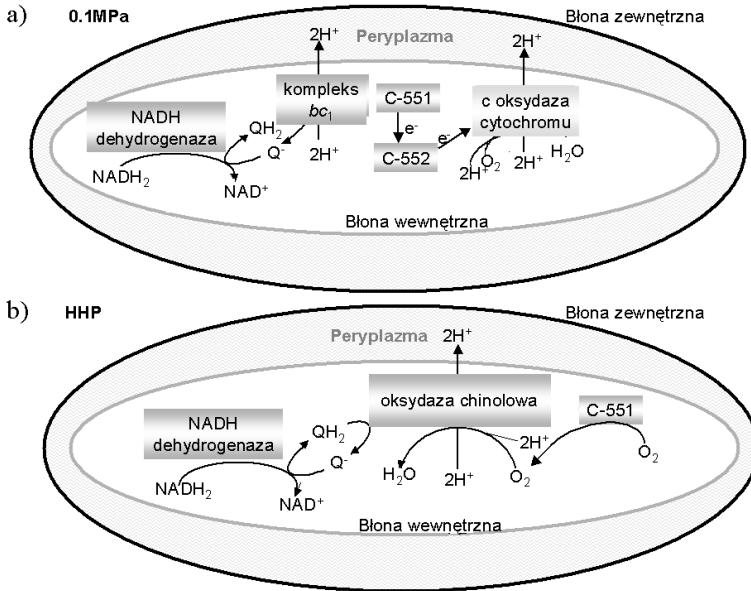
Barofile (dawniej określane mianem piezofilów) to grupa bakterii przystosowanych do życia w warunkach podwyższonego ciśnienia. Naturalnie zasiedlają dno morskie i są zdolne do przeżycia w ekstremalnych warunkach ciśnienia i temperatury. Ciekawą cechą barofilów jest szczególna wrażliwość na światło ultrafioletowe i promieniowanie gamma. Przyczyna tego zjawiska nie została w pełni wyjaśniona, jak dotąd nie potwierdzono, bowiem obecności bądź braku typowych dla innych grup bakterii enzymów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzonego DNA. Wiadomo natomiast, że błony lipidowe barofilów w dużej części składają się z frakcji nienasyconych kwasów tłuszczowych, które są wysoce wrażliwe na uszkodzenia spowodowane fotoperoksydacją (46). W miarę wzrostu tolerancji na podwyższone ciśnienie udział nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach bakterii wzrasta. Mutanty pozbawione zdolności do syntezy mononienasyconych kwasów tłuszczowych są wrażliwe na HHP (47). Poddanie barofilnej bakterii *Colwellia* MT41 szokowi ciśnieniowemu w 0,1 MPa spowodowało fragmentację jej błon komórkowych, co zaobserwowano za pomocą mikroskopu elektronowego (48).

Ciekawy sposób przystosowania się bakterii do życia w warunkach zwiększonego ciśnienia odkryto w *P. profundum*. W błonie zewnętrznej szczepu SS9 żyjącego w warunkach ciśnienia atmosferycznego znajduje się białko OmpL, przypominające



Rys. 2. Mechanizm działania białek ToxR i ToxS *P. profundum* SS9 w zależności od ciśnienia. Białka te kontrolują ekspresję wielu genów, włączając *ompH* i *ompL*. Produkty genów *ompH* i *ompL* funkcjonują jako kanały dla substancji pokarmowych; OmpH odpowiedzialny jest za pobieranie pokarmu na dużej głębokości (ubogie środowisko, podwyższone ciśnienie). W ciśnieniu atmosferycznym białka ToxR i ToxS są zasocjowane i aktywują *ompL*, a inhibują *ompH*. HHP powoduje dysocjację kompleksu białkowego, a tym samym zniesienie blokady genu *ompH*. Rysunek zmodyfikowano na podstawie (46).

w swojej budowie porynę. W miarę wzrostu ciśnienia białko to jest stopniowo zastępowane przez OmpH, charakteryzujące się większą średnicą wytwarzanego kanału (49). Ekspresja genów *ompH* i *ompL* charakteryzuje się przeciwstawną regulacją (50). Mutanty *ompL* nie są wrażliwe na dekompresję, podczas gdy mutanty *ompH* odwrotnie (51). Maksymalną ilość białka OmpH wykryto u SS9 hodowanych w optimum ciśnieniowym, 28 MPa, podczas gdy OmpL w maksymalnej ilości występowało w 0,1 MPa (50). Zarówno OmpH, jak i OmpL spełniają funkcję kanałów dla transportu związków odżywczych w środowiskach z ograniczonym zasobem substancji pokarmowych. Do syntezy tych białek niezbędna jest obecność ToxR i ToxS. Na podstawie analizy ilości ToxR metodą *western blot* wykazano, że jego ilość spada wraz ze wzrostem ciśnienia (50). Mutanty *toxR* nie wytwarzają OmpL, ale zachowują wysoki konstytutywny poziom syntezy OmpH bez względu na panujące ciśnienie. Sugeruje to tym samym, że ToxR jest wymagane do aktywacji *ompL* i represji *ompH* (46). Białka ToxR i ToxS po raz pierwszy zidentyfikowano w bakteriiach *V. cholerae*, w których zlokalizowane są w błonie wewnętrznej i stanowią czujniki środowiskowe dla temperatury, osmolarności, pH i substancji odżywczych (52). ToxR natomiast jest transbłonowym białkiem dimerycznym, którego aktywność zależy od procesu asocjacji podjednostek zależnego od ToxS (52). Podwyższone ciśnienie, podobnie jak niska temperatura, moduluje płynność błon biologicznych poprzez ściślejsze upakowanie łańcuchów bocznych kwasów tłuszczowych, co ogranicza ruchliwość makromolekuł i powoduje dysocjację białek multimerycznych do monomerów (53). Zatem HHP inhibuje proces tworzenia kompleksu ToxR i ToxS działając bezpośrednio na ich konformację albo zmieniając strukturę błony, w której są zakotwiczone (51). Pod ciśnieniem atmosferycznym białka ToxR i ToxS tworzą kompleks, który aktywuje gen *ompL*, a inhi-



Rys. 3. Model transportu elektronów w *S. benthica* DB172F. Cytochrom *c-551* jest obecny w obu przypadkach – normalnego (a) i wysokiego ciśnienia (b), podczas gdy *c-552* jest obecny tylko w pierwszym przypadku, a oksydaza chinolowa typu *cb* jest obecna tylko w warunkach wysokiego ciśnienia. Rysunek zmodyfikowano na podstawie (46).

buje *ompH*. HHP powoduje dysocjację tego kompleksu w następstwie czego następuje inhibicja ekspresji genu *ompL* i zniesienie represji genu *ompH* (rys. 2) (46).

Regulacja ekspresji genów i syntezy białek pod wpływem kompresji została szczegółowo zbadana u czterech szczepów barofilów: *S. benthica* DB6705 i DB172F, *S. violacea* DSS12, a także wspomnianego już *P. profundum* SS9 (46,54). Optimum wzrostu dla tych bakterii to odpowiednio 50, 70, 30 i 28 MPa. Ze szczepów *S. benthica* i *S. violacea* sklonowano promotory aktywowane przez wysokie ciśnienie. Poniżej tych promotorów zidentyfikowano dwie otwarte ramki odczytu (ORF1 i ORF2) działające jak operon oraz trzy regiony: A, B i C. Region A jest rozpoznawany przez czynnik sigma przypominający swoją budową σ^{54} . Nie udało się natomiast zidentyfikować czynników rozpoznających regiony B i C (55). Poniżej tych regionów znajduje się kolejny regulowany przez ciśnienie operon (ORF3). Najprawdopodobniej koduje on białko CydD (56). U *E. coli* obecność tego białka jest niezbędna dla prawidłowej asocjacji monomerów kompleksu cytochromu *bd* (57). Mutanty pozbawione genu *cydD* wykazywały wzmożoną wrażliwość na kompresję w porównaniu ze szczepem dzikim. Wprowadzenie plazmidu z genem *cydD* powodowało odtworzenie dzikiego fenotypu i tym samym umożliwiało wzrost pod zwiększonym ciśnieniem. Oznacza to, że prawidłowo działający łańcuch oddechowy jest czynnikiem niezbędnym w wytwarzaniu odporności na kompresję (58). Funkcje i dokładna regulacja ORF1 i ORF2 nie zostały jeszcze zbadane.

W komórkach barofilnej bakterii *S. benthica* w zależności od panującego ciśnienia stwierdzono obecność dwóch rodzajów cytochromu typu *c*, błonowy *c-551* i cytoplazmatyczny *c-552*, a także związanej z błoną oksydazy chinolowej typu *ccb* (59). Cytochrom *c-551* jest konstytutywnie syntetyzowany w podwyższonym ciśnieniu (0,1-60 MPa), podczas gdy *c-552* tylko w 0,1 MPa. Ilość oksydazy chinolowej typu *ccb* rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia i osiąga swoje maksimum w 60 MPa. Niski poziom aktywności oksydazy N,N,N',N'-tetrametylo-*p*-fenyldiaminy (TMPDH2) wskazuje na to, że bakterie poddane działaniu 60 MPa nie posiadają kompleksu *bc₁* i oksydazy cytochromu *c* (rys. 3) (46).

Oznacza to, że w warunkach ciśnienia atmosferycznego redukcja tlenu odbywa się poprzez oksydazę zależną od cytochromu *c*. Natomiast w podwyższonym ciśnieniu funkcję reduktora tlenu przejmuje oksydaza chinolowa, która jako substratu używa chinolu, tym samym łańcuch oddechowy u barofilnego szczepu DB172F zostaje skrócony (46).

4. Podsumowanie

Analiza metabolizmu bakterii mezofilnych i barofilnych pozwoliła na częściowe poznanie mechanizmów adaptacyjnych pozwalających bakteriom na przeżycie w ekstremalnych warunkach. W trakcie intensywnych badań mających na celu poznanie wpływu HHP na komórkę zidentyfikowano wiele procesów komórkowych, których zaburzenie prowadzi do zmiany metabolizmu bądź do śmierci komórki. Wiadomo, że HHP powoduje:

- a) denaturację białka,
- b) dysocjację kompleksów białkowych,
- c) zmiany konformacji kwasów nukleinowych,
- d) dehydratację makromolekuł,
- e) obniżenie pH wody,
- f) upłynnienie błon komórkowych,
- g) rozerwanie oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych.

Inaktywacja bakterii jest zatem procesem złożonym i zachodzi na skutek zaburzenia więcej niż jednego procesu wewnątrzkomórkowego.

Literatura

1. Bartlett D. H., (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, 1595, 367-381.
2. Meganathan R., Marquis R. E., (1973), *Nature*, 246, 526-527.
3. Landau J. V., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 149, 506-512.
4. Zobell C. E., Cobet A. B., (1964), *J. Bacteriol.*, 87, 710-719.
5. Yayanos A. A., Pollard E. C., (1969), *Biophys. J.*, 9, 1464-1482.
6. Pagan R., Mackey B., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2829-2834.
7. Hayashi R., (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, 1595, 397-399.

8. Knorr D., (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 485-491.
9. Knorr D., Heinz V., Buckow R., (2006), *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 619-631.
10. Grzesiowski P., Łętowska I., Porowski S., Sałański P., Jurczak J., Giel-Pietraszuk M., Hryniewicz W., Barciszewski J., (2002), in: *Defect and Diffusion Forum, 4th High Pressure School on Chemistry, Biology, Materials Science and Techniques*, Trans Tech Publications, Switzerland, 208-209, 67-72.
11. Huisman G. W., Siegele D. A., Zambrano M. M., Kolter R. R., (1996), in: *Escherichia coli and Salmonella*, Eds. F. C. Niedhardt, et al. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1672-1682.
12. Ishii A., Sato T., Wachi M., Nagai K., Kato C., (2004), *Microbiology*, 150, 1965-1972.
13. Aertsen A., Michiels C. W., (2005), *Res. Microbiol.*, 156, 233-237.
14. Crenshaw H. C., Salmon E. D., (1996), *Exp. Cell Res.*, 227, 277-284.
15. Yamaguschi T., Kawamura H., Kimoto E., Tanaka M., (1989), *J. Biochem.*, 106, 1080-1085.
16. Yamaguschi T., Murata Y., Kobayashi Y., Kimoto E., (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, 1195, 205-210.
17. Chilukuri L. N., Fortes P. A., Bartlett D. H., (1997), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 552-556.
18. Kawano H., Nakasone K., Matsumoto M., Yoshida Y., Usami R., Kato C., Abe F., (2004), *Extremophiles*, 8, 367-375.
19. Baierlein R., Infante A. A., (1974), *Methods Enzymol.*, 30, 328-345.
20. Gross M., Lehle K., Jaenicke R., Nierhaus K. H., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 218, 463-468.
21. Welch T. J., Farewell A., Neidhardt F. C., Bartlett D. H., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 7170-7177.
22. Mentre P., Bon Hoa G. H., (2001), *Int. Rev. Cytol.*, 201, 1-84.
23. Aertsen A., Vanoirbeek K., de Spiegeleer P., Sermon J., Hauben K., Farewell A., Nystrom T., Michiels C. W., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2660-2666.
24. Kuzminov A., (1999), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 751-813.
25. Little J. W., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 4943-4950.
26. Wuytack E. Y., Phuong L. D., Aertsen A., Reyns K. M., Marquenie D., de Ketelaere B., Masschalck B., van Opstal I., Diels A. M., Michiels C. W., (2003), *J. Food Prot.*, 66, 31-37.
27. Aldsworth T. G., Sharman R. L., Dodd C. E., (1999), *Cell. Mol. Life Sci.*, 56, 378-383.
28. Aertsen A., de Spiegeleer P., Vanoirbeek K., Lavilla M., Michiels C. W., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2226-2231.
29. Robey M., Benito A., Hutson R. H., Pascual C., Park S. E., Mackey B. M., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4901-4907.
30. Aertsen A., FASTER D., Michiels C. W., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1155-1162.
31. Nakasone K., Ikegami A., Kato C., Usami R., Horikoshi K., (1998), *Extremophiles*, 2, 149-154.
32. Bartlett D. H., Kato C., Horikoshi K., (1995), *Res. Microbiol.*, 146, 697-706.
33. Kato C., Sato T., Smorawinska M., Horikoshi K., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 122, 91-96.
34. Royer C. A., Chakerian A. E., Marrhews K. S., (1990), *Biochemistry*, 29, 4959-4966.
35. Ishii A., Oshima T., Sato T., Nakasone K., Mori H., Kato C., (2005), *Extremophiles*, 9, 65-73.
36. Hauben K. J., Bartlett D. H., Soontjens C. C., Cornelis K., Wuytack E. Y., Michiels C. W., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 945-950.
37. Aertsen A., de Spiegeleer P., Vanoirbeek K., Lavilla M., Michiels C. W., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2226-2231.
38. Iwahashi H., Kaul S. C., Obuchi K., Komatsu Y., (1991), *FEMS Microbiol. Lett.*, 64, 325-328.
39. Robey M., Benito A., Hutson R. H., Pascual C., Park S. F., Mackey B. M., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4901-4907.
40. Hengge-Aronis R., (1996), *Mol. Microbiol.*, 21, 887-893.
41. Wuytack E. Y., Boven S., Michiels C. W., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3220-3224.
42. Kobori H., Sato M., Tameike A., Hamada K., Shimada S., Osumi M., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 132, 253-258.
43. Iwahashi H., Obuchi K., Fujii S., Komatsu Y., (1997), *FEBS Lett.*, 416, 1-5.
44. Abe F., Horikoshi K., (1997), *Extremophiles*, 1, 89-93.
45. van Eldik R., Asano T., le Noble W. J., (1989), *Chem. Rev.*, 89, 549-688.
46. Abe F., Kato C., Horikoshi K., (1999), *Trends in Microbiol.*, 7, 447-453.
47. Allen E. E., Facciotti D., Bartlett D. H., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1710-1720.

48. Chastain R. A., Yayanos A. A., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1489-1497.
49. Chi E., Bartlett D. H., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 7533-7540.
50. Welch T. J., Bartlett D. H., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 5027-5031.
51. Welch T. J., Bartlett D. H., (1998), *Mol. Microbiol.*, 27, 977-985.
52. Skorupski K., Taylor R. K., (1997), *Mol. Microbiol.*, 25, 1003-1009.
53. Macdonald A. G., (1987), in: *Current Perspectives in High Pressure Biology*, Eds. Marquis R. E., Zimmerman A. M., Jannasch H. W., Academic Press, 207-223.
54. Bartlett D. H., Wright M., Yayanos A. A., Silverman M., (1989), *Nature*, 342, 572-574.
55. Nakasone K., Ikegami A., Kato C., Usami R., Horikoshi K., (1999), *FEMS Microbiol. Lett.*, 176, 351-356.
56. Kato C., Tamegai H., Ikegami A., Usami R., Horikoshi K., (1996), *J. Biochem.*, 120, 301-305.
57. Poole R. K., Gibson F., Wu G., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 117, 217-224.
58. Kato C., Ikegami A., Smorawinska M., Usami R., Horikoshi K., (1997), *J. Mar. Biotechnol.*, 5, 210-218.
59. Qureshi M. H., Kato C., Horikoshi K., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 161, 301-309.
60. Riley M., Labedan B., (1996), *Escherichia coli gene products: physiological functions and common ancestries*, in: Neidhardt F. C., Curtiss R., Gross C., Ingraham J. L., Lin E. C. C., Low K. B., et al., *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, American Society for Microbiology Press, Washington, 2118-2202.