

И.А.Баснакъян

СТРЕСС
У БАКТЕРИЙ



Москва
"Медицина"
2003

УДК 579.22

ББК 51.9

Б27

Р е ц е н з е н т — АНАТОЛИЙ АНДРЕЕВИЧ ВОРОБЬЕВ,
зав.кафедрой микробиологии с вирусологией
и иммунологией ММА им.И.М.Сеченова, академик РАМН

Баснакьян И.А.

Б27 Стресс у бактерий.—М.: Медицина, 2003.— 136 с.: ил.
ISBN 5-225-04368-2

В монографии обобщены данные литературы и результаты собственных исследований автора, посвященные новому нетрадиционному направлению в микробиологии — стрессу у бактерий. Систематизированы разрозненные сведения о белках теплового шока, холодовом шоке, голодании бактерий как стрессе, обусловленном лимитом субстрата, об оксидативном стрессе, взаимосвязи стресса и вирулентности у бактерий и об общих стрессорных белках. Даны конкретные примеры применения новых знаний о стрессе у бактерий для анализа результатов прикладных микробиотехнологических исследований *Salmonella typhi*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis* и других бактерий, используемых в разработках вакцин и иммунодиагностических препаратов.

Для биологов, вакцинологов, микробиологов, иммунологов, биохимиков.

ББК 51.9

Basnakyan I.A.

Stress in Bacteria. — M.:Meditrina, 2003.
ISBN 5-225-04368-2

The book gives a review of literature and results of original investigations in a novel line of microbiology — stress in bacteria; classifies separate information on proteins of heat shock, cold shock, fasting of bacteria as stress caused by substrate limit, oxidative stress, stress and virulence relations in bacteria, general stress proteins. How to apply new knowledge about stress in bacteria for analysis of the results of microbiotechnological studies of *Salmonella typhi*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis* and other bacteria used for design of vaccines and immunodiagnostic agents is shown.

Intended for biologists, vaccine designers, microbiologists, immunologists, biochemists.

ISBN 5-225-04368-2

© И.А.Баснакьян, 2003

Все права автора защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Оглавление

Введение	9
--------------------	---

Часть I ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ

Глава 1. Белки теплового шока у бактерий	15
1.1. Белки теплового шока, синтезируемые под воздействием других стрессоров	17
1.2. Роль белков теплового шока в бактериальной клетке	18
1.3. Механизм защиты от стрессорных воздействий.	20
Глава 2. Холодовой шок у бактерий	24
2.1. Холодовой шок у <i>E.coli</i>	25
2.2. Холодовой шок у <i>B.subtilis</i>	27
2.3. Холодовой шок у психрофильных бактерий <i>P.fragi</i>	27
2.4. Экспрессия генов холодового шока у <i>S.typhimurium</i>	28
2.5. Сравнение реакций на снижение температуры у разных бактерий	28
Глава 3. Голодание бактерий — стресс, обусловленный лимитом субстрата	30
3.1. Лимит субстрата и состояние стресса у бактерий	30
3.2. Критерии оценки процесса голодания бактерий	31
3.3. Новые данные о голодании бактерий	32
Глава 4. Оксидативный стресс у бактерий	36
4.1. Оксидативный стресс у <i>S.typhimurium</i> и <i>E.coli</i>	36
4.2. Ответ на оксидативный стрессор у патогенных и непатогенных микобактерий	39
4.3. Оксидативный стресс у анаэробов <i>B.fragilis</i>	39
Глава 5. Кислотный стресс у бактерий	42
5.1. Кислотный стресс у эшерихий	42
5.2. Участие внеклеточных компонентов в ответе на кислотный стрессор	44
5.3. Кислотный стресс у сальмонелл	47
5.4. Кислотный стресс у листерий	50
5.5. Кислотный стресс у вибрионов	52
5.6. Кислотный стресс у стрептококков и стафилококков	53
5.7. Кислотный стресс у молочнокислых бактерий	55
5.8. Кислотный стресс у других бактерий	56
Глава 6. Стресс у бактерий и вирулентность	59
6.1. Стресс у сальмонелл и вирулентность	59
6.2. Стресс у нейссерий и вирулентность	62

6 3	Стресс у листерий и вирулентность	63
6 4	Стресс у франсиселл и вирулентность	64
6 5	Стресс у иерсиний и вирулентность	65
Глава 7 Общие стрессорные белки		66
7 1	Общие стрессорные белки у бактерий	67
7 2	Бактериальные стрессорные белки, подобные антигенам человека	69
Часть II ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ		
Глава 8 Критерий синхронизации деления клеток для оценки стрессорного воздействия на популяцию <i>S.typhi</i>		72
8 1	Объекты, методы и результаты исследования	73
8 2	Обсуждение	77
Глава 9 Сравнение выхода Vi- и O-антителов в процессе адаптации штаммов <i>S.typhi</i> к стрессорным условиям голодаания		79
9 1	Объекты, методы и результаты исследования	80
9 2	Обсуждение	85
Глава 10 Влияние ионов металлов на продукцию пенициллин-ацилазы культурой <i>E.coli</i> штамма NAT-99 50R		86
10 1	Объекты, методы и результаты исследований	87
10 2	Обсуждение	90
Глава 11 Влияние стрессоров на белки наружной мембранны <i>N.meningitidis</i> серогруппы В в процессе периодического культивирования в биореакторе		91
11 1	Объекты, методы и результаты исследования	92
11 2	Обсуждение	101
Глава 12 Влияние метилированного циклодекстрина на накопление коклюшного токсина в культуре <i>B.pertussis</i> в биореакторе		103
12 1	Объекты, методы и результаты исследований	104
12 2	Обсуждение	108
Заключение		109
Список литературы		114

Условные обозначения

БТШ Hsp _s DnaK DnaJ GroE GroEL Csp _s CspA CspB↔CspF Hsc66 HscA HscB cspB uspA	} белки теплового шока белки теплового шока <i>Escherichia coli</i>
Dps/dps	
htrA, purD	— ген холодового шока <i>Salmonella typhimurium</i> — ген, кодирующий синтез универсального стрессорного белка <i>Escherichia coli</i> , т.e. 15,8 кД цитоплазматического белка, связанного с фазой роста, индукция которого происходит, когда рост ингибиран
spvR-ген spvABCD оперон mviA	— белок/ген, обеспечивающие защиту <i>Escherichia coli</i> от кислотного и оксидативного стрессоров — гены выживания бактерий внутри макрофага <i>nagA, fliD, ims</i>
MviA	плазмидные гены вирулентности <i>Salmonella typhimurium</i> , индуцируются в процессе С-, Р- и N-голодания при лимите железа и низком pH
σ ^S (σ ³⁸)-регулон	— локус вирулентности <i>Salmonella typhimurium</i> для мышей — белок 38кД определяет связь вирулентности со скоростью роста бактерий <i>in vivo</i> — индуцируется в стационарной фазе [кодируется гроS-геном (<i>katF</i>)], регулирует транскрипцию многих генов стационарной фазы, регулирует вирулентность <i>Salmonella typhimurium</i> для мышей
Asp _s OmpC OmpF OmpR PhoPQ	— кислотно-шоковые белки <i>Salmonella typhimurium</i> порины внешней мембраны <i>Salmonella typhimurium</i>
stiA	— система, обеспечивающая индукцию кислотного стресса, зависимого от низкого pH, у <i>Salmonella typhimurium</i> — локус, зависимый от гроS, кодирует нитратредуктазу <i>Salmonella typhimurium</i>

gadA	}	гены, участвующие в ответе на мягкий кислотный стрессор
gadB		белки холодового шока <i>Bacillus subtilis</i>
gadC		
Csp _s		
Cip _s		
CspB		
Gsp _s		
SigB		<ul style="list-style-type: none"> — главные стрессорные белки <i>Bacillus subtilis</i>, относятся к σ^b-зависимому регулятору стационарной фазы — оперон кодирует множество генов стационарной фазы, сам регулируется с помощью σ^b-зависимого промотера, σ^b инактивируется в экспоненциальной фазе (Сигма В), (σ^b)
Csp _s		
CapA	}	белки холодовой акклиматизации <i>Pseudomonas fragi</i>
CapB		
TapA		белки холодового шока <i>Escherichia coli</i>
TapB		
Gsp63		
prfA		<ul style="list-style-type: none"> — стрессорный белок <i>Neisseria gonorrhoeae</i> — регулятор транскрипции генов вирулентности <i>Listeria monocytogenes</i> в условиях действия стрессора — ген <i>Yersinia enterolitica</i>, кодирующий синтез HtrA белка, который имеет функцию ответа на стрессоры
htrA		
Usp _s		<ul style="list-style-type: none"> — универсальные белки теплового шока <i>Staphylococcus aureus</i> — common protein-mouse пептиды БТШ бактериального происхождения, подобные БТШ клеток хозяина — common protein-human
Hsp60 (CP1 m.)		
Hsp60 (CP1 h.)		
Hsp60 (CP1 e.c.)		
Hsp60 (CP1 m.t.)		
Hsp90		<ul style="list-style-type: none"> — стрессорный белок <i>Porphyromonas gingivalis</i>, перекрестно реагирующий с Hsp90 человека — белок/ген, обеспечивающие защиту <i>Vibrio cholerae</i> от кислотного стрессора
CadA/cadA		
Sec		<ul style="list-style-type: none"> — секретируемый белок — рецепторный белок
CRP-ЦАМФ		<ul style="list-style-type: none"> — альтернативный сигма-фактор — редокс-чувствительный транскрипционный регулятор-активатор
RpoS		
OxyR		
Д, кД		
мМ, мкМ		<ul style="list-style-type: none"> — дальтон, килодальтон — миллимоль, микромоль — электрофорез
ЭФ		
ПААГ		
DDS-Na		<ul style="list-style-type: none"> — полиакриламидный гель — додецилсульфат натрия
ИС		<ul style="list-style-type: none"> — индекс синхронизации
КС		<ul style="list-style-type: none"> — критерий синхронизации
мРНК		<ul style="list-style-type: none"> — матричная РНК
УФ		<ul style="list-style-type: none"> — ультрафиолетовый

ИК	— инфракрасный
АТФ	— аденоинтрифосфат
ЯРМ	— ядерно-магнитный резонанс
РНК	— рибонуклеиновая кислота
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
СОД	— супероксиддисмутаза
РФК	— реактивная форма кислорода
МОЕ	— Международная оптическая единица
ОСО	— отраслевой стандартный образец
СТА	— серотиповые антигены
АК	— антигенный комплекс
ЛПС	— липополисахарид
МПА	— мясопептонный агар
КУК	— кукурузный экстракт
ФУК	— фенилуксусная кислота
ФЭК-Н-56	— фотоэлектроколориметр-нефелометр
РТПГА	— реакция торможения пассивной гемагглютинации
SPV	— <i>Salmonella plasmid virulens gen</i>
inv	— инвазия
МПБ	— мясопептонный бульон
βЦД	— метилированный β-циклодекстрин
мол.м.	— молекулярная масса
ВИЭФ	— встречный иммуноэлектрофорез
ИФА	— иммуноферментный анализ

Список бактерий, на которых изучается стресс¹

<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>S.typhimurium</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B.subtilis</i>
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>P.fragi</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N.gonorrhoeae</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L.monocytogenes</i>
<i>Yersinia enterolitica</i>	<i>Y.enterolitica</i>
<i>Staphilococcus aureus</i>	<i>S.aureus</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M.tuberculosis</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>P.gingivalis</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>S.typhi</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>B.pertussis</i>
<i>Coxiella burnetti</i>	<i>C.burnetti</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>L.pneumophila</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>V.vulnificus</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>C.botulinum</i>
<i>Arthrobacter globiformus</i>	<i>A.globiformus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>B.cereus</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>C.perfringens</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>P.putida</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>R.leguminosarum</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L.lactis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>S.thermophilus</i>
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>M.smegmatis</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>M.avium</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B.fragilis</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N.meningitidis</i>
<i>Francicella tularensis</i>	<i>F.tularensis</i>
<i>Cyanobacterial strains</i>	<i>C.strains</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V.cholerae</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>S.mutans</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>P.freudenreichii</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L.acidophilus</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>L.collinoides</i>
<i>Rhodococcus eque</i>	<i>R.eque</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>R.tropici</i>
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	

¹ Бактерии представлены по мере встречаемости.

Введение

Среда действует на организм посредством раздражителей: нормальных и чрезвычайных — экстремальных [16]. Нормальные, или физиологические, раздражители — это такие воздействия среды, к которым организм приспособлен в ходе своего филогенетического развития. Эти раздражители могут изменяться, приобретая характер экстремальных, и вызывать у организмов чрезвычайное напряжение адаптационных механизмов — стресс. Понятие “чрезвычайные раздражители” (стрессоры) является относительным. Один и тот же раздражитель может быть чрезвычайным для одних организмов и обычным, физиологическим — для других, что определяется силой (дозой) воздействия, генетической детерминированностью и фенотипическими особенностями организма.

Понятием “стресс” определяют общий комплекс неспецифических компенсаторно-приспособительных процессов, развивающихся у организмов в ответ на воздействие чрезвычайных раздражителей — стрессоров. Неспецифичность выражается в однотипности ответных реакций на действие различных факторов.

В медицине под термином “стресс” Г.Г.Б.Селье понимает все неспецифические проявления, свойственные необычному состоянию организма, возникающему вследствие влияния чрезвычайных раздражителей — стрессоров [16]. Стресс свойствен не только макро-, но и микроорганизмам.

В литературе по микробиологии под термином “стресс” чаще подразумевают изменения параметров культивирования, которые вызывают ответные реакции со стороны микроорганизма [42, 225]. Однако считается более правомерным придерживаться определения Г.Г.Б.Селье. Иными словами, под термином “стресс” следует понимать реакцию микроорганизма на действие стрессора.

В последние годы возрастает количество публикаций, в которых приведены результаты изучения реакции микроорганизмов на различные стрессорные воздействия [1, 7, 8, 10, 11]. Значительная часть этих исследований направлена на изучение так называемого “starvation stress”, вызванного влиянием лимита различных факторов питания на жизнедеятельность микроорганизмов. Однако при этом авторы не делают ссылок на целый пласт работ 80-х годов, посвященных изучению лими-

тирования и ингибирования роста микроорганизмов [30, 31, 33, 42], и не находят связи между исследованиями тех лет и современными представлениями о голодании как о состоянии стресса у бактерий.

Есть и другие средовые раздражители, способные вызывать состояние стресса у бактерий. Среди них наиболее известны физические (температурные, радиационные и т.п.), физико-химические (pH , pO_2 , pCO_2), биологические (бактериофаги, бактериальные токсины и т.п.).

Микроорганизмы в природе редко находятся в оптимальных условиях, чаще всего жизнь микробов протекает при несбалансированности элементов питания и при неблагоприятных физико-химических условиях: сухость, недостаток или избыток кислорода, отдельных элементов питания, повышение или понижение температуры, УФ-облучение, неоптимальное значение pH и т.д., которые для микроорганизмов могут явиться стрессорами. Сочетание оптимальных условий роста микробов создают в лабораторных условиях при непрерывном их выращивании в биореакторе. При периодическом выращивании в разных фазах роста на микроорганизмы действуют разные виды стрессоров. Так, в лаг-фазе клетки находятся под влиянием метаболического стрессора в результате их пересева из истощенной среды в среду более богатую. В экспоненциальной фазе в отсутствие лимитирования или ингибирования роста [41, 42] клетки не испытывают стрессорного воздействия, находятся в физиологически активном состоянии.

В фазе замедления скорости роста уменьшается процент насыщения среды кислородом, уровень pH или повышается, или понижается, истощается питательная среда, накапливаются метаболиты, т.е. клетки вновь находятся под влиянием стрессоров, таких как недостаток субстрата, избыток продуктов метabolизма или изменение физико-химических показателей pH , pO_2 , pCO_2 и т.д.

В максимальной стационарной фазе, когда рост прекращается, действие указанных выше видов стрессоров на клетки усугубляется. В фазе отмирания происходит гибель клеток. По мнению И.Л.Работновой [41, 42], стресс выражается прежде всего в замедлении роста популяции, а синтез полимеров клеточной стенки при этом даже усиливается. В настоящее время в этом направлении изучают изменения в липидном составе мембран, синтез протекторных соединений (углеводов, аминокислот и др.), образование ростингибирующих соединений и специальных белков [46, 47, 48]. Авторы обращают внимание на то, что действие неблагоприятных факторов на микробные клетки приводит к синтезу большого количества перечисленных выше соединений [43]. Наиболее известными из них яв-

ляются так называемые белки теплового шока (БТШ), появляющиеся под воздействием повышенной температуры.

Интерес к БТШ, равно как к проблеме адаптации к стрессору в целом, сегодня велик, поскольку в этой области эффективно решаются вопросы регуляции генной активности, биосинтеза белка и многие другие [49]. БТШ у патогенных микроорганизмов могут действовать как факторы вирулентности, они выполняют роль шаперонов, блокируют образование третичной и четвертичной структуры вновь синтезируемых белков и обеспечивают их транспорт через мембрану.

Кислый pH это один из стрессоров, наиболее часто встречающихся в микробных системах. Способность выживать в условиях измененного pH очень важна для сохранения вида. Попадая в кислую среду, бактерии вырабатывают стратегию выживания, у них развивается состояние кислотного стресса. Поскольку наиболее заметным звеном в цепи событий, развивающихся в ответ на кислый pH, является состояние толерантности к кислоте, кислотный стресс чаще называют acid tolerance respons (ATR). Однако это комплексный феномен, включающий многочисленные изменения в экспрессии различных белков и многие события на уровне генной регуляции: хромосомные локусы, ответственные за чувствительность и устойчивость к стрессорам, вирулентность и др.

Способность энтеропатогенных бактерий адаптироваться и выживать в условиях действия кислотного стрессора является основой их патогенности. Попадая в организм хозяина, эти бактерии вынуждены преодолевать воздействия многих стрессоров на своем пути к месту инфекции. Они подвергаются действию угрожающей их жизни неорганической кислоты в желудке и комбинированному влиянию неорганической и органической кислот в кишечнике. Кроме этого кислотного барьера они преодолевают физический барьер эпителиальных клеток и барьеры иммунной системы, включающей макрофаги. В борьбе с этими стрессорами бактерии вырабатывают как конститутивные, так и индуцируемые механизмы защиты.

Новые знания о кислотном стрессе у бактерий важны для понимания их взаимодействия с организмом хозяина. Это касается не только патогенных бактерий, но и бактерий-пробиотиков, необходимых для разработки лечебных препаратов. Изложенное свидетельствует о целесообразности анализа исследований последних лет, посвященных кислотному стрессу у бактерий.

Обычные популяции микроорганизмов состоят из асинхронно делящихся микробных клеток на разных стадиях развития, т.е. между двумя делениями. Данные, полученные при использовании таких популяций, являются усредненными, не

отражающими ни свойств отдельной микробной клетки, ни структуру популяции в отношении хотя бы разбросов по продолжительности генерации отдельных групп клеток. При этом воздействие на изолированную единичную клетку практически невозможно, поэтому важно иметь синхронно делящиеся культуры, для которых характерно то, что основная масса клеток делится почти одновременно [10]. В этом случае можно выделить такие показатели, как время деления клеток популяции и продолжительность клеточного цикла (генерации).

Синхронность деления клеток является одним из проявлений стрессорного (шокового) воздействия на микробную популяцию. По степени синхронности можно было бы оценивать степень этого воздействия. В настоящее время как количественный критерий синхронности деления клеток популяции используют индекс синхронизации (ИС).

Расчет ИС сопряжен с определенными трудностями, в первую очередь связанными с необходимостью проводить частые замеры в течение длительного времени для точного определения момента начала и конца деления популяции. Отмеченные затруднения требуют разработки статистического критерия синхронности деления клеток и методов его расчета на ЭВМ на основании экспериментальных данных, полученных при различных стрессорных (шоковых) воздействиях на популяции микроорганизмов.

Ионы металлов в определенных концентрациях могут являться стрессорами. Добавление ионов металлов в среду культивирования индуцирует у микроорганизмов механизмы защиты от их токсического действия. В зависимости от концентрации ионов металлов у микроорганизмов бывают задействованы или иные адаптационные механизмы. Микроорганизмы отличаются степенью устойчивости или чувствительности к различным металлам, что может быть генетически детерминировано.

Представляется, что в результате взаимодействия микроорганизмов с ионами металлов возможен синтез протекторов, в качестве которых выступают и иммунологически значимые полимеры. Прямых указаний в литературе на такие аспекты взаимодействия ионов металлов с микроорганизмами не встречается. Однако подобные исследования считаются весьма перспективными.

Еще на ранних этапах изучения закономерностей роста коклюшных бактерий и поиска оптимальных компоновок питательных сред было обнаружено, что одним из сильных ингибиторов роста являются ненасыщенные жирные кислоты. При этом оказалось, что ряд веществ, в том числе альбумин сыворотки, уголь, крахмал и некоторые производные декстри-

нов, способны в значительной степени снижать это ингибирующее действие. Из данных литературы известно, что производные декстринов стимулируют рост коклюшных бактерий, блокируя ингибирующее влияние ненасыщенных жирных кислот.

В последние годы японские исследователи установили, что использование 2-6-0-диметил- β -циклодекстрина оказывает стимулирующее действие и на продукцию экзотоксинов коклюшного микробы.

Весьма целесообразно изучить, как влияет метилированный циклодекстрин и на рост бактерий, и на накопление коклюшного токсина параллельно в одних и тех же процессах глубинного культивирования, чтобы определить, не является ли он стрессором, а коклюшный токсин — протектором. Однако результаты таких исследований в литературе пока не встречались.

Изложенное свидетельствует о том, что в последнее время ученые стали обращать внимание на состояние стресса у микроорганизмов. Есть исследования, посвященные реакции бактерий на разные виды стрессорных воздействий, но следует отметить недостаточность сведений о стрессе у микроорганизмов, имеющих значение в медицине, и, в частности, у вакцинных штаммов.

Кроме того, для изучения стресса у бактерий редко используются процессы управляемого культивирования в синтетических питательных средах в биореакторах, что весьма необходимо для создания условий управляемого стресса.

Такие исследования могли бы иметь значение не только для углубления знаний о биологии бактериальной клетки, но и быть полезными в практическом отношении — в биотехнологии медицинских иммунобиологических препаратов. В этом направлении весьма перспективно изучение изменений в клетках микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний с точки зрения синтеза иммунологически важных антигенов в ответ на стрессорное воздействие.

Практический интерес к стрессу у патогенных бактерий определяется, например, тем, что стрессорные белки могут рассматриваться как кандидаты вакцин нового поколения.

Учитывая изложенное, считаем необходимым обобщить в книге данные литературы и результаты собственных исследований, посвященные новому направлению в микробиологии — стрессу у бактерий, систематизировать разрозненные сведения о белках теплового шока, холодовом шоке, голодании бактерий как стрессе, обусловленном лимитом субстрата, об оксидативном и кислотном стрессах, взаимосвязи стресса и вирулентности у бактерий и об общих стрессорных белках, а также дать

конкретные примеры для понимания результатов прикладных микробиотехнологических исследований *S.typhi*, *E.coli*, *B.pertussis* и других бактерий, используемых в разработках вакцин и иммунодиагностических препаратов.

* * *

Автор благодарит своих учеников, соисполнителей тем научно-исследовательских работ и соавторов статей, материалы которых были использованы при написании книги. Особую признательность автор выражает **Тамаре Алексеевне Артемьевой, Валентине Андреевне Мельниковой и Нине Николаевне Алексахиной.**

Часть I

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ

Под воздействием различных неблагоприятных факторов в популяциях микроорганизмов происходят изменения, приводящие к состоянию стресса [8, 9, 32, 40, 41, 42]. Культуры в таких состояниях характеризуются изменениями энергетического и конструктивного метаболизма, экономических и метаболических коэффициентов, значительными морфологическими изменениями, а также синтезом дополнительных веществ, играющих роль протекторов [31, 33, 34, 39].

Есть сведения о биохимической адаптации грибов к температурному стрессору и о синтезе у них стрессорных белков под воздействием неблагоприятных факторов [48]. Однако не систематизированы данные о состояниях стресса у бактерий, что необходимо в фундаментальных исследованиях для углубления знаний о биологии бактериальной клетки. Практический интерес к стрессу у патогенных бактерий определяется тем, что стрессорные белки могут рассматриваться как антигены, имеющие большое значение в иммунологии.

Глава 1

Белки теплового шока у бактерий

Наиболее изученными соединениями, синтезируемыми бактериями в состоянии стресса, являются так называемые белки теплового шока (БТШ), появляющиеся под воздействием повышенной температуры.

Впервые БТШ были обнаружены в начале 80-х годов у микобактерий и позднее выявлены более чем у 50 видов бактерий, а также у паразитов и млекопитающих [11].

Большинство БТШ имеет мол.м. 65 и 70 кД, но в ряде случаев она составляет всего 10–18 кД. Типичными БТШ являются белки GroEL и DnaK из *E.coli*, которым гомологичны на 50 % и более БТШ микобактерий, *C.burnetti* и др.

Исследована закономерность образования БТШ у *B.subtilis* *rel A* [148]. Этот микроорганизм, культивируемый при 37 °C, продуцирует БТШ в ответ на повышение температуры вплоть до 52 °C. Некоторые белки, идентифицированные как БТШ, образуются и при 37 °C, однако синтез большей их части про-

исходит в ответ на тепловой шок. Скорость образования БТШ резко возрастает сразу после повышения температуры, достаточно длительное время остается постоянной, а затем снижается. При температуре 52 °С, ингибирующей рост бактерий, синтез вегетативных белков подавляется, но БТШ продолжают продуцироваться и их относительное содержание в клетках достигает значительного уровня. Сразу после снижения температуры скорость синтеза БТШ резко уменьшается.

Изучены изменения в чувствительности к тепловому шоку на разных стадиях фазы экспоненциального роста клеток *B.subtilis*. Обнаружено, что на некоторых стадиях этой фазы тепловую обработку выдержали почти 100 % клеток, тогда как на другой стадии той же фазы при такой обработке погибало до 99 %. Эта стадия повышенной термочувствительности занимала лишь небольшую часть экспоненциальной фазы. Прогрев клеток при 45 °С уменьшал их чувствительность к последующему прогреву при 54 °С. На основании этих данных можно сделать вывод, что, помимо БТШ, еще какие-то процессы определяют степень чувствительности клеток *B.subtilis* к нагреванию в фазе экспоненциального роста [109].

Описаны оптимальные температурные условия для индукции БТШ у *N.gonorrhoeae*. Выявлено 10 БТШ, 2 из которых дают перекрестную иммунологическую реакцию (Вестерн-блот анализ) с БТШ *E.coli* DnaK и GroEL. На двухмерной ауторадиограмме в полиакриламидном геле (ПААГ) идентифицированы 4 БТШ с саркозил-нерасторвимой мембранный фракцией. Двухмерные подвижности БТШ 2, 3, 5, 6 *N.gonorrhoeae* и белки DnaK, GroEL, GroE и GroES *E.coli* оказались идентичными. Два из БТШ мембранный фракции обнаружены только в ней и, следовательно, являются мембранными белками [310].

Установлена способность вирулентных клеток *L.monocytogenes* синтезировать новые белки в условиях теплового шока. В этих условиях непатогенные листерии других видов синтезировали на 5–6 белков меньше и не продуцировали листериолизин [272].

При изменении температурного режима культивирования с 20 °С на 33, 37 или 40°, а также от 33 до 37 и 40° *B.burgdorferi* обнаружено появление 5–12 БТШ. Один из них имел мол.м. 72 кД и был гомологичен БТШ DnaK *E.coli* и БТШ *M.tuberculosis* с мол. м. 71 кД. Другие 2 БТШ с мол.м. соответственно 60 и 66 кД были гомологичны БТШ *E.coli* GroEL и БТШ *M.tuberculosis* с мол.м. 65 кД [89]. Реакция культуры на действие стрессора должна в значительной мере зависеть от фазы ее роста и развития, как это показано на моделях грибов [48].

60 кД иммунодоминантный антиген *L.pneumophila* является белком теплового шока (Hsp), относящимся к классу GroEL. Ген htp кодирует синтез 60 кД белка. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК подтверждает наличие 2 состав-

ных частей: *htpA* и *htpB*, которые кодируют белки, состоящие из 96 и 548 аминокислот соответственно. Показано, что *htpB* белок имеет 76 % гомологию с 65 кД белком *M.tuberculosis* и 85 % гомологию с белками *GroEL E.coli* и *htpB C.burnetti*. Очищенный 60 кД белок *L.pneumophila* оказался антигеном для человеческих Т-лимфоцитов. Непрямое изучение флюоресцирующих антител подтвердило, что этот белок локализуется в периплазме или на поверхности внутриклеточных бактерий. Это указывает, что механизм, связанный со стрессором, может быть вовлечен в экспрессию этого иммунодоминантного антигена [153].

Изучено распределение плазмидных стрессорных белковых генов у *S.thermophilus*, и у других молочнокислых бактерий обнаружено наличие генов, кодирующих синтез БТШ у родов *Streptococcus* (47 штаммов), *Lactobacillus* (34 штамма), *Lactococcus* (24 штамма), *Leuconostoc* (5 штаммов) [274].

1.1. Белки теплового шока, синтезируемые под воздействием других стрессоров

Установлено, что повышение скорости синтеза стрессорных БТШ *B.subtilis* может происходить в ответ на действие разных стрессоров. Ряд БТШ усиленно синтезируется при голодании по аминокислотам и при лимите кислорода или в ответ на осмотический шок [109]. Исследована индукция стрессорных белков у штаммов *B.subtilis* *rel A⁺* и *rel A⁻*. Рассмотрены важные механизмы такой индукции в случае стрессов, вызванных нагреванием, изменением pH и аминокислотным голоданием, воздействием H_2O_2 и высоких концентраций NaCl. Выявлено, что индукция стрессорных белков при снижении pH и голодании по аминокислотам происходит лишь в клетках *rel A⁺* [150].

Дефицит железа, отсутствие глюкозы, рост при низком парциальном давлении кислорода вызывали у *N.gonorrhoeae* экспрессию ряда белков, отсутствующих при выращивании микробов в оптимальных условиях. Проведено выделение в очищенном виде, исследование физико-химических свойств и секвенирование стрессорного белка с мол.м. 63 кД. Установлено, что N-концевой участок этого белка на 65 % гомологичен белку теплового шока *hsp60* [224].

Не только тепловой шок, но и холодовой и голодание индуцировали синтез двух белков *DnaK* (I и II) в клетках *V.vulnificus*, *Vibrio* sp. S14 и *Vibrio* sp. DwI. Белки, меченные [^{35}S]-метионином, анализировали с помощью электрофореза (ЭФ) в ПААГ с додецилсульфатом-Na(DDS-Na) и иммуноблоттинга. Мол.м. I и II были равны 60 и 69 кД соответственно. Антитела к *Dnak* взаимодействовали с I и II из исследованных видов белков *Vibrio*. Вид I синтезировался при тепловом шоке у *V.vulnificus*, *Vibrio* sp. S14 и *Vibrio* sp. DwI и при холодовом

шоке у *V.vulnificus* и *Vibrio* sp. Dwl. Повышенный синтез I и II происходил при длительном углеродном голодании *Vibrio* sp. S14.

У *V.vulnificus* синтез I и II наблюдался в начале голодания, а затем тормозился и через 96 ч голодания снижался до исходного уровня. У *Vibrio* sp. Dwl голодание индуцировало только синтез II. Вид I из *Vibrio* sp. S14 по N-концевой аминокислотной последовательности был идентичен DnaK *E.coli*, II имел гомологии с другими белками с известной первичной структурой. Предполагается, что I и II функционально различаются [298].

Показано, что обработка вирулентных *L.monocytogenes* перекисью водорода и температурой 48 °C индуцировала синтез 5 видоспецифических стрессорных белков и листериолизина [272].

Стрессорные реакции у *E.coli* индуцировали давление 270, 540 и 1080 атм. Синтезированные de novo белки анализировали ЭФ в ПААГ с DDS-Na и флюорографией, а затем сравнивали с другими стрессорными белками, полученными тепловым и низкотемпературным шоками. Основным белкам теплового шока соответствовали 3 из 5 белков. Основной 21,5 кД белок не был обнаружен ни при низкой, ни при высокой температуре [303].

Проведено исследование стрессорных белков азотфиксациющей цианобактерии *Anabaena* sp. штамма L-31 при различных стрессорах. Для всех видов стрессорных воздействий наблюдается индукция белков с мол.м. 82, 23 и 19 кД. Помимо этих общих белков, индуцирующихся при всех видах стрессоров, при каждом воздействии синтезируются и специфические белки. При осмотическом шоке и изменении солености обнаружено 12 таких белков с мол.м. от 18 до 41 кД, а при тепловом шоке — белки с мол.м. 32, 65 и 92 кД [73].

1.2. Роль белков теплового шока в бактериальной клетке

Полагают, что в бактериальной клетке БТШ выполняют, по-видимому, роль шаперонов, т.е. блокируют образование третичной и четвертичной структуры вновь синтезируемых белков и обеспечивают транспорт последних через мембрану. Описан основной путь транспорта периплазматических белков через внутреннюю мембрану у *E.coli*, осуществляемый посредством секрецируемых белков Sec, катализирующих главные этапы транслокации [105]. Транспорт секрецируемых белков через наружную мембрану вовлекает дополнительные специфические компоненты и/или вспомогательные белки. Подробно рассматривается транспорт белков у бактерий, опосредованный шаперонами. Для инициации транслокации необходимы

АТФ и белок SecA. Большинство ранних стадий транслокации белков требует наличия протондвижущей силы. Исследование *in vitro* реакций транслокации, в которых используют очищенные растворимые или мембранные компоненты, еще окончательно не прояснило главные черты энергетического механизма транспорта, хотя установлено, что у каждого исследованного этапа транслокации имеются определенные энергетические потребности [105].

Изучена роль БТШ DnaK и DnaJ в выделении ряда белков из клеток *E.coli*. В мутантах DnaK⁻ и DnaJ⁻ транслокация SecB независимого белка ингибирована, что указывает на возможное участие белков DnaK и DnaJ в выделении этого белка. Особую роль эти белки играют в штаммах, не содержащих SecB. Они необходимы как для выживания клеток, так и для формирования SecB-зависимых белков: LamB и белка, связывающего мальтозу. Образование DnaK и DnaJ в большом количестве позволяет штаммам без SecB расти в обогащенной среде и усиливать образование LamB и белка, связывающего мальтозу. Сделан вывод о том, что в условиях недостатка SecB белки DnaK и DnaJ заменяют SecB и участвуют в экспрессии белков из клеток [307].

Ранее отмечалось, что тепловой и холодовой шоки и голодание индуцируют синтез двух белков DnaK в клетках *Vibrio*, причем белок I по N-концевой аминокислотной последовательности оказался идентичным белку DnaK *E.coli*, который у *E.coli* выполняет функцию шаперона. Сделано предположение, что белок II также является шапероном, дополняющим действие I в состояниях стресса [298]. Доказано участие БТШ GroE в сборке чужеродных олигомеров рибулозидифосфаткарбоксилазы оксигеназы в клетках *E.coli* [133].

С помощью дифференциального и градиентного центрифugирования из *Treponema pallidum* выделена нативная структура, содержащая белок 60 кД — основной антиген TpN60.

Антисыворотка к TpN60 взаимодействовала с GroEL полипептидами *E.coli*. Показано, что N-концевая область TpN60 в высокой степени сходна с аналогичными участками белков GroEL *E.coli*, родственными шаперонам микобактерий, *C.burgnetti* и др. Выявленное сходство позволило отнести TpN60 к БТШ, участвующим в упаковке и агрегации белков [132].

У *C.botulinum* типа A идентифицирован шаперон, подобный DnaJ. Когда микробы подвергались действию температуры 45 °C, у них нарастала экспрессия по крайней мере 9 БТШ (Hsp₅), среди которых белок с мол. м. 40 кД с помощью серологической реакции был идентифицирован как шаперон DnaJ *E.coli*. Предполагают, что этот шаперон может принимать участие в транслокации нейротоксина и других клеточных белков через мембрану клетки, а также в восстановлении поврежденных

белков и в выживании микроорганизма в организме хозяина [268].

В экспериментах с использованием ингибитора транскрипции рифампицина показано, что этот ингибитор и хлорамфеникол (ингибитор трансляции) препятствуют индукции стрессорных белков. Исходя из этих данных, сделан вывод о регуляции синтеза стрессорных белков на уровне транскрипции. Возможно, существует 2 уровня регуляции генов. Основной уровень регуляции является, по-видимому, общим для нескольких видов стресса. Этот уровень осуществляет координацию экспрессии общих стрессорных белков. Второй уровень регуляции может быть более специфичным для индивидуальных видов стресса и может вызывать экспрессию белков, уникальных для каждого стрессорного воздействия [73]. В последние годы появилась гипотеза о значении в этом процессе так называемых сигма (σ) факторов [62, 102, 175, 315], генов *clpC* (у *B.subtilis*), *htrA* (у *E.coli* и *S.typhimurium*) [102, 175].

Предполагают, что функция БТШ связана с адаптацией микроорганизма к неблагоприятным условиям внешней среды [109]. Изучена кислотная адаптация *S.typhimurium* к стрессорам окружающей среды. Клетки *S.typhimurium* адаптировались к кислоте путем их экспозиции в мягких кислотных условиях (рН 5,8). Установлена взаимосвязь кислотной адаптации и толерантности к стрессорам окружающей среды, таким как высокая температура, повышенная концентрация солей. Показано, что кислотная адаптация увеличивает гидрофобность поверхности клеток, индуцирует синтез специфических белков наружной мембранны [189].

Есть мнение, что БТШ у патогенных микроорганизмов могут действовать как общие факторы вирулентности [169]. Подтверждает это тот факт, что мутанты *S.typhimurium* с дефектными генами БТШ быстрее погибают *in vitro* в результате действия макрофагов, чем микробы с нормальными генами.

1.3. Механизм защиты от стрессорных воздействий

Установлено, что резистентность *S.typhimurium*, взятых в стационарной фазе роста, к нагреванию до 55 °С была выше у клеток, выращенных в богатых питательных средах [197]. Резистентность повышалась в случае предварительного инкубирования бактерий при 48 °С. Хлорамфеникол снижал уровень приобретенной термотолерантности, но не во всех случаях. Термотолерантность сопровождалась повышением синтеза БТШ с мол.м. 83, 72, 64 и 25 кД. При смене температуры инкубирования с 48 на 37 °С термотолерантность культур быстро падала, чему, однако, не способствовало снижение уровня синтеза указанных белков. При снижении температуры культивирования бактерий быстро исчезали минорные белки с

мол.м. 34 кД, которые и могут обуславливать резистентность клеток к нагреванию.

С помощью транспозона Tnpho A получены 2 мутантных штамма *S.typhimurium* со сниженной вирулентностью. Мутация приводила к снижению устойчивости *S.typhimurium* к бактерицидному действию перекиси водорода и менадиона и не влияла на терморезистентность. При исследовании фрагментов ДНК, полученных из мутантных штаммов, обнаружено, что транспозон Tnpho A встраивался в нуклеотидную последовательность, которая кодировала полипептид, состоящий из 495 аминокислотных остатков. Анализ аминокислотной последовательности свидетельствовал о значительной гомологии этого полипептида с БТШ, кодируемого htrA геном *E.coli*. Сделан вывод о роли гена htrA в вирулентности *S.typhimurium* [163, 164].

Установлено, что утрата 300 пар оснований в рамке считывания, расположенной на 1300 пар оснований выше гена hly, лишила *L.monocytogenes* способности синтезировать 5 стрессорных белков и листериолизин [272].

У клеток *B.ammoniagenes* бензилвиолет индуцировал окислительный процесс. При этом в клетках накапливалось вещество, идентифицированное как 2-метилбутан-1,2,3,4-тетразол-2,4-циклопирофосфат, концентрация которого в клетках достигала 50 мкМ. Предполагается, что это новый бактериальный антистрессор. Его антистрессорная функция может быть обусловлена комплексированием двухвалентных катионов, ответственных за окислительные повреждения [221].

После стрессорных воздействий на популяцию *E.coli* (осмотический стрессор, добавление этанола или перекиси водорода) быстро возрастала активность щелочной фосфатазы [222]. Обычно *E.coli* образует щелочную фосфатазу только при недостатке в среде фосфора. Однако в стрессорных ситуациях этот фермент синтезировался и при избытке фосфора в среде.

Присутствие в среде осмопротекторов (глицин-бетаин, пролин) увеличивало степень выживания бактерий при осмотическом шоке и снижало синтез щелочной фосфатазы. Предполагается, что существует определенная связь между выживанием клеток *E.coli* в состояниях стресса и образованием бактерией этого фермента.

Исследованы вещества, выделенные клетками *E.coli* M-17 в культуральную среду при нагреве, электрообработке и при таких распространенных препаративных процедурах, как центрифugирование и микрофильтрация. При этом использованы методы гель-хроматографии, хроматомассспектрометрии, спектрофотометрии в УФ- и ИК-областях спектра, кондуктометрии, а также тестирование клеток на устойчивость к неблагоприятным воздействиям. Разным воздействиям отвечают различные компоненты экскретируемых соединений, среди кото-

рых при определенных условиях могут обнаруживаться и компоненты “фактора стресс-устойчивости клеток” [4].

Показано, что 90 % клеток *E.coli*, подвергнутых действию осмотического шока (0,8 M NaCl), в течение 6 ч после воздействия теряет способность к образованию колоний. При этом они накапливают высокие концентрации АТФ, но не синтезируют белок. При обработке клеток бетаином отмечено восстановление способности к образованию колоний. Одновременно восстанавливается синтез белка и снижается внутриклеточный уровень АТФ. Способность к образованию колоний у клеток, подвергнутых действию осмотического стрессора, под влиянием бетамина восстанавливается и при наличии в среде хлорамфеникола. Сделан вывод, что осмотический стрессор не приводит к гибели клеток [147]. С помощью метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) доказано, что дисахарид трегалоза является основным органическим осмолитиком у осмоадаптированных клеток *E.coli*. Обнаружен отчетливый двухфазный ответ на осмотический стрессор. Начальная фаза включала быстрый синтез глутамата и конкурентное накопление ионов K⁺. Во время второй фазы осмоадаптации глутамат замещался трегалозой. Обнаружено, что в периодической культуре внутриклеточная концентрация трегалозы зависит как от осмотической силы среды, так и от фазы роста культуры. Концентрация трегалозы была максимальной в экспоненциальной фазе роста культуры [300]. При непрерывном культивировании в условиях как азотного, так и углеродного лимитирования выявлена такая же двухфазная картина отклика клеток на осмощок [301]. Позднее с использованием (¹³C) ЯМР-спектроскопии были идентифицированы вещества, накапливающиеся в клетках пурпурных и зеленых серобактерий в процессе их адаптации к засолению среды [302]. Увеличение осмотического давления раствора вызывает синтез сахарозы в клетках пурпурных бактерий независимо от того, выделены ли они из пресного или соленого водоема. Пурпурные бактерии, выделенные из очень соленых водоемов, кроме сахарозы, синтезируют глицин-бетаин. Все исследованные пурпурные бактерии в ответ на увеличение осмотического давления раствора поглощают добавленный глицин-бетаин. Зеленые серобактерии в растворе с высокой концентрацией NaCl синтезируют трегалозу и поглощают добавленный глицин-бетаин.

Клетки галофильной *Chromatium* sp. Ncl MB 8379 с высокой скоростью поглощают (¹⁴C)-глицин-бетаин, внутриклеточная концентрация которого возрастает с увеличением осмолярности среды.

Установлено, что пролин-бегаин является таким же эффективным осмопротектором, как глицин-бетаин, и более эффективным, чем *l*-пролин, для различных штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis* и *S.saprophyticus* [53]. Бетаин вызывал уменьшение

уровней внутриклеточного K^+ и небелковых тиолов у *E.coli* в среде с высокой осмолярностью и щелочным pH [271]. Необычные свойства бетаина как осмопротектора могут быть связаны с комбинацией его способности поддерживать клеточный тургор в результате накопления в цитоплазме, активировать выход K^+ и, возможно, изменять содержание тиолов и уменьшать внутриклеточный pH до значений, оптимальных для роста *E.coli* в среде с высокой осмолярностью.

Особую роль трегалозы при стрессе отмечает Е.П.Феофилова [47]. По ее классификации стрессоры можно разделить на незапрограммированные и запрограммированные. При действии запрограммированного стрессора, т.е. при медленном истощении источников питания, когда создаются условия перехода в состояние анабиоза, начинается накопление в клетках трегалозы.

Автор считает, что в данных условиях трегалоза выполняет, вероятно, две основные функции — служит источником резервного углерода в течение анабиотического состояния и является мембрально-протекторным соединением, стабилизирующими мембранны для дегидратации. В случае же действия незапрограммированного стрессора, т.е. если какой-либо неблагоприятный фактор влияет на активно растущий, молодой мицелий, то здесь трегалоза выполняет роль “депо”, хранилища и консерванта энергетического, высокореакционноспособного субстрата—глюкозы. Происходит как бы выход части глюкозы из клетки, что необходимо для ингибирования ростовых процессов. Эта функция трегалозы при шоковом воздействии не исключает ее роли как стабилизатора мембранных липидов. В природе существует определенная дифференциация протекторных соединений, тесно связанная с условиями существования и химическим составом клеток, в частности мембранных липидов. Например, высокая осмофильность коррелирует у прокариотов с проявлением в клетках глицин-бетаина и пролина, а также гликозил-глицерина и глутамата. Для низших эукариот, в частности мицелиальных грибов, в состояниях стресса протективными соединениями являются трегалоза и полиолы. Для растений более специфичны сахароза и ряд олигосахаридов. Учитывая основную биологическую функцию протективных углеводов — способность стабилизировать липидный бислой, можно предположить, что природа протектора коррелирует с составом мембранных липидов. Есть мнение, что основное стрессорное воздействие состоит в изменении текучести липидного бислоя мембранны, что приводит к метаболическому дисбалансу в функционировании мембрально-связанных ферментов. Известно, что по составу липидов эукариоты значительно отличаются от прокариот [46]. Возможно, защита мембранны бактерий, более полиморфной по строению и составу липидов, потребовала более узкоспециализированных

протекторов, таких как глицин-бетаин, гликозил-глицерин, которые пока не обнаружены у эукариот.

Показано, что dnaK локус *L.monocytogenes*, состоящий из 4 фрагментов (*hrcA* — *grpE* — *dnaK* — *dnaJ*), необходим для выживания в стрессорных условиях, т.е. при высокой температуре, в кислой среде и в клетках макрофагов [147].

Установлено, что у *E.coli* elongation factor-G (EF-G) и initiation faktor-2 (IF-2) в дополнение к их роли в трансляции могут принимать участие и в защите от стрессоров [88].

В настоящее время трудно представить себе в целом механизм защиты бактерий от стрессорных воздействий. Однако приведенные данные могут оказаться полезными в дальнейшем при расшифровке этого механизма.

Действие различных неблагоприятных факторов на популяции бактерий вызывает состояния стресса, которые характеризуются синтезом стрессорных белков, выполняющих многообразные функции. В главе дан анализ имеющихся материалов, посвященных БТШ, синтезируемым в результате действия высокой температуры и других стрессоров, роли этих белков в бактериальной клетке и предполагаемым механизмам защиты от стрессорных воздействий. Результаты исследований обосновывают необходимость дальнейшего изучения проблемы стресса у бактерий и стрессорных белков в биологии и медицине.

Глава 2

Холодовой шок у бактерий

Известно множество физических и химических средовых факторов (стрессоров), способных вызывать состояние стресса у бактерий [1, 6, 11, 12, 44]. Ответ микроорганизма на эти стрессоры характеризуется количественным и качественным регулированием синтеза белков. Среди физических факторов особое место занимают температурные стрессоры. Они делятся на тепловые [11, 198], действие которых приводит к синтезу белков теплового шока (Heat shock proteins — Hsp_s), и холодовые, которые действуют на многочисленные бактерии [14, 137, 225], растения [312] и животных [97, 215], включая человека [154].

Тепловой шок хорошо изучен главным образом на модели *E.coli*. Он наиболее полно охарактеризован как на физиологическом, так и на молекулярном уровнях, путь регуляции белков объяснен [313]. Действие низкой температуры на рост бактерий

и синтез белков изучено недостаточно. Однако именно этот вид стрессорного воздействия часто встречается в микробиологической технологии.

Анализ действия низких температур на бактерии может проводиться по трем направлениям: биохимические модификации, физиологические изменения и контроль за ответом на действие низкой температуры [225].

Биохимические модификации касаются степени насыщения жирных кислот и синтеза белков. Охлаждение приводит к ненасыщенности жирных кислот, в результате чего нарастает подвижность мембранные, что необходимо для нормального функционирования клетки при пониженной температуре.

Физиологический ответ на действие низкой температуры зависит главным образом от того, возможно ли при этой температуре продолжение роста. При достаточно низкой температуре наступает смерть. В первом случае эффект может быть измерен скоростью роста, а во втором — скоростью отмирания.

Есть еще один результат действия низкой температуры на бактерии — синхронизация деления микробных клеток [10, 22]. В последнее время доказана целесообразность использования индекса синхронизации (ИС) и критерия синхронизации (КС) для оценки степени (глубины) шокового (стрессорного) действия низкой температуры на микроорганизмы [22].

Наибольшее количество исследований, посвященных влиянию низких температур на бактерии, касается синтезов дополнительных (стрессорных) белков и регуляции этих синтезов. Эти данные нуждаются в осмыслении с точки зрения задач микробиологической технологии.

2.1. Холодовой шок у *E.coli*

После снижения температуры с 37 до 10 °C рост *E.coli* останавливается, а относительные скорости синтезов 14 белков значительно возрастают [165]. Эти белки, называемые белками холодового шока (Cold shock proteins — Csp_s), отличаются от БТШ (Hsp_s). Из белков холодового шока (Csp_s) идентифицированы 10.

Они включаются в процессы, такие как транскрипция, трансляция, деградация мРНК, конденсация хромосомы и др. В последнее время были идентифицированы еще несколько новых Csp_s. Один из них — CsdA (или Dead D), ассоциированный с рибосомами белок, развинчивает двойную спираль РНК [167]. Другой фактор, связанный с рибосомами RbfA, усиливает способность трансляции рибосом и обеспечивает восстановление роста [166]. Есть еще несколько рибосомальных белков (L7, L12, S1 и др.), которые непрерывно синтезируются у *E.coli*.

в результате действия низкой температуры [138]. Показано, что инициирование трансляции является лимитирующим фактором роста бактерий при низкой температуре. Это, вероятно, обеспечивает преимущественный синтез белков, включенных в трансляцию у *E.coli* после снижения температуры.

В ответ на снижение температуры у *E.coli* индуцируются также еще два белка: Hsc66 (Heat shock cloramphenicol 66) или HscA и HscB. HscA гомологичен белку теплового шока Hsp70 у *E.coli* [187]. Экспрессия *hscA*-гена индуцируется приблизительно 11-кратно 3-часовым действием снижения температуры с 37 до 10 °C. Более того, *hscA*-ген был индуцирован добавлением хлорамфеникола, который индуцирует также синтезы, кодируемые другими генами.

Использование двухмерного электрофореза позволило идентифицировать Hsc66-белок в условиях стабильного роста при 37 °C и показать, что *hsc 66*-ген индуцируется так же, как *hscA*-ген, т.е. после 3-часового действия холода. На основе гомологии с Hsp70 белками и индукции, сопровождающей холодовой шок, возникло предположение, что Hsc66 функционирует как молекулярный протектор, индуцированный холодом.

Среди *E.coli* Csp_s главным является CspA. Этот белок связан с ДНК и РНК. Он индуцируется более чем в 200 раз после снижения температуры с 37 до 10 °C [132, 207]. Этот белок не определяется при 37 °C. Он обнаруживается только при низких температурах, начиная с 2-часовой экспозиции при 10 °C, когда его концентрация достигает $2,5 \times 10^5$ молекул на клетку [290]. *E.coli* содержит большое семейство Csp_s, состоящее из белков, гомологичных CspA от CspB до CspH [61, 212]. Среди них CspA, CspB и CspG индуцируются холодом. CspA играет главную роль в ответе на снижение температуры у *E.coli*, поскольку он активирует трансляцию других генов холодового шока [207]. Он может также селективно стимулировать трансляцию его собственной мРНК и, возможно, других мРНК холодового шока [84]. CspA на 43 % идентичен белкам семейства домена холодового шока (Y-box) у эукариотов. Показано, что он включается в регуляцию генов и маскировку мРНК [308]. Было обнаружено, что в процессе адаптации к холodu происходит гиперпродукция последовательности из 143 оснований 5'end Untranslated Region (5'UTR) CspA мРНК [162]. Эта гиперпродукция UTR при 15 °C обусловливает синтезы не только CspA, но также и других белков холодового шока, таких как CspB, а синтез CsdA перестает быть временным и становится довольно продолжительным. В дополнение к этому происходит ингибирование белков, не относящихся к белкам холодового шока и клеточного роста. Есть мнение, что CspA может действовать как общий транскрипционный активатор регулона холодового шока у *E.coli* [138]. Имеются генетические

данные о том, что CspA негативно регулирует экспрессию своего собственного гена на уровне транскрипции и мРНК стабилизации [61]. CspA предотвращает образование стабильной вторичной структуры молекул мРНК при низкой температуре.

Новый член CspA — семейства генов, который индуцируется в ответ на холодовой шок у *E.coli*, — это CspG-ген [212]. Он локализуется на 22-й минуте генетической карты *E.coli*, близко от других генов семейства CspA. Продукт этого гена (70 аминокислот) на 73 и 77 % идентичен CspA (70 аминокислот) и CspB (71 аминокислота) соответственно. Результаты показали, что CspG-последовательность в высшей степени подобна последовательностям CspA и CspB.

2.2. Холодовой шок у *B.subtilis*

Ответ *B.subtilis* на снижение температуры выражается в индукции синтеза белков, которые классифицируются как cold-induced proteins (Cip_s) [136, 138, 258, 363, 365]. С помощью двумерного электрофореза в геле показано, что после снижения температуры с 37 до 15 °С синтез большинства белков репрессируется. В противоположность этому 37 белков синтезируются со скоростью более высокой, чем до снижения температуры. Через час после повышения температуры индукция Cip_s снижается, а через 2 часа — общий белковый синтез восстанавливается. Посредством микросеквенирования были идентифицированы 16 главных Cip_s у *B.subtilis* и обнаружено семейство гомологичных белков холодового шока, которые очень важны для адаптации к низким температурам. Функция одного из этих белков CspB была проанализирована у cspB-мутантного штамма. Анализ этого мутанта с помощью двумерного электрофореза показал, что CspB белок действует на уровне индукции нескольких Cip_s. Cip_s функции были изучены на различных уровнях клеточной физиологии, таких как хемотаксис, потребление сахара, трансляция рибосомальных белков и общий метаболизм.

Установлено, что ответ *B.subtilis* на действие холода аналогичен таковому у *E.coli* [138, 214, 259].

2.3. Холодовой шок у психрофильных бактерий *P.fragi*

P.fragi — психрофильные бактерии, способные расти в широком диапазоне температур (от 2 до 35 °С). Это главный поверхностно расположенный микроорганизм охлажденного мяса. Бактерии преодолевают холодовый шок, размножаются, и поэтому мясо портится. Исследования посвящены изучению

ответа *P.fragi* на внезапное снижение температуры от 30 или 20 до 5 °C [207]. Это воздействие сопровождалось остановкой роста, характерной для 5 °C. Анализ, проведенный с помощью двумерного гель-электрофореза, показал сверхэкспрессию 25 белков и снижение экспрессии 12 белков после снижения температуры от 30 или 20 °C соответственно. Кинетический анализ показал наличие белков холодового шока (*Csp_s*), которые обнаружили быструю, но временную сверхэкспрессию, и белков холодовой акклиматизации (*Cap_s*), которые были более или менее быстро индуцированы и проявили сверхэкспрессию через несколько часов после снижения температуры. Среди белков, индуцированных холодом, 4 имели низкую мол.м., 2 из них предварительно характеризовались как *Cap_s* (*CapA* и *CapB*), а 2 других — как белки тепловой акклиматизации (heat acclimation proteins) (*TapA* и *TapB*). С помощью метода микросеквенирования была частично определена аминокислотная последовательность этих белков. Кроме того, была изучена нуклеотидная последовательность соответствующих генов. Показано, что эти 4 белка принадлежат семейству белков с низкой мол.м., связанных с нукleinовой кислотой. Они подобны *CspA* — главному из *Csp_s* *E.coli* и также играют основную роль в адаптивном ответе бактерий на изменение температуры окружающей среды.

2.4. Экспрессия генов холодового шока у *S.typhimurium*

Известно, что бактерии отвечают реакцией множества генов на снижение температуры. У *S.typhimurium* определен ряд генов, индуцированных низкой температурой [99]. Один ген был назван *cspB*, и удалось доказать, что он кодирует белок, гомологичный главному белку холодового шока *E.coli* — *CspA*. Экспрессия гена холодового шока *cspB* у *S.typhimurium* происходит при температуре ниже пороговой (22 °C). Обнаружено, что *CspB* мРНК очень стабильна при 10 °C, но становится нестабильной, когда температура нарастает до порогового значения, даже в присутствии рифампицина. Находящиеся в клетке рибонуклеазы способствуют распаду *CspB* мРНК при высоких температурах, но не в состоянии это сделать при низких температурах.

2.5. Сравнение реакции на снижение температуры у разных бактерий

Приведенный анализ свидетельствует о том, что реакция на снижение температуры у различных бактерий имеет общие черты. Эта реакция обычно бывает двухфазной. Она включает

немедленный ответ и непрерывную акклиматизацию. Когда бактерии переносятся из среды, имеющей температуру, оптимальную для их роста, в среду с более низкой температурой, при которой рост останавливается, имеет место немедленный ответ, сопровождающийся синтезом белков холодового шока (Cold shock proteins — Csp_s). Далее происходит синтез белков непрерывной акклиматизации (Cold acclimation proteins — Cap_s). Сверхсинтез этих белков коррелирует с подавлением синтеза основных белков микробной клетки [225].

Индукция белков в ответ на снижение температуры может быть управляемой. Это показано у видов *Bacillus* [196, 306, 311], *Listeria* [228], *Rhizobium* [96].

Гомологи главного белка холодового шока CapA *E.coli* были идентифицированы у многих бактерий [60, 72, 138, 202, 207, 236, 264, 306], в том числе *Streptomyces* [138], *L.mono-cytogenes* (CspL), *S.typhimurium* (Csp_s), *A.globiformus* (Cspl). Принадлежность генов, кодирующих эти белки, к многогенному семейству cspA-подобных генов доказана у *B.cereus* [225] и *B.subtilis* [207].

Изложенное свидетельствует об однотипности реакции на действие холода самых разнообразных видов и родов бактерий. Приведенные данные обосновывают предположение о том, что CspA-гомологи могут иметь место и у других, в том числе патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Реакция бактерий на снижение температуры имеет общие черты. Однотипность реакции на действие холода самых разных видов и родов бактерий подтверждается данными, приведенными в настоящей главе.

*Холод индуцирует гены холодового шока, в результате чего происходят значительные изменения в регуляции синтеза белков. Подавляется синтез основных белков микробной клетки. Однако синтезируется множество новых белков, так называемых белков холодового шока. Главным из этого семейства белков является CspA *E.coli*, который активизирует трансляцию других генов холодового шока и негативно регулирует экспрессию своего собственного гена. Гомологии CspA *E.coli* были идентифицированы у многих бактерий. Они могут быть найдены и других микроорганизмов, в том числе и у возбудителей инфекционных болезней. Во многих случаях этим можно объяснить общность антигенов различных бактерий, обуславливающую трудности в идентификации и недостаточную специфичность иммунодиагностических препаратов и тест-систем, в технологии которых есть стадия охлаждения культуры. Поэтому в указанных случаях необходимо использовать культуры, выращиваемые в оптимальных условиях, т.е. при отсутствии не только температурных, но и других стрессоров.*

Глава 3

Голодание бактерий — стресс, обусловленный лимитом субстрата

Среди бактериальных стрессов особая роль принадлежит голоданию (starvation stress), обусловленному лимитом того или иного компонента питательной среды, например источников углерода, азота, фосфора, железа и др. Разные аспекты изучения голодания бактерий имеют большое общебиологическое значение. Однако исследования в этом направлении разрознены и подчас противоречивы.

В настоящей главе дан анализ имеющихся сведений о голодании бактерий как о состоянии стресса, вызванного лимитом субстрата.

3.1. Лимит субстрата и состояние стресса у бактерий

В естественных средах обитания микроорганизмы часто находятся в состоянии лимита того или иного субстрата, необходимого для их жизнедеятельности, т.е. в состоянии голодания. Это состояние было изучено многими исследователями в управляемых процессах периодического и непрерывно-проточного культивирования в 70—80-х годах. На модели *S.typhi* определены физиолого-биохимические особенности бактерий в состоянии голодания по глюкозе, содержание в клетках РНК, ДНК, белка и кислоторастворимых соединений [10, 30].

Изучение ответа микроорганизмов на лимит субстрата настолько заинтересовало исследователей, что в 70-е годы в городе Пущино-на-Оке проходили научные конференции, посвященные этой проблеме.

Изучение различных видов голодания привело к мысли о том, что голодание — это стресс [8, 13, 42]. Анализ кривой роста популяции в жидкой синтетической питательной среде показал, что в конце фазы экспоненциального роста наступает такой момент, после которого компенсаторно-приспособительные механизмы уже не поддерживают скорость деления клеток на постоянном максимальном уровне. В результате этого она снижается. Начинается лимитирование роста популяции, соответствующее состоянию стресса. Этот период, за который наблюдаются разные степени лимитирования роста, называют фазой замедления скорости роста. Эта фаза характеризуется не только снижением скорости роста, но и усилением синтеза резервных веществ — углеводов, липидов и др.

3.2. Критерии оценки процесса голодания бактерий

Соотношение макромолекулярных соединений (белок, ДНК, РНК и др.) в культуре зависит от природы и концентрации лимитирующего фактора, определяющего скорость роста популяции [7]. При этом процесс потребления данного субстрата становится "узким местом", т.е. определяется самой медленной реакцией в цепи последовательных превращений субстрата в микробную биомассу. J.Monod [209, 210] впервые заметил, что кривая зависимости удельной скорости роста от концентрации лимитирующего вещества соответствует хорошо известной в ферментативной кинетике кривой насыщения энзимов субстратом. В условиях лимита глюкозы, например, удельная скорость роста микроорганизмов μ описывается уравнением Monod:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S},$$

где μ_m — максимальная удельная скорость роста, ч^{-1} ; S — концентрация лимитирующего рост субстрата, г/л; K_s — концентрация субстрата, при которой скорость роста равна половине максимального значения, г/л.

Поскольку лимит субстрата вызывает голодание бактерий (т.е. состояние стресса), то это же выражение применимо и для количественной оценки степени (глубины) этого стресса [8]. Очевидно, это справедливо не только при периодическом культивировании, когда состояние стресса наблюдается в фазе замедления скорости роста, но и при непрерывном — в установившихся режимах при скоростях разбавления между $D = \mu = \mu_m$ и $D = \mu = 0$.

Кроме скорости роста μ , отражающей степень процесса голодания, есть и другие критерии оценки этого процесса. Для оценки состояния стресса использовали также экономический и метаболический коэффициенты и продемонстрировали применение этих показателей для оценки состояний популяций *C.perfringens* типа A и *S.typhi* Ty₂ 4446 [11, 31, 32, 33, 34]. Установлено, что культуры *S.typhi*, выращенные в условиях голодания по глюкозе, обладают более высокими значениями экономического коэффициента и интенсивности потребления кислорода (при средних и высоких скоростях разбавления), чем культуры, выращенные в условиях избытка глюкозы. Из этого следует, что голодающие микробные клетки обладают более высокой физиологической активностью [7]. Эти результаты позволили впервые предположить, что в условиях голодания включаются дополнительные защитные механизмы, обеспечивающие жизнедеятельность микробов.

3.3. Новые данные о голодании бактерий

В последние годы установлено, что голодание индуцирует синтез дополнительных белков, обеспечивающих перекрестную защиту микроорганизмов от воздействия других стрессоров [131, 160, 161, 288 и др.].

С помощью двумерного электрофореза изучен ответ *P.putida* KT 2442 на лимит субстрата в процессе голодания и индукции стрессорных белков [131]. Лишение углерода приводило к временной экспрессии двух классов белков, индуцированных голоданием. Один класс был временно экспрессирован в процессе начальной фазы голодания, а второй — на протяжении фазы глубокого голодания. Белки второго класса разделили на белки, индуцированные в условиях голодания по углероду; белки, индуцированные в ответ на повышение температуры и осмотического давления; белки, индуцированные голоданием по азоту и фосфору. Добавление глюкозы к культуре, голодящей по углероду, обеспечивало начало восстановительной фазы. В процессе этой фазы имела место репрессия синтеза белков, индуцированных голоданием. Установлено, что культуры стационарной фазы роста *E.coli*, т.е. голодящие культуры, обнаруживают увеличение устойчивости к осмотическому стрессору по сравнению с культурами середины экспоненциальной фазы роста или с культурами, предварительно адаптированными к осмотическому стрессору [161]. Показано, что эта осмотолерантность, которая развивается в процессе голодания или адаптации к осмотическому стрессору, требует дополнительного синтеза белков. Из 22 полипептидов, индуцированных в процессе осмотического шока, 5 были обнаружены также и при голодании. Увеличение осмолярности среды вызывает у бактерий ингибирование репликации ДНК, клеточного роста и потребление субстрата [100].

Культуры *E.coli*, голодящие по глюкозе или азоту, оказались более устойчивыми к нагреванию (57°C) или действию перекиси водорода (15 mM) в сравнении с экспоненциально растущими культурами [160]. Степень устойчивости нарастала в зависимости от времени, в течение которого эти клетки голодали. Максимальную защиту обеспечивало 4-часовое голодание. Для этой перекрестной защиты был необходим синтез белков в процессе голодания, поскольку хлорамфеникол (ингибитор синтеза белка), добавленный в начале голодания, предотвращал развитие термальной или оксидативной устойчивости. Голодящие культуры также обнаруживали более строгую термальную и оксидативную устойчивость, чем культуры, адаптированные к нагреванию, перекиси водорода или этанолу, т.е. ранее подвергнутые нагреванию или действию перекиси водорода. С помощью двухмерного ЭФ S^{35} меченых белков показано, что наборы из 30 белков культуры, голодают-

щей по глюкозе, были также синтезированы в процессе адаптации к тепловому или оксидативному стрессору. Три белка были общими для всех трех стрессов.

Азотфиксирующие бактерии *R.leguminosarum* bv. *phaseoli* часто выживают в течение длительного периода голодаания в почве, когда отсутствуют полезные симбиотические отношения с растениями [288]. Эти микроорганизмы могут выживать в условиях голодаания по углероду, азоту и фосфору в течение по крайней мере 2 мес при незначительном снижении выживаемости. При голодаании по углероду уменьшалась скорость деления клеток. За этот период снижались также уровни синтеза белка, ДНК и РНК до базовых значений, а пул мРНК стабилизировался. Голодающие клетки восстанавливали рост, когда восстанавливался питательный субстрат. После добавления свежих субстратов имело место немедленное нарастание уровней синтеза макромолекулярных соединений, а пул мРНК де-стабилизировался. Культуры начинали расти экспоненциально в течение 5–8 ч. Голодающие клетки обладали перекрестной защитой от других стрессоров: pH, нагревания, осмотического давления и оксидативного шока. Эти результаты свидетельствуют о том, что общий ответ на недостаток субстрата у этих микробов подобен ответу, ранее описанному у других бактерий, таких как *E.coli* и *Vibrio* sp.

Лимит углерода также может вызывать перекрестную защиту от нескольких других средовых стрессоров. Эта функция является дополнительной к различным специфическим ответам на стрессоры. Голодание *S.typhimurium* в течение 5–24 ч обеспечивает перекрестную защиту от термального стрессора (55 °C в течение 20 мин), оксидативного стрессора (15 mM перекиси водорода в течение 60 мин) и осмотического шока (2,5 M NaCl в течение 50 ч) [123].

Развитие перекрестной защиты, вызванной голодаанием в связи с лимитом углерода *S.typhi* и *E.coli*, зависит от продукта RpoS гена, экспрессия которого регулируется транскрипционно и посттранскрипционно в процессе голодаания [180, 193, 203]. Гены *S.typhimurium*, обеспечивающие выживание при голодаании, необходимы для защиты от термального шока.

У молочнокислых бактерий *L.lactis* также имеются механизмы защиты от стрессоров [233]. Несколько генов, ответственных за устойчивость к стрессорам, обнаруживают гомологию с известными генами других микроорганизмов. Хотя гены ответа на стрессоры консервативны, однако их регуляция может отличаться. Ответ на кислый стрессор может быть особенно важным у молочнокислых бактерий, поскольку их рост и переход к стационарной фазе сопровождается образованием молочной кислоты, в результате чего происходит закисление среды, что влияет на размножение клеток и, возможно, приводит к

их гибели. Результаты исследования штамма *L.lactis* MG1363 показали, что он выживал при изменении рН до 4,0, если был предварительно адаптирован в течение 5–15 мин в условиях рН от 4,5 до 6,5.

Кислые условия индуцировали экспрессию новых генов и соответствующий синтез новых белков. Эти результаты показывают, что *L.lactis* обладает индуцибелым ответом на кислый стрессор. Для идентификации возможных регуляторных генов, принимающих участие в ответе на кислый стрессор, был определен нижний уровень рН, при котором этот штамм не растет, а селекционируются мутанты, которые могут расти при этом рН. В результате охарактеризовали 30 мутантов и доказали, что ответ, который включает голодание и выживание в стационарной фазе, может обеспечивать толерантность к кислому рН.

При голодании происходят генетические и физиологические изменения, которые имеют место в результате лимита по источникам фосфора, углерода или азота [116, 276, 277, 278]. Этот ответ можно разделить на индивидуальный и общий. Индивидуальный — это голодание по фосфору, углероду или азоту, заключается в синтезе индивидуальных белков в ответ на голодание по каждому отдельному субстрату. Общий включает синтез общих наборов белков. Локусы генома, индуцируемые двумя или более условиями голодания, обозначаются как *starvation-inducible* (*sti*). Локусы, индуцируемые одним условием голодания, обозначаются, например, как *carbon starvation-inducible* (*csi*) [279].

Гены, индуцируемые в процессе лимитации по углероду, проявляются на различных этапах кинетики роста популяции. Фаза 0 генов (*stiK*, *csiG*, *csiM*) соответствует поздней фазе экспоненциального роста и фазе замедления скорости роста до начала вызванной голоданием стационарной фазы.

Фаза I генов индуцируется в процессе перехода к стационарной фазе роста, вызванной голоданием. Фазы II и III генов индуцируются от 1 ... 2 до 4 ... 5 ч стационарной фазы соответственно. Таким образом индуцируется большое количество генов, многие из которых проявляются на относительно высоком уровне в течение 24 ч и более при голодании по углероду [277, 280].

Генетическая регуляция генов (как *sti*, так и *csi*) очень сложна. Она включает ЦАМФ-рецепторный белок (CRP) и альтернативный сигма-фактор (*RpoS*). Эти факторы оказывают позитивное и негативное действие на экспрессию генов [179, 219, 279]. В отсутствие голодания *S.typhimurium* происходит CRP-негативная регуляция нескольких генов, включающих 3 гена, связанных с голоданием *stiA*, *stiB* и *stiC*. CRP-негативный контроль является ЦАМФ независимым в противоположность позитивному контролю других генов I фазы. Альтерна-

тивный сигма-фактор RpoS позитивно регулирует stiA и stiC и негативно регулирует два гена 0 фазы (csiG и csiM) и один ген I фазы (stiB).

В последние годы доказано, что *E.faecalis* синтезирует по крайней мере 42 белка в процессе 24-часового голодания по глюкозе [129]. Один из этих белков (Gls24) был квалифицирован как общий стрессорный белок. Он изучался на молекулярном уровне. Установлено, что этот белок и соответствующий ген (gls24) играют роль в морфологических изменениях у толерантных к стрессору *E.faecalis*.

Анализ приведенных данных свидетельствует, что выживание в процессе голодания требует дополнительного синтеза белков. Некоторые из этих белков, экспрессия которых нарастает в процессе голодания, требуются для выживания при одновременном фосфорно-углеродно-азотном голодании. 4 гена необходимы для выживания в процессе голодания *S.typhimurium*: Rpos, stiA, stiB и stiC [220, 279]. Мутация в каком-нибудь одном из этих генов снижает выживание при голодании в 50–100 раз. Мутация 2 из sti-генов сокращает выживание в 500–2000 раз.

Таким образом, голодание может оказывать значительное действие на способность выживания микроорганизмов в природе и в условиях обитания в организме хозяина. По-видимому, голодание, вызванное лимитом углерода, является сигналом, обеспечивающим перекрестную защиту от многих систем хозяина, вплоть до специфических протективных механизмов.

*Приведенные данные литературы свидетельствуют о том, что лимит субстрата обуславливает голодание бактерий, которое является стрессом, вызывающим синтез дополнительных, так называемых стрессорных белков [11]. Эти белки могут играть роль протекторов, обеспечивающих выживание бактерий не только в условиях действия данного стрессора (лимит субстрата), но и ряда других стрессоров (оксидативный, осмотический, температурный и др.). Несмотря на то что расшифрованы генетические механизмы регуляции синтеза некоторых из этих белков, их значение в микробиологической технологии остается неизученным. Наиболее важной в этом отношении является их возможная роль как протективных антигенов, необходимых для конструирования вакцин. Эта мысль отражена в статье [1], где 3 методами доказано нарастание набора серотиповых белков (от 3 до 9) при переходе культуры *N.meningitidis* серотипа В штамма № 125 от экспоненциальной фазы роста к стационарной. Этот эффект зависел от сочетанного действия на культуру нескольких стрессоров, в числе которых немаловажная роль принадлежит лимиту субстрата.*

В целом проблема стресса у бактерий, а именно стресса,

обусловленного лимитом субстрата и другими стрессорами в фазе замедления скорости роста, имеет большое будущее. Оно связано не только с выяснением механизма синтеза бактериальных токсинов, но и с оптимизацией микробиологической технологии на основе управляемого стресса.

Глава 4

Оксидативный стресс у бактерий

Аэробные и факультативно-аэробные бактерии используют молекулярный кислород в качестве конечного акцептора электронов. Как следствие перехода электронов от кислорода к воде образуется супероксид анион (O_2^-) и перекись водорода (H_2O_2) [245]. Свободная перекись водорода реагирует с ионами металлов, такими как ионы железа, и образует более реактивный оксидант — гидроксил радикал (OH) [145, 253]. Кислородные радикалы повреждают мембранные липиды, белки и ДНК [212, 284].

Для предотвращения оксидативных повреждений микроорганизмы имеют эффективные механизмы элиминации с помощью ферментов. Супероксиддисмутаза (СОД) элиминирует токсичный кислород O_2^- с помощью дисмутаций в H_2O_2 и O_2 , а токсичная H_2O_2 обезвреживается действием каталазы и пероксидазы [245].

Оксидативные повреждения ДНК, РНК, белков и клеточных мембран имеют место в тех случаях, когда концентрация реактивных форм кислорода (РФК) превышает способность клеток их элиминировать. Аэробные прокариоты и эукариоты имеют набор защитных систем, уменьшающих повреждающий эффект РФК [289]. РФК включаются в оксидативные клеточные повреждения в физиологических и патологических процессах, например при старении, апоптозе, нейродегенеративных болезнях и при дисбалансе метаболизма железа.

Микроорганизмы являются удобной моделью для изучения взаимоотношений между организмами и РФК в качестве средовых стрессоров. Поэтому настоящая глава посвящена анализу опубликованных результатов исследований, посвященных оксидативному стрессу у бактерий.

4.1. Оксидативный стресс у *S.typhimurium* и *E.coli*

Потенциально летальные уровни РФК в качестве средовых стрессоров могут индуцировать у *S.typhimurium* синтез продуктов некоторых генов. Например, бактерии выдерживают низ-

кие концентрации перекиси водорода (60 мкМ), и при этом индуцируется синтез набора белков, которые позволяют им выжить при высокой концентрации перекиси водорода (15 мМ) [123].

Адаптивная устойчивость к оксидативному стрессору *E.coli* и *S.typhimurium* включает два регулона — один для перекиси водорода, другой для супероксида. Каждый регулон, индуцированный в ответ на сублетальные дозы оксидативного агента, обеспечивает синтез от 30 до 40 белков, часть из которых — общая для обоих регулонов. Функции большинства из этих индуцированных белков неизвестны, однако два набора из них контролируются конститутивно. *OxyR*-локус осуществляет связь 9 белков, экспрессия которых индуцирована перекисью водорода, в то время как 2 генных локуса *soxRS* контролируют индукцию 10 белков в ответ на действие супероксидобразующих агентов. *OxyR* — это транскрипционный активатор генов ферментов: каталазы (*katG*), глутатион-редуктазы (*gorA*) и NADPH-зависимой алкил-гидропероксидазы (*ahpFC*). *E.coli* и *S.typhimurium* имеют 2 изомера каталазы: *KatE* и *KatG*, которые превращают перекись водорода в кислород и воду. Однако только *KatG* регулируется *OxyR* [178]. Глутатион-редуктаза защищает против оксидативного стрессора путем поддержания пула редуцированного глутатиона, который в свою очередь может поддержать в редуцированном состоянии клеточные белки. Есть мнение, что глутатион-редуктаза принимает участие в защите от оксидативного стрессора эукариот и грамотрицательных бактерий.

Показана также роль этого фермента у грамположительных бактерий *S.thermophilus* CNRZ 368 [226]. Проведено клонирование и дана характеристика *gor*-гена этих бактерий, кодирующего глутатион-редуктазу. Ее аминокислотная последовательность частично подобна аминокислотной последовательности глутатион-редуктаз других микроорганизмов. Например, 62 % аминокислот идентичны аминокислотам белка *E.coli*. Современный анализ подтверждает, что этот ген экспрессируется у аэробно растущих клеток. Алкил-редуктаза конвертирует гидроперекиси липидов, образовавшиеся в результате повреждения перекисью водорода, в нетоксичные спирты.

Уже отмечалось, что перекись водорода в присутствии железа способствует нарастанию чрезвычайно активного гидроксил-радикала (OH^{\cdot}) [123]. Как сенсор внутриклеточного железа *Fur*-белок помогает поддерживать баланс между концентрациями внутриклеточного железа, супероксида и образованием перекиси водорода. *Fur*-репрессия минимизирует потребление железа в условиях его избытка и тормозит образование перекиси водорода (и таким образом OH^{\cdot}) путем репрессии *sodA*. В противоположность этому в процессе голодания по железу,

когда уровни FeSOD низки, дерепрессия MnSOD защищает клетку от оксидативного повреждения. Хотя эти данные были получены на *E.coli*, нечто подобное, по-видимому, имеет место и у *S.typhimurium*.

Мутационный анализ редокс-чувствительного транскрипционного регулятора OxyR позволил выявить область, важную для окисления и транскрипционной активации [176]. Все мутации были локализованы в С-концевой половине белка, а 4 мутации — вблизи критического С-199 остатка. Как *in vivo*, так *in vitro* транскрипционные эксперименты показали, что конститутивные мутантные белки были в состоянии активировать транскрипцию и в условиях окисления, и в условиях восстановления. Эта активация необходима для проявления способности мутантных белков индуцировать связывание РНК-полимеразы.

Фаза экспоненциального роста *E.coli* в аэробных условиях связана с риском возникновения эндогенного оксидативного стресса в связи с возможным 10-кратным нарастанием скорости образования H_2O_2

Изучена регуляция внутриклеточной концентрации H_2O_2 у аэробно растущих *E.coli* [134]. Штамм JC 3821 *E.coli* может быть использован для обнаружения SOS-зависимого мутагенеза, индуцированного химическими оксидантами [77].

Изучено действие оксидативных агентов на рост и индукцию стрессорных белков у *E.coli* K-12 [182]. Обработка экспоненциально растущих культур 273 мкМ кадмия, 2 мМ перекиси водорода, 0,1 мМ гидропероксида третичного бутила, 0,1 мМ гидропероксида кумена, 0,005 мМ перуксусной кислоты обусловливали полное ингибирование роста, которое длилось около 1 ч, после чего клетки восстанавливались, а рост сопровождался изменением скорости синтеза большого числа белков. Во время остановки роста (arrested phase) каждый стрессорный фактор представляет собой уникальный сигнал оксидативного стрессора. Он индуцирует синтез набора специфических белков, некоторые из которых могут быть индуцированы более чем одним оксидативным стрессором. Обнаружены 2 субгруппы белков. Одна из них синтезируется непосредственно после начала добавления стрессора, а другая через 2,5 ч после добавления оксидативного агента. Экспоненциально растущие клетки *E.coli* были более устойчивыми к высоким концентрациям оксидативных агентов, чем клетки лаг-фазы. Иными словами, действие оксидативных агентов зависит от фазы роста, при которой был индуцирован стресс. Обсуждается роль синтеза белков, индуцированного оксидативными агентами, в механизме адаптации клеток [182].

4.2. Ответ на оксидативный стрессор у патогенных и непатогенных микобактерий

Для выживания в макрофагах патогенные микобактерии должны иметь механизм защиты от стрессорного действия токсичного кислорода [267]. OxyR-белок грамотрицательных бактерий — необходимый компонент ответа на оксидативный стрессор, одновременно является сенсором РФК и транскрипционным активатором, включающим экспрессию летоксицирующих ферментов, таких как каталаза, гидропероксидаза и алкил-гидропероксидаза. Есть характеристики ответов различных микобактерий на перекись водорода как на фенотипическом уровне, так и на уровне генной и белковой экспрессии. Показано, что только непатогенные бактерии *M.smegmatis* индуцируют протективный ответ на оксидативный стрессор, аналогичный OxyR ответу грамотрицательных бактерий. В аналогичных условиях патогенные микобактерии обнаруживают ограниченный, непротективный ответ, который в случае с *M.tuberculosis* был ограничен индукцией единственного белка Kat G. Определена последовательность нуклеотидов ДНК, гомологичная области OxyR и ahpC из *M.tuberculosis* и *M.avium*. В то время как OxyR *M.avium* оставалась неповрежденной, OxyR гомология *M.tuberculosis* имела многочисленные делеции и повреждения и являлась, вероятно, нефункциональной. Ответ патогенных микобактерий на оксидативный стрессор значительно отличался от индуцированного oxyR ответа других бактерий [267].

Изучены молекулярные основы чувствительности *M.tuberculosis* к изониазиду. Известно, что *M.tuberculosis* — природный мутант по OxyR — главному регулятору ответа на оксидативный стрессор. ahpC-ген кодирует у бактерий алкил-гидропероксид-редуктазу — одну из мишней, обычно контролируемую OxyR. Инактивация этого гена у штаммов микобактерий приводит к значительному нарастанию их чувствительности к изониазиду. Отсюда следует, что AhpC-белок нейтрализует действие изониазида и что, изменяя уровень его экспрессии, можно управлять чувствительностью микобактерий к этому противотуберкулезному препарату [103, 314].

4.3. Оксидативный стресс у анаэробов *B.fragilis*

Многие исследования показали, что разные анаэробы обладают различной чувствительностью к кислороду — от высокой чувствительности до высокой толерантности, т.е. свойства сохранять жизнеспособность в присутствии кислорода в течение длительного времени. Отсутствие протективного механизма защиты от РФК у многих анаэробных бактерий объясняет их чувствительность к кислороду [245]. Есть предположения, что

для некоторых анаэробных бактерий, как и для аэробных микроорганизмов, присутствие СОД и каталазы играет роль в детоксикации РФК. Среди анаэробных бактерий оппортунистический патоген *B.fragilis* является одним из наиболее аэротolerантных. Эта аэротolerантность может быть важным фактором вирулентности, что подтверждается данными, полученными на клинических изолятах. Они были более устойчивыми к кислороду, чем фекальные штаммы. Клинические изоляты выживали в присутствии кислорода 48–72 ч, а фекальные штаммы погибали после 4-часовой экспозиции. Эти результаты указывают, что есть системы, непосредственно связанные с толерантностью к РФК, т.е. к оксидативному стрессору. Так, *B.fragilis*, обработанные сублетальными концентрациями H_2O_2 или O_2^- , были более устойчивыми к летальным концентрациям пероксида, чем необработанные клетки. Этот ответ включает и СОД, и каталазу, которые были индуцированы РФК у *B.fragilis*. Затем при обработке УФ-лучами, кислородом или H_2O_2 была обнаружена индукция синтеза у *B.fragilis* 3, 6 и 4 белков соответственно [245].

Известны и другие системы, которые также могут иметь значение. К ним относится, например, продукция белка ферритина, который может снижать токсичность железа в присутствии кислорода [244]. Однако есть неясности в информации об общем физиологическом действии сдвига *B.fragilis* от анаэробных к аэробным условиям. Так, было бы упрощением предположить, что одно только присутствие РФК-ферментов ответственно за толерантность анаэробных бактерий к кислороду. Изучен механизм защиты *B.fragilis* от токсического действия кислорода и H_2O_2 .

На этой модели также показано, что и H_2O_2 , и кислород являются стрессорами, вызывающими специфический частично совпадающий ответ. Установлено, что выживание *B.fragilis* в присутствии кислорода зависит от способности бактерий синтезировать новые белки, что определено с помощью ингибирования белкового синтеза. Белковый профиль этих бактерий значительно изменялся после сдвига от анаэробных к аэробным условиям или после добавления экзогенной перекиси водорода в качестве оксидативного стрессора. В ответ на действие этого стрессора происходил синтез 28 новых белков, которые различались по величине рН (от 5,1 до 7,2) и по мол. м. (от 12 до 79 кД). Ответ на перекись водорода и кислород был подобным, но не идентичным. Одиннадцать из белков, синтезируемых в ответ на оксидативный стрессор, были близки по величине рН и мол.м. от 5,1 до 5,8 и от 17 до 23 кД соответственно [245].

Для изучения роли одного из индуцированных белков — каталазы был сконструирован каталазо-дефицитный мутант — katB⁻. Он оказался более чувствительным к летальному дейст-

вию перекиси водорода, чем родительский штамм, при добавлении в среду бириридила — хелатора железа. Это показывает, что присутствие ионов железа в анаэробной культуральной среде усиливает токсичность перекиси водорода и что функционирующая каталаза важна для выживания в присутствии перекиси водорода. При обработке культур сублетальными концентрациями перекиси водорода была индуцирована устойчивость к высоким концентрациям перекиси водорода у родительского штамма. Это доказывает, что ответ был индуцируемым. Была подтверждена полная потеря выживаемости культур (предварительно, перед действием сублетальных концентраций пероксида), обработанных хлорамфениколом — ингибитором синтеза белка.

В противоположность этому выживаемость сохранялась, если ингибирование синтеза белка следовало за обработкой пероксидом. Показано также, что каталаза (*katB*) может играть роль в устойчивости к оксидативному стрессору и у аэротолерантных анаэробных бактерий [245].

Установлена регуляция *B.fragilis* *katB* мРНК с помощью оксидативного стрессора и лимита углеродного субстрата [206]. Уровень *katB* нарастал более чем в 15 раз, когда культуры середины экспоненциальной фазы подвергались воздействию O_2 или перекиси водорода. В анаэробных условиях уровень *katB* мРНК, достигая максимума экспрессии в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазе, снижался в стационарной фазе. В анаэробных условиях экспрессия *katB* мРНК была репрессирована глюкозой и в меньшей степени ксилозой. Однако глюкозная репрессия полностью исчезала после действия кислорода. Неферментируемые источники углерода — фумарат, сукцинат, ацетат и пируват — не оказывали заметного действия. Лимит фосфора, азота и гемина также не действовал на экспрессию *katB* мРНК.

Итак, контроль экспрессии *katB* ограничивался источниками углерода и энергии и не включал другие виды лимита питания [246]. Показано, что и при оксидативном стрессе, и при лимите углерода и энергии *katB* использует ту же самую область промотора, но инициирование транскрипции имеет место в 2 различных нуклеотидах, разделенных по 2 или 3 основаниям. Последовательность, представленная в *katB* регуляторной области, наблюдается также в генах СОД *B.fragilis*. Возможно, что это позволит установить сайт белков, связанных с ДНК, включенных в регуляцию генов оксидативного стресса у этого микроорганизма.

|| *Изложенные материалы свидетельствуют о значении влияния на бактерии одного из важных видов средовых воздействий — оксидативных стрессоров, обуславливающих состояние стрес-*

са. К ним относятся реактивные формы кислорода, которые образуются как следствие перехода электронов от кислорода к воде (супероксид анион O_2^- и перекись водорода — H_2O_2) и в результате взаимодействия перекиси водорода с ионами металлов — гидроксилрадикал (OH). Эти стрессоры вызывают повреждения ДНК, РНК, белков и клеточных мембран. Описаны эффективные механизмы защиты бактерий от оксидативных повреждений на уровне генома, включающие синтез дополнительных белков — ферментов.

Глава 5

Кислотный стресс у бактерий

Способность выживать в кислой среде важна для сохранения вида. Некоторые микроорганизмы (ацидофильные) предпочтуют экологическую нишу с очень низким pH. Для других необходимы оптимальные значения pH, близкие к нейтральному. Последние, попадая в кислую среду, вырабатывают стратегию выживания, при этом у них развивается состояние кислотного стресса, характеризующееся многочисленными изменениями в экспрессии различных белков и многими событиями на уровне генной регуляции. Наиболее заметным для исследователя звеном в этой цепи является толерантность к кислоте. Поэтому в литературе вместо термина “кислотный стресс” чаще используют термин “acid tolerance respons” (ATR) — “кислотная толерантность”.

В данной главе приводятся результаты многочисленных исследований последних лет, посвященных кислотному стрессу у различных бактерий.

5.1. Кислотный стресс у эшерихий

При кислотном стрессе у *E.coli* обнаруживается способность клеток выживать при низком pH, т.е. толерантность к кислоте.

Способность *E.coli* выживать при низком pH обусловлена средовыми факторами, входящими в состав питательной среды, и фазой роста. Влияние короткоцепочечных жирных кислот, таких как ацетат, пропионат и бутират, при нейтральном или близких к нейтральному значениях pH приводит к нарастанию способности *E.coli* выживать в кислоте. Изучены основы кислотной толерантности *E.coli* 0157:H7 и показано, что экспрессия генов изменяется под воздействием ацетата [58]. Экспрессия 60 генов снижается по крайней мере в 2 раза. Экспрессия 26 генов нарастает в 2 и более раз, включая 6 генов,

продукты которых известны как необходимые для выживания при низком pH. Членами *E.coli* гроS-регулона являются 5 из этих генов. Известно, что гроS- σ фактор, необходимый для толерантности к кислоте, индуцируется в процессе роста при нелетальных низких значениях pH или в начале стационарной фазы роста. Разрушение гроS-регулона путем мутации приводит к исключению индуцированной ацетатом кислотной толерантности. Обработка или хлористым натрием, или ацетатом натрия (pH 7,0) приводит к нарастанию экспрессии гроS. Однако только обработка ацетатом увеличивает выживаемость бактерий в кислой среде.

Показано, что кислотный стрессор, холодовой стрессор и лимит субстрата оказывают влияние на постстрессорное поведение *E.coli* 0157:H7 и непатогенных *E.coli* и определяют устойчивость к высокой температуре и к замораживанию-оттаиванию, т.е. к +56 °C и к замораживанию-оттаиванию при -20 °C — +21 °C [185]. Устойчивость к высокой температуре и к замораживанию и оттаиванию нарастала после адаптации к кислоте и лимиту субстрата. После холодового шока устойчивость к высокой температуре снижалась, в то время как устойчивость к замораживанию-оттаиванию нарастала. Устойчивость к высокой температуре и замораживанию-оттаиванию гроS-мутанта была выше только после адаптации к кислоте.

Выживание нетоксигенного изолята *E.coli* 0157:H7 при низком pH (pH 3,0) изучалось в течение длительного периода времени [168]. Рассматривались 3 типа популяций: клетки экспоненциальной фазы, клетки стационарной фазы и клетки экспоненциальной фазы, адаптированные к кислоте. В каждой из этих популяций к 24 ч инкубации при pH 3,0 сохранялось приблизительно $5 \cdot 10^4$ кл/мл. Даже после 3 дней инкубации в этих условиях в каждом типе популяций сохранялись живые клетки. Высокий уровень толерантности к кислоте у этих клеток быстро снижался после помещения их в обычные условия. Это свидетельствует, что они не были мутантами.

Известно увеличение толерантности к различным вторичным стрессорам у бактериальных клеток *E.coli*, адаптированных к кислоте. Проведено сравнительное изучение клеток, устойчивых к нагреванию и адаптированных к кислоте. У *E.coli* штамма 0157:H7, а также двух других штаммов этого микробы определено число клеток, выживших после тепловой обработки при 52, 54 и 56 °C в триптиказо-соевом бульоне (pH 7,2) в течение 0, 10, 20 или 30 мин. Подтверждена необычная толерантность *E.coli* 0157:H7 штамма E0139 к нагреванию. Авторы наблюдали, что клетки, адаптированные к кислоте, были устойчивыми и к нагреванию, и к кислоте.

Изучено влияние кислотной толерантности на выживание, рост и перекрестную защиту от термального стрессора *E.coli* 0157:H7 в кислой среде и во фруктовых соках [254]. Обнару-

жена экстраординарная толерантность микроба к низкому рН в яблочном и апельсиновом соках в условиях от 5 до 25 °C в течение 42 дней. Установлено, что толерантность к нагреванию может быть значительно увеличена у клеток, адаптированных к кислоте.

Получена рН-зависимая толерантность к кислоте клеток стационарной фазы роста энтерогеморрагических *E.coli* в присутствии различных окислителей [85]. Девять штаммов *E.coli* выращивали отдельно в течение 18 ч при 37 °C в триптиказосоевом бульоне, содержащем 1 % декстрозы, и в триптиказосоевом бульоне без декстрозы, для того чтобы получить резистентность к кислоте, индуцированную и неиндуцированную кислотой, у клеток стационарной фазы роста. Эти культуры были затем инокулированы в сердечно-мозговой бульон с добавлением 0,5 % лимонной, молочной или уксусной кислот и при поддержании рН на уровне 3,0 при помощи соляной кислоты. Выращивание проводили при 37 °C в течение 7 ч с отбором проб в 0, 2, 5 и 7 ч. Эти пробы засевались на чашки с агаром для подсчета колониообразующих единиц. Результаты сравнивались с данными, полученными в опытах с одной соляной кислотой. Устойчивость к кислоте значительно варьировалась среди этих изолятов. Она зависела от штамма, окислителя и индукции рН-зависимой кислотной устойчивости, которая увеличивала кислотную толерантность клеток стационарной фазы.

Был получен мутант FRIK 479910 *dps::nptI* *E.coli* 0157:H7 [91]. Его выживаемость в HCl (синтетическая желудочная жидкость, рН 1,8) и в перекиси водорода (15 mM) изучена в сравнении с родительским штаммом. Выживаемость этого мутанта, взятого в экспоненциальной фазе (5 ч культивирования), после 3-часовой экспозиции в кислотной среде была значительно ниже по сравнению с выживаемостью родительского штамма. Выживаемость клеток мутанта ранней стационарной фазы роста (12-часовая культура) была снижена по сравнению с родительским штаммом в 2 раза. Никаких различий в выживаемости клеток поздней стационарной фазы роста (24-часовая культура) между родительским штаммом и мутантным обнаружено не было. Снижение выживаемости мутанта, лишенного *dps*, в условиях действия кислотного или оксидативного стрессоров по сравнению с родительским штаммом свидетельствует о роли белка DpS в защите от указанных стрессоров.

5.2. Участие внеклеточных компонентов в ответе на кислотный стрессор

Известны исследования закономерностей образования и действия внеклеточных протекторных соединений, образуемых *E.coli* в условиях действия тетрациклина и теплового шока [35,

36, 37, 38]. В данном разделе приведены работы, посвященные участию внеклеточных компонентов в ответе *E.coli* на кислотный стрессор.

Кислотная толерантность *E.coli* связана с секрецией в культуральную жидкость компонентов (скорее всего белков), которые изменяют кислотную толерантность других культур [249]. Это подтверждается следующими данными. Фильтраты культуральной жидкости культур, обладающих кислотной толерантностью, при некоторых условиях изменяют культуры, растущие при pH 7,0 и делают их толерантными к кислоте. Во многих случаях для этого были необходимы белки этих фильтратов. Фильтраты культур, у которых произошла индукция чувствительности при щелочном pH, передают чувствительность к резистентным культурам. Фильтраты культур, имеющих генетически детерминированную толерантность или чувствительность, изменяют чувствительность или толерантность нормальных штаммов. Во многих случаях компоненты фильтратов были необходимы для первоначального ответа, т.е. ответа, обычно наблюдаемого при pH 5,0.

Внеклеточные компоненты могут функционировать как посредники в процессе приобретения толерантности к стрессору. Таким образом установлено, что внеклеточные белки и другие компоненты являются облигатными посредниками в индукции толерантности и чувствительности к кислоте у *E.coli* [249].

Показано, что индукция внеклеточного компонента, необходимого для обеспечения кислотной толерантности *E.coli* при pH 5,0, происходит из внеклеточного предшественника, который чувствителен к кислотному стрессору и активируется (образует внеклеточный компонент) с помощью этого стрессора [251]. Предшественник, который представляет собой термостабильный белок, образуется клетками, не подвергнутыми действию кислотного стрессора. Он присутствует в культуральной среде после роста при pH от 7,0 до 9,0. Его чувствительные к стрессору молекулы активируются для образования внеклеточного компонента при pH от 4,5 до 6,0. Но этот компонент не образуется при pH выше 6,5 и при значительно более низком pH 2,0. Обнаружено, что кислотно-стрессорный сенсор присутствует в среде в больших концентрациях, чем в клетках. Он обеспечивает более быстрый ответ на кислотный стрессор.

Установлено, что внеклеточный чувствительный к стрессору белок активируется путем нагревания, действия ультрафиолетовых лучей и слабой кислотностью [250]. Активация обусловлена белком, индуцируемым кислотным стрессором. В процессе роста *E.coli* в бульоне при pH 5,0 в среде появляется внеклеточный белок, называемый внеклеточным индуцируемым компонентом, который необходим для индукции толерантности к кислоте. Показано, что этот компонент образуется из

внеклеточного предшественника, который обнаруживается в течение роста при pH 7,0, и что эта конверсия имеет место при pH 5,0 (и при других мягких кислотных значениях pH) в отсутствии микроорганизмов. Предшественник образуется клетками, не подвергнутыми действию стрессора, а также клетками в состоянии стресса, а затем конвертирует во внеклеточно индуцируемый компонент, который обуславливает толерантность. Этот предшественник может рассматриваться как стрессорный сенсор. Внеклеточно индуцируемый компонент, образованный при pH 5,0, был инактивирован при pH 9,0.

Эта инактивация, вероятно, включает конверсию к предшественнику. И мягкая тепловая обработка (экспозиция при 40—55 °C), и ультрафиолетовая радиация также активируют предшественник. Компонент, индуцированный при мягкой тепловой обработке, был инактивирован при pH 9,0, и поэтому авторы считают, что он подобен внеклеточно индуцируемому компоненту, образующемуся при кислом pH. В противоположность этому внеклеточно образующийся компонент, продуцируемый при ультрафиолетовой радиации, не был инактивирован при pH 9,0.

Это подтверждает, что есть разница в путях образования внеклеточно индуцируемых компонентов, полученных из предшественника с помощью кислотного стрессора и тепловой обработки. Очевидно, есть много факторов, вызывающих толерантность к стрессору. Они включают функционирующие внеклеточные сенсоры, подобные компонентам, которые обнаружены при развитии толерантности к кислоте, индуцируемой при pH 7,0 с помощью глюкозы, L-аспартата и L-глутамата. Внеклеточные стимулирующие сенсоры также могут быть необходимыми для индукции ответа на другие стрессоры.

E.coli становится более толерантной к кислоте после инкубации в течение 60 мин в среде, содержащей L-глутамат при pH 7,0—7,5 или 8,5 [252]. Несколько агентов, включая хлористый натрий, сахарозу и др., сохраняют стабильную толерантность к кислоте, появившуюся в присутствии L-глутамата. Индукция толерантности к кислоте с помощью L-глутамата связана с накоплением в культуральной среде белка (или белков), который изменяет pH культуральной жидкости, что приводит к кислотной толерантности. Толерантность, индуцированная L-глутаматом, зависит от этих компонентов. Кислотная толерантность была также индуцирована при помощи L-аспартата при pH 7,0.

Индукция этой толерантности также зависела от внеклеточного белка (или белков). Процессы индукции толерантности к кислоте с помощью L-глутамата и L-аспартата являются примерами индукции толерантности к стрессорам, которые отличаются от многих индукций участием внеклеточных компонентов.

Штаммы энтерогеморрагических *E.coli* серотипа 0157:H7 продуцируют в условиях действия стрессора большое количество экзополисахарида, состоящего из колановой кислоты (*solanic acid*). Изучена связь продукции экзополисахарида с выживаемостью бактерий во вредных условиях [199]. Для этого был получен мутант M4020, который в отличие от родительского штамма *E.coli* 0157:H7 W6-13 не синтезировал экзополисахарид, что было определено на основе отношения уроновой кислоты к белку у клеток, растущих от 1 до 4 дней при 25 °C на минимальном агаре, содержащем глюкозу. В результате обработки стрессорами показано, что мутант обладал существенно меньшей толерантностью к кислоте (рН 4,5 и 5,5) и нагреванию (55 и 60 °C) по сравнению с родительским штаммом. Это указывает на протективную роль экзополисахарида в защите бактерий от средовых стрессоров, таких как кислота и нагревание.

5.3. Кислотный стресс у сальмонелл

S.typhimurium имеет несколько систем для выживания при низком рН [189] и для роста в кислой среде в экспоненциальной и в стационарной фазах. Минимальное значение рН для *S.typhimurium*, растущей в среде с глюкозой, — 4,3.

Это стартовое условие для аэробного роста малого инокулята при 37 °C. *S.typhimurium* могут адаптироваться и расти при низком рН и на плотной среде [158].

В дополнение к способности расти при рН 4,3 *S.typhimurium* может выживать при нескольких условиях кислотности (до рН 3,0). Известны 2 системы толерантности к кислоте (ATR) [117, 184]. Одна система характерна для экспоненциальной фазы роста клеток, другая — для стационарной фазы. Если в экспоненциальной фазе рост при нейтральном рН прерывается сдвигом рН до 4,0—4,5 (так называемый кислотный шок), происходит индукция 50 кислотно-шоковых белков (Asp_s), 29 из которых индуцируются только кислотой и обусловливают развитие кислотной толерантности к очень низким рН [118, 120]. В противоположность этому клетки в стационарной фазе при сдвиге рН до 4,3 синтезируют только 15 Asp_s , 4 из которых соответствуют также белкам экспоненциальной фазы, что может обеспечить устойчивость к низким рН.

Система, ответственная за толерантность к кислоте, в экспоненциальной фазе может быть обнаружена при росте в минимальной или в комплексной средах. Она не только защищает от низкого рН, но и улучшает действие слабых кислот на вирулентность. Обе системы обеспечивают синтез белков в период адаптации к кислотному стрессору, но не в процессе изменения кислотности [118, 184]. Несколько генов связано с кислотной толерантностью [118, 119, 122]. Регулон, ответствен-

ный за выживание в кислой среде, был идентифицирован путем выделения мутанта со сниженной толерантностью к динитрофенолу и низкому pH [122].

Альтернативный σ^S -фактор играет важную роль в кислотном стрессе клеток экспоненциальной фазы. Мутанты, дефектные по гену *rpoS*, хотя и способны временно индуцировать умеренную толерантность к кислоте, не могут обеспечить устойчивость к кислоте в той степени, как на это способен штамм *rpoS⁺*, который синтезирует 7 σ^S -зависимых кислотно-шоковых белков. Клетки, подвергнутые действию кислотного стрессора, проявляют заметную перекрестную защиту от теплового, оксидативного и осмотического стрессоров. Эта перекрестная защита также зависит от *rpoS*. В противоположность этому ни тепловой, ни осмотический стрессоры не могут индуцировать толерантность к кислоте. Таким образом, экспозиция в кислотной среде занимает уникальное место среди стрессоров, поскольку обеспечивает защиту против нескольких стрессоров. Это еще один путь включения общей защитной системы с помощью стрессоров, подобный голоданию. Тот факт, что кислотный шок индуцирует экспрессию *rpoS*, подтверждает это. Временные изменения pH в кислую сторону также ведут к значительным изменениям синтезов поринов внешней мембраны. При pH 5,8 синтез порина *OmpF* снижается, а синтез порина *OmpC* увеличивается [117, 121, 127].

Авторы сравнивают современное представление о системах толерантности к кислоте (pH 3,0) у сальмонелл и значительно более эффективную систему устойчивости к кислоте (pH 2,0) у эшерихий [59]. Суть заключается в том, как в ответ на pH-стрессор у сальмонелл происходит индукция синтеза белков кислотного шока, которые защищают клетки от кислоты и других средовых стрессоров. Наиболее значительными регуляторами ответа на pH-стрессор являются белки *RpoS*, *Fur*, *PhoP* и *OmpR*. У эшерихий есть системы устойчивости к кислоте, которых нет у сальмонелл и которые позволяют эшерихиям выживать при экстремальном pH 2,0.

Экспозиция в короткоцепочечных жирных кислотах является одним из стрессоров для *S.typhimurium*, поскольку они находятся в больших количествах в желудочно-кишечном тракте хозяина. Изучена устойчивость *S.typhimurium* к короткоцепочечным жирным кислотам для определения роли этих кислот в патогенезе инфекции [177]. Определен процент выживших *S.typhimurium* при pH 3,0 после экспозиции в короткоцепочечных жирных кислотах в течение часа при этом pH. Этот процент зависит от вида и концентрации короткоцепочечных жирных кислот. Он составлял 42 после экспозиции в 100 мМ пропионата при pH 7,0 в аэробных условиях культивирования и менее 1 — без экспозиции. Процент выживших клеток повышался до 64 в анаэробных условиях, до 138 при снижении

pH до 5,0 и при увеличении времени инкубации до 4 ч экспозиции в пропионовой кислоте — до 165 %. Блокирование белкового синтеза хлорамфениколом снижало в этих условиях число выживших микроорганизмов до 1 %. Это свидетельствует о необходимости синтеза определенных белков для обеспечения устойчивости к пропионовой кислоте.

Есть данные о том, что вирулентность *S.typhimurium* может быть повышена за счет нарастания резистентности путем экспозиции в короткоцепочечных жирных кислотах в процессе их жизненного цикла, а также в анаэробных условиях, при низком pH и при увеличении экспозиции.

Показано, что индуцируемая низким pH PhoPQ-зависимая кислотная толерантность защищает *S.typhimurium* от неорганического кислотного стрессора [64]. Толерантность к кислоте позволяет *S.typhimurium* выживать в потенциально летальной кислой среде. Кислотный стрессор в типичном случае обуславливает толерантность к кислоте (клетки экспоненциальной фазы в минимальной среде, содержащей глюкозу). Это наблюдалось в сравнительных опытах при использовании неорганических кислот (при низком pH) и органических кислот. Раздельное изучение влияния органического и неорганического стрессоров доказало, что регуляторы σ^{38} (RpoS), Fur и Ada играют главную роль в толерантности к органическим кислотам и мало влияют на толерантность к неорганическим кислотам. Двухкомпонентная регуляторная система PhoP (идентифицированная как acid shock protein ASP29) и PhoQ обеспечивают толерантность к неорганическому стрессору, но слабо защищают от органических кислот. PhoP-мутанты теряют способность индуцировать 4 кислотно-шоковых белка, что подтверждает роль этого регулятора в толерантности к кислоте. Индукция кислотного стресса происходит на уровне транскрипции. Для этого необходима PhoPQ-система. Эта индукция происходит даже в присутствии высоких концентраций магnezии, ионы которой обеспечивают чувствительность посредством pHoQ. Полученные результаты подтверждают, что PhoQ может обеспечивать чувствительность к Mg_2^+ и pH. Поскольку phoP-мутанты авирулентны, низкий pH, активирующий эту систему, имеет большое значение для патогенности *S.typhimurium*. Включение 4 регуляторов, 2 из которых важны для вирулентности, подчеркивает связь вирулентности бактерий с толерантностью к кислоте.

Обнаружено, что гроS-зависимый локус stiA кодирует нитратредуктазу, необходимую для термотолерантности, обусловленной голоданием по углероду, и кислотной толерантности *S.typhimurium* [281]. Голодание как стресс, обусловленный лимитом субстрата, у *S.typhimurium* включает продукты генов, необходимые для предотвращения голодания, для выживания бактерий и вирулентности. Идентифицированы многие генные

локусы, индуцируемые при лимите источника углерода. Они необходимы для выживания при длительном голодании. Голодание защищает клетки не только от вредного действия лимита субстрата, но также обеспечивает перекрестную резистентность от других средовых стрессоров, например термального (55 °C) или кислотного (рН от 2,0 до 8,0). Ген *stiA*, индуцируемый голоданием по углероду, относится к σ -зависимому локусу, к которому также относятся гены, ответственные за голодание по азоту и фосфору и отравление перекисью водорода.

5.4. Кислотный стресс у листерий

Изучены физиологические и биохимические аспекты выживаемости *L.monocytogenes* в условиях действия кислотного стрессора [229].

Физиологический ответ бактерий на действие кислотного стрессора коррелирует с синтезом белков *L.monocytogenes*, растущих в химически определенной синтетической питательной среде. Этот рост в значительной степени зависит от pH среды. Он снижается, когда снижается pH, и останавливается при pH 4,0.

При pH ниже 4,0 бактерии начинают отмирать. Если бактерии адаптировать к средним сублетальным pH перед экспозицией при летальных значениях pH, они лучше переносят этот стрессор. Однако длительная обработка средними pH приводит к большей чувствительности бактерий к сублетальным pH. Органические летучие кислоты оказывают большее влияние на *L.monocytogenes*, чем неорганические кислоты. Приобретенная кислотная толерантность сохраняется в течение нескольких недель при 4 °C. Кислотный стресс связан с синтезом бактериальных белков. Эти белки, индуцированные кислотой, были выделены с помощью двумерного электрофореза и подвергнуты компьютерному анализу. Полученные результаты свидетельствуют, что при кислотном стрессе происходит синтез определенного количества белков, а также дополнительных белков, индуцированных кислотой, необходимых для защиты бактерий от действия нескольких кислотных стрессоров.

Аналогичные данные получены и другими исследователями [230]. Они изучали кислотный стресс и синтез белков у *L.monocytogenes*. Показано, что граница нижних значений pH, к которым эти бактерии устойчивы, зависит от штамма и вида используемой кислоты. Предварительная адаптация к средним pH увеличивала устойчивость бактерий к последующим летальным значениям pH. Кислотная толерантность также зависела от фазы роста. Органические летучие кислоты оказывали более повреждающий эффект, чем неорганические, потому что обеспечивали мягкие кислотные условия ниже уровня низких внутрицитоплазматических значений pH. Адаптация к кислоте

(при средних значениях pH) и кислотный стресс (при летальных кислых pH) сопровождались белковым синтезом, индуцированным кислотой. Установлено, что бактериям необходимы стрессорные белки, чтобы противостоять нескольким кислотным стрессорам. Эти индуцированные кислотой белки изучены с помощью двумерного электрофореза и идентифицированы по массе пептидов на основе масс-спектрометрии.

Мало известно о генах, принимающих участие в индукции кислотной толерантности у *L.monocytogenes*. Изучается роль FOF1-аденозинтрифосфатазного оперона *L.monocytogenes* в толерантности к кислотному стрессору [94].

Есть наблюдения, что глутамат значительно увеличивает выживание *L.monocytogenes* в содержимом желудка [93]. Этот феномен напрямую связан с глутаматдекарбоксилазной активностью (GAD). Глутамат-опосредованная кислотная толерантность может быть связана с GAD-системой и в кишечнике, где глутамат присутствует и превращается в гамма-аминобутират, который затем изменяет другой внеклеточный глутамат с помощью локализованного в мембране антиносителя. Молекулярный анализ *L.monocytogenes* L028 обнаружил присутствие двух гомологов глутаматдекарбоксилаз, обозначенных *gadA* и *gadB*, которые экспрессируются по-разному. Транскрипция гена *gadB* происходит в tandemе с геном *gadC*, который кодирует потенциальный носитель глутаматгамма-аминобутират. Его экспрессия регулируется в ответ на мягкий кислотный стрессор (pH 5,5). В противоположность этому *gadA* не индуцируется мягкой кислотной обработкой. Неполярная делеция мутантов вызывает значительное снижение уровня GAD-активности и сопутствующее снижение кислотной резистентности (повышение чувствительности) *L.monocytogenes* L028 как в стационарной, так и в экспоненциальной фазах роста культуры. Чрезмерная чувствительность *gadAB*-мутанта к желудочному содержимому свиньи и к синтетическому желудочному содержимому человека ясно показывает роль GAD-системы в облегчении выживания микроорганизма в желудке после заражения и в других условиях при низком pH. Более того, вариации уровней GAD-активностей между различными штаммами *L.monocytogenes* значимо зависят от уровней толерантности к содержимому желудка. Чувствительные штаммы *L.monocytogenes* EGD обнаруживают сниженные уровни GAD-активности. Это исследование свидетельствует, что экспрессия GAD у штаммов *L.monocytogenes* абсолютно необходима для выживания в условиях желудка.

С помощью полимеразной цепной реакции показано, что σ^B -мутанты менее устойчивы к кислоте, чем родительские исходные штаммы [299].

Установлено, что генетический локус *lisRK* кодирует двухкомпонентную регуляторную систему пищевого патогена

L.monocytogenes L028 [95]. После идентификации оперона кислотоустойчивого Tn917-мутанта этого штамма и разрушения гистидинкиназного компонента было обнаружено изменение его кислотной толерантности в зависимости от фазы роста.

5.5. Кислотный стресс у вибрионов

Изучено действие мягкой кислотной обработки на выживание и энтеропатогенность у *V.paraaemolyticus* — пищевого энтеропатогенного микроорганизма [309]. Для этого клетки экспоненциальной фазы, растущие при pH 7,5, подвергли действию pH 5,0 в течение 30 мин. После этого они приобретали устойчивость к действию pH 4,4. Двухфазная адаптация (pH 5,8 в течение 30 мин; pH 5,0 в течение 30 мин) оказалась лучше, чем однофазная процедура, для достижения кислотной толерантности этого микроорганизма. Клетки, адаптированные к кислоте, обладали перекрестной защитой от низкой солености и теплового стрессора. Одномерный электрофорез в полиакриламидном геле показал, что синтез белков с мол.м. 6,4; 9,0; 13,6; 16,3; 18,9; 22,9; 24,4; 28,3; 33,9; 36,9; 41,2; 47,6; 58,1; 65,6; 80,5; 88,2 и 96,9 кД был индуцирован или значительно увеличен. Синтез белков с мол.м. 25,3; 30,1; 30,7 и 91,7 кД был ингибиран. Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле обнаружил 20 белков, синтез которых был индуцирован или значительно увеличен, а 27 белков — ингибиран. Испытание энтеропатогенности адаптированных к кислоте клеток на новорожденных мышах показало значительное увеличение отношения массы кишечника к массе тела и наличие инфицированных микробом клеток макроорганизма.

Известно, что вирулентность *V.cholerae* возрастает, когда микроорганизм находится в состоянии кислотного стресса. Для этого состояния существенным является GadA — опосредованное декарбоксилирование лизина [205]. GadA-белок кодируется геном *GadA*, индуцируемым кислотой. Регуляция генов *V.cholerae*, необходимых для кислотной толерантности, происходит посредством члена ToxR-подобного семейства транскрипционных регуляторов. GadC — новый член этого семейства — значительно увеличивает аминокислотное и функциональное подобие GadC *E.coli*.

Показано, что *V.cholerae* подвергается действию кислой среды. В результате этого микроорганизм переходит в состояние стресса, для которого характерна толерантность к кислоте [206]. Она бывает двух видов: органическая и неорганическая. Для органической необходим транскрипционный регулятор ToxR, который не зависит от ToxT. Авторы изучили действие органического кислотного стрессора на белковые синтезы у *V.cholerae* и показали с помощью двухмерного гель-электрофореза, что в ответ на стрессор изменяется экспрессия более 100 поли-

пептидов. Показано также, что порин (белок внешней мембраны — OmpU) необходим для защиты микроба от органической кислотности. Изучено действие органической кислоты на транскрипцию генов *ompU* и *ompT*. Показано, что транскрипция *ompU* остается неизменной, а транскрипция *ompT* подавляется *ToxR* — независимым способом.

5.6. Кислотный стресс у стрептококков и стафилококков

Известно, что *S.mutans* — патоген, ассоциированный с карIESом. Определены его реакции на многие стрессоры и индукция общего и специфических стрессорных белков [286]. У *S.mutans* экспоненциальной фазы роста после сдвига pH от 7,5 до 5,5 наблюдается кислотный стресс, который увеличивает выживаемость микробы при pH 3,0. Изучен ответ *S.mutans* H7 на кислотный стрессор в сравнении с реакциями на соленость, нагревание, оксидативные воздействия и лимит субстрата. Показано, что предварительная индукция кислотной толерантности не дает перекрестной защиты клеток от последующих воздействий других стрессоров. Голодание в результате 5-кратного разведения среды, включающего 5-кратное снижение концентрации глюкозы в ней, увеличивает число выживших бактерий в 12 раз. Исключение глюкозы из 5-кратно разведенной среды приводит к 7-кратному нарастанию выживаемости по сравнению с контролем. Это указывает на взаимосвязь между кислотным стрессом и голоданием. Далее стресс был охарактеризован с помощью электрофореза белкового профиля клеток экспоненциальной фазы, подвергнутых действию различных стрессоров. Клетки этой фазы выращивали при pH 7,5 при температуре 37 °C, а затем инкубировали 30 мин в различных стрессорных условиях в присутствии аминокислот с ¹⁴C-меченным углеродом. После экстракции и выделения белка проводили анализ, используя двумерный электрофорез и ауторадиографию. Результаты показали, что при оксидативном стрессе увеличивался синтез 69 белков, из которых 15 были специфичными для оксидативного стресса. Синтез 49 белков при этом снижался до минимума. Разведение среды приводило к нарастанию продукции 58 белков, 11 из которых были специфичными для голодания. Синтез 20 белков при этом снижался. Продукция 52 и 40 белков увеличивалась после действия повышенной солености и теплового стрессора, а 10 и 6 из этих белков соответственно были специфичными для каждого из этих стрессоров. Таким образом, показано, что количество некоторых белков увеличивается в результате действия более чем одного, но не всех стрессоров. Синтез 6 белков увеличивается в результате действия всех 5 стрессоров. Они были классифицированы как главные стрессорные белки. Эти данные свидетельствуют, что *S.mutans* в ответ на различные стрес-

соры изменяет синтез белков для того, чтобы выжить в изменившихся условиях.

Способность *S.mutans* противостоять внезапному изменению pH рассматривается как важный фактор вирулентности этого микробы. Изучены Tn917-мутанты *S.mutans* штамма JH1005, чувствительные к кислоте [143]. Анализ показал, что транспозон одного из этих мутантов AS17, включенный в межгенной области между двумя генами *Set*-локуса, обеспечивает кислотную толерантность. Этот локус имеет высокую степень гомологии с соответствующим локусом *B subtilis* Ffh-ген *S.mutans* кодирует гомологию субъединицы 54 кД, распознающей сигнал и принимающей участие в устойчивости к кислотному стрессору.

Изучены индуцированные кислотой толерантность к кислоте и кислотогенность немутантных стрептококков [287]. Клетки немутантных стрептококков, выращиваемые при pH 7,0, после экспозиции в течение 30 мин при pH 4,0 выживали от 0,0088 до 71 %. Клетки мутантных стрептококков после такой же обработки выживали полностью (100 %). Отмытые клетки немутантных стрептококков снижали pH до 4,04—4,33 в присутствии глюкозы, мутантные клетки в тех же условиях — до 3,7.

Когда pH культуры был снижен до 5,5 в течение 30—90 мин, выживаемость немутантных стрептококков после действия pH 4,0 в течение 60 мин нарастала (от 0,25 до 91 %), а минимальное значение pH клеток в присутствии глюкозы снижалось (3,90—4,19). В это же время увеличивались толерантность и кислотогенность. Немутантные стрептококки увеличивали активность кислой АТФазы, аргининдиаминазы и количество стрессорных белков, перекрестно реагирующих с белками теплового шока Hsp60 и Hsp70.

Эти результаты показывают, что немутантные стрептококки способны увеличивать толерантность к кислоте и кислотогенность в ответ на закисление среды. Более того, это подчеркивает, что устойчивость к кислоте у немутантных стрептококков может включать индукцию кислой АТФазы, аргининдиаминазы и синтезы других стрессорных белков. Штаммы немутантных стрептококков являются бактериями, ответственными за образование пятен на зубах. Они могут играть значительную роль в подкислении среды в ротовой полости и, следовательно, создавать условия ее колонизации более кислотоустойчивыми бактериями, такими как мутантные стрептококки и лактобациллы.

Показано, что альтернативный σ-фактор *S.aureus* σ^B контролирует ответ на средовые стрессоры [90]. Его роль изучена в связи с реакцией на средовые стрессоры в процессе выживания микробы при голодании. Роль этого фактора в патогенности микробы выражена главным образом в стационарной фазе роста. При изучении устойчивости к стрессорам показано, что

σ -фактор принимает участие в защите от теплового шока при 54 °C, от кислоты и перекиси водорода, но не защищает от этанола и осмотических воздействий. *S.aureus* приобретает устойчивость к кислоте (рН 2,0) после предварительной инкубации при сублетальном рН 4,0.

Этот ответ также связан с σ -фактором. Кроме того, экспрессия этого фактора связана и с процессами, контролирующими детерминанты вирулентности.

5.7. Кислотный стресс у молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии полезны для оздоровления организма и поэтому часто используются в качестве пищевой добавки. В литературе есть противоречивые данные о механизме их действия. Многие из изучаемых микроорганизмов не охарактеризованы с точки зрения их кислотной толерантности, которая значительно различается у разных бактерий.

Из штаммов *L.acidophilus* выделены устойчивые к кислоте и желчи варианты и определен их фенотип [92]. Эти варианты получены с помощью селекции после экспозиции в соляной кислоте (от рН 3,5 до рН 7,0) и с желчными солями. Устойчивые к кислоте и желчи изоляты, сохранившие способность расти при рН 3,5 с 0,3 % желчи, были выделены и изучены. Они отличались стабильностью при замораживании, утилизировали лактозу, обладали протеазной и аминопептидазной активностями, имели плазмиды и жирные кислоты клеточной стенки. Эти данные свидетельствуют, что выделенные варианты, устойчивые к кислоте и желчи, имеют ростовые преимущества перед родительским штаммом в условиях действия стрессоров и поэтому могут рассматриваться как кандидаты пробиотических препаратов.

Определена индуцируемая низким рН и стационарной фазой толерантность к кислоте *L.acidophilus* CRL639 [195]. Установлено, что толерантность к кислоте у этих бактерий в стационарной фазе зависит от рН в процессе роста. В обычном процессе культивирования, когда конечное значение рН 4,5, клетки приобретали устойчивость к кислотному стрессору, однако клетки культур, в которых поддерживали рН на уровне 6,0, оставались чувствительными к кислоте. Изучение белкового профиля показало сверхэкспрессию в стационарной фазе 16 белков в мол.м. от 6,5 до 70,9 кД. В результате перехода в стационарную фазу как таковую 7 из этих белков (26,3; 41,1; 48,7; 49,3; 54,5; 56,1 и 70,9 кД) были экспрессированы, в то время как 9 белков (14,1; 18,6; 21,5; 26,9; 29,3; 41,9; 42,6; 49,6 и 56,2 кД) были индуцированы исключительно в результате сдвига рН-культуры в процессе свободного культивирования. Эти результаты показывают роль белкового синтеза в процессах адаптации клеток к изменяющимся условиям.

Изучены реакции *L.colinoides* на тепловой, кислотный и спиртовой стрессоры [181]. Проверена реакция и перекрестная защита *L.colinoides* после экспозиции микробы при высокой температуре в этаноле и в кислоте. Этanolовая и тепловая обработки клеток обеспечивали также их толерантность к кислоте. Не было обнаружено перекрестной устойчивости адаптированных к кислоте клеток против этанола и высокой температуры. Только предварительное нагревание приводило к перекрестной защите от двух других стрессоров. Изучение белкового состава показало, что каждая обработка вызывает индукцию синтеза ряда белков, которые являются общими более чем для одного воздействия. Наибольшая общность наблюдалась (10 общих белков) между реакциями на этанол и нагревание.

Рост *L.lactis* сопровождается синтезом молочной кислоты, что приводит к закислению среды и к остановке роста. Несмотря на ограничение роста при низком pH, очевидно, что *L.lactis* обладает индуцильными ответами на кислые pH. Чтобы охарактеризовать гены, включенные в реакцию на кислотный стрессор, авторы селекционировали устойчивые к кислоте мутанты *L.lactis* штамма MG1363 [234]. Получен 21 мутант, связанный с 18 различными локусами, некоторые из них включены в транспортные системы или в базовый метаболизм. Ни один из генов не был идентифицирован раньше как включенный в процесс приобретения кислотной толерантности этого микробы. Различные фенотипы, полученные с помощью кислотно-стрессорной селекции, позволили авторам определить 4 класса мутантов, 2 из которых были устойчивыми ко многим стрессорам. Результаты показали, что *L.lactis* имеет несколько механизмов защиты от низкого pH. По крайней мере один из этих механизмов защищает их и от многих других стрессоров. Внутриклеточные фосфаты и гуанин-нуклеотидный пул действуют как сигнал, который определяет уровень индукции стрессорного ответа *L.lactis*. Эти результаты показывают связь между физиологическим состоянием клетки и уровнем ее толерантности к стрессору. Они определяют условия регуляции ответа на кислотный стрессор.

5.8. Кислотный стресс у других бактерий

Изучен ответ внутриклеточного патогена *R.eque* на кислотный стрессор после фагоцитоза в макрофагах [65]. Дикий тип и его авирулентный, несущий плазмиду вариант приобретали нарастающую толерантность к кислоте в процессе экспоненциальной фазы после действия сублетальных доз кислотного стрессора. Максимальная адаптация наблюдалась у клеток, предварительно обработанных pH 5,0 в течение 90 мин. С помощью двухмерного гель-электрофореза изучены белки (кодируемые плазмидой), регулируемые кислым pH. Это позволило выявить

несколько мембранных и цитоплазматических белков с измененной экспрессией в фазе адаптации. Ни один из этих белков не был кодирован плазмидой. Однако, используя стратегию, основанную на экспрессии плазмидного гена, авторы показали, что 2 оперона, локализованные в вирулентной плазмиде штамма 85F, регулировались с помощью кислого рН с максимумом индукции при рН 5,0.

Авторы считают, что эти опероны могут играть важную роль в патогенности *R. equi*.

M. avium является патогеном для иммуносупрессированных пациентов, которые являются главным объектом для инфицирования этим возбудителем желудочно-кишечного тракта. Желудок представляет собой значительный барьер для патогенов. Способность бактерий противостоять экспозиции при рН ниже 3,0 обеспечивает их вирулентность. Показано, что *M. avium* противостоят экспозиции в кислотных условиях содержимого желудка [78]. Инкубация трех клинических изолятов *M. avium* при кислых рН обнаружила устойчивость этого микробы как экспоненциальной, так и стационарной фаз роста при рН 2,2 в течение 2 ч. Когда продолжительность инкубации при рН 2,2 увеличивалась до 24 ч, бактерии росли до стационарной фазы, имея значительно большую толерантность к кислоте, чем клетки экспоненциальной фазы. *M. avium*, инкубированные с кислотой в присутствии воды, были более устойчивыми к рН 2,2, чем в присутствии буфера. Предварительная адаптация в воде перед экспозицией в кислотных условиях также приводила к нарастанию устойчивости к рН 2,2.

Известно, что *R. tropici* infvv CLAT 899 имеет высокую степень толерантности к кислоте и поэтому был применен для изучения молекулярной основы бактериальных ответов на кислотный и другие средовые стрессоры [239]. Авторы собрали коллекцию мутантов, используя Tn5-lux AB-мутагенез. Один из мутантов обладал слабой способностью расти в кислой среде. Один из генов этого мутанта был подобен гену gshB *E. coli*, кодирующему фермент глутатион-сингтетазу. Показано, что пул внутриклеточного рН у мутанта ниже, чем у родительского штамма. Глутатион-дефицитный мутант обладал чувствительностью к слабым органическим кислотам, осмотическому и оксидативному стрессорам и к метилглиоксалу. Глутатион восстанавливал реакцию на эти стрессоры почти до уровня реакции родительского штамма.

Эти данные свидетельствуют, что *R. tropici* продуцируют глутатион, который необходим для роста в экстремальных условиях среды. Иными словами, в ответе на средовые стрессоры, включая кислотный стрессор, принимает участие глутатион.

Десять изолятов *Bradyrhizobium* sp., полученных из различных йогуртов, были проверены на их способность выживать в условиях действия стрессоров и расти при увеличении уровней

NaCl (1–8 % масса/объем), pH (4,0–10,0), CaCO_3 (1–10 % масса/объем) и в присутствии 12 антибиотиков [237]. Все изоляты были толерантны к концентрации NaCl до 5 %. Некоторые изоляты выживали и при более высокой концентрации NaCl . Все изоляты выживали при кислых pH (4,0–5,0), при щелочных условиях (pH 9,0–10,0) и при концентрации CaCO_3 до 10 % масса/объем. Устойчивость к антибиотикам не коррелировала с толерантностью к NaCl , pH или CaCO_3 .

Выживание бактерий в изменяющихся условиях среды зависит от их способности адаптироваться к стрессорам. Бактерии-пробиотики должны выживать в условиях действия кислотного стрессора в желудке, чтобы достичь кишечника, в котором им предстоит размножаться длительное время. *P.freudenreichii* полезны как в производстве сыра, так и как пробиотические продукты питания людей. Изучена адаптация к кислотному стрессору пробиотического штамма S141 *P.freudenreichii* [159]. Это исследование проводилось с использованием химически определенной среды. Предварительная экспозиция при pH 5,0 защищала от последующего воздействия pH 2,0.

Для достижения оптимальной толерантности к кислоте был необходим синтез новых белков. С помощью двумерного электрофореза в процессе адаптации обнаружены значительные изменения в экспрессии генов. Среди полипептидов с повышенной экспрессией в раннем периоде ответа на стрессор обнаружены ферменты, включенные в синтез и репарацию ДНК. В позднем периоде найдены универсальные шапероны *GroEL* и *GroES*. Основной характеристикой кислотного стресса явились изменения синтеза белков и морфологии *P.freudenreichii*.

Таким образом, на примерах многих видов и родов бактерий показано значение кислотного стресса для их выживания в той или иной экологической нише. Изложенное свидетельствует о том, что это состояние характеризуется глубокими изменениями в жизнедеятельности бактерий: увеличением синтеза одних белков, которые защищают их от повышенной кислотности и других стрессоров, и снижением синтеза других белков; экспрессией генов, включением регуляторных локусов и т.д.

Практическое значение кислотного стресса зависит от той роли, которую играют бактерии в жизни человека. Толерантность к кислоте помогает энтеропатогенным возбудителям преодолевать кислотный барьер желудка, чтобы достичь свою нишу в кишечнике и вызвать инфекционное заболевание. Аналогичный механизм позволяет бактериям-пробиотикам попадать в кишечник и там размножаться, обеспечивая выздоровление человека от дисбактериоза. Толерантность к кислоте позволяет бактериям полости рта выживать и размножаться

ся в своей экологической нише, вызывая кариес и поддерживая его развитие.

Эти сведения необходимо принимать во внимание в микробиологических исследованиях и в практической медицине.

Глава 6

Стресс у бактерий и вирулентность

В настоящее время значительно возрастает интерес исследователей к взаимоотношениям микроорганизмов с организмом хозяина [18, 21]. В связи с этим приобретает значение проблема стресса у бактерий [10, 11, 75, 123, 146, 224, 243, 248], синтеза ими стрессорных белков, по-видимому, играющих роль протекторов бактериальной клетки, а также, вероятно, имеющих значение в иммунологии в качестве протективных антигенов. Особое значение в этой проблеме имеет соотношение между стрессом у бактерий и их вирулентностью для макроорганизма [15].

6.1. Стресс у сальмонелл и вирулентность

Сальмонеллы вызывают многочисленные болезни животных и человека, включая гастроэнтериты, энтериты, тиф и бактериемию. Независимо от болезни все сальмонеллезные инфекции начинаются с инвазий (inv) эпителиальных клеток и/или клеток внешнего слоя пейеровых бляшек. Это делает сальмонеллы нечувствительными к гуморальному ответу и квалифицируется как стратегия выживания [123].

Контакт между бактериями и клетками хозяина приводит к синтезу тонких аппендицсов на клетках сальмонеллы [130]. Гены инвазии invA, invE, invG и локус C принимают участие в образовании аппендицсов. Область хромосомы *S.typhi* между 57 и 60 мин содержит много генов, необходимых для инвазии. В дополнение к inv-кластеру эта область содержит более 12 генов, называемых spa (surface presentation of antigens) [139]. Состояние активного роста имеет определенное влияние на эффективность инвазии. Условия роста, лимитированного кислородом, способствуют наилучшей инвазивности [107, 189, 257]. Лимит железа также играет роль в подготовке клетки к инвазии. Один или более связанных с мембраной белков, необходимых для инвазии, индуцируются в условиях избытка железа.

Инвазия стимулирует быстрое нарастание уровней свободного внутриклеточного кальция и является причиной реорганизации цитоскелета клетки хозяина [114, 130, 223]. После инвазии для вирулентности *S.typhimurium* существенно необ-

ходима внутриклеточная репликация. Идентифицированы несколько мутантов (определенных как *гер*), дефектных по внутриклеточной репликации (но не по инвазии), которые были аттенуированы для мышей [188].

Путем неизвестного механизма *S.typhimurium* продвигаются к базолатеральной стороне эпителиальных клеток, выходят и перемещаются к макрофагам и к полиморфно-ядерным лейкоцитам селезенки и печени. Способность микроорганизма выживать внутри клетки макрофага является потенциальным способом защиты от хозяина. Выживание внутри макрофага существенно для вирулентности *S.typhimurium*. Бактерии могут использовать два пути для проникновения в макрофаги: нормальный фагоцитоз и путь, описанный для эпителиальных клеток. Когда эти бактерии проникают в макрофаги, они попадают в специальные фагосомы-лизосомы, по величине достаточные для свободного плавания микробы [52]. Есть данные о том, что *S.typhimurium* в макрофагах подвергается влиянию оксидативного стрессора [124]. Этот стрессор действует на *S.typhimurium* внутри макрофагальных фаголизосом.

Идентифицированы многие гены, связанные с выживанием бактерий внутри макрофага [63, 70, 110, 190]. Некоторые из них известны — *htrA*, *purD*, *nagA* и *fliD*. Другие, обозначенные *ims* (*impaired macrophage survival*), охарактеризованы недостаточно.

Есть сведения о наличии разных популяций внутриклеточных *S.typhimurium*, находящихся в макрофагах [50]. Одна состоит из медленно растущих клеток, а другая — из клеток, растущих быстро. Быстро растущие клетки содержат равные количества L7 и L12 рибосомальных белков, а медленно растущие клетки имеют намного больше L7 (N-концевую ацилированную форму L12), чем L12.

Показано, что большинство клеток являются нерастущими, но жизнеспособными. Один из механизмов внутриклеточного выживания заключается в отсутствии роста, поскольку такие клетки могут быть более устойчивыми к различным средовым стрессорам.

Локус *mviA*, называемый локусом вирулентности для мышей (*mouse virulence genes*), регулирует вирулентность *S.typhimurium* в процессе инфекции *Ity^s* мышей [71]. Главный *in vivo* эффект действия этого локуса — рост *S.typhimurium*. Продуктом *mviA* гена является Mvi A-38-кД белок, обладающий заметной гомологией с семейством регуляторных транскрипционных белков. Регуляция вирулентности включает взаимодействие между MviA-белком и другими регуляторными белками. Mvi-система предопределяет связь вирулентности со скоростью роста *S.typhimurium* *in vivo*. Бактерии, которые могут расти более быстро *in vivo*, будут более вирулентными, чем медленно растущие клетки. Периплазматический белок 55-кД, экспрессия которого является MviA-зависимой, был иденти-

фицирован и обозначен как MviA (MviA-регуляторный белок). Вирулентность ассоциируется с присутствием этого белка.

Связь между стрессом и вирулентностью у *S.typhimurium* подтверждается также тем, что инактивация регуляторного гена теплового шока *htrA* приводит к образованию авирулентных мутантов [63].

Регуляция вирулентности у сальмонелл может осуществляться не только хромосомными, но и плазмидными генами. Несколько видов сальмонелл имеют плазмиды, обладающие высоким молекулярным весом. Эти плазмиды обусловливают системные заболевания [141]. Они располагают высококонсервативным сегментом, включающим 5 генов (*salmonella plasmid virulens genes spvR*) и 4 гена, составляющие *spv ABCD*-оперон [140, 174]. *Spv*-гены индуцируются внутри макрофагов, но для этого необходимы специфический макрофагальный индуцирующий сигнал или активация, которая осуществляется в ответ на многочисленные стрессоры, присутствующие в клетках [113, 238]. *Spv ABCD*-оперон индуцируется в процессе С-, Р-, N-голодания. При голодании, лимите железа и низком рН индуцируются также синтезы белков, кодируемых *spvR*-геном [282].

Плазмиды, несущие *spvR* и *spv ABCD*-гены, увеличивают скорость роста *S.typhimurium* в организме мыши по сравнению со скоростью роста штаммов, не несущих плазмиды [142, 241]. Регуляция *spv*-генов с помощью средовых стрессоров (голодание, низкий рН, лимит железа и др.) отражается на важных взаимоотношениях хозяина и паразита [141, 231]. Так, когда клетки хозяина пытаются предотвратить рост *S.typhimurium* внутри фаголизосомы, бактерии повышают свою выживаемость путем экспрессии белков, которые увеличивают скорость их роста.

Грамотрицательные бактерии, такие как *E.coli*, остаются метаболически активными и после того, как клетки стационарной фазы, физиологически изменяясь, приобретают общую устойчивость к средовым стрессорам [152, 243, 269]. Молекулярные механизмы этого ответа включают индукцию σ^S (также известного как σ^{38}) регулона. Свойственный стационарной фазе σ^S фактор кодируется *groS*-геном (также известным как *katF*) и регулирует транскрипцию многих генов стационарной фазы, некоторые из которых включают осмопротекцию, морфологию клеток, общую устойчивость к стрессорам или выживание в условиях голодания [75, 123, 146, 224, 243, 248]. Обнаружено, что более 30 белков регулируются прямо или косвенно (опосредованно) *groS*-геном и их число нарастает. Показано, что *groS*-ген, который кодирует синтез σ фактора РНК-полимеразы (σ^S), регулирует вирулентность *S.typhimurium* для мышей.

Подтверждено существование *groS*-аллерельных вариаций у сальмонелл и доказано, что *groS*-мутации могут быть идентифицированы и у *S.typhi* штамма Ту 21а [243]. Живая оральная

тифозная вакцина из этого штамма является гроS-мутантом. Она чувствительна к различным средовым стрессорам. Введение гроS-гена дикого типа в Ту 21а позволило бактериям лучше выживать в условиях голодания и увеличивать свою резистентность к другим стрессорам.

6.2. Стресс у нейссерий и вирулентность

Ученые все больше убеждаются в том, что экспрессия многих детерминант вирулентности патогенных бактерий контролируется условиями их роста, это дает возможность бактериям адаптироваться к изменяющимся условиям хозяина [98, 224]. К таким бактериям можно отнести и нейссерии, в том числе *N.gonorrhoeae* и *N.meningitidis*. Например, при росте гонококков в подкожных камерах у морских свинок бактерии более вирулентны и выживают лучше внутри лейкоцитов, чем *in vitro* (*vitro-grown counter parts*) [224]. Менингококки, растущие при лимите железа и низком pH, в 1200 раз более вирулентны, чем бактерии, выросшие в полноценной комплексной среде. Изменение вирулентности коррелирует с различными изменениями клеточной стенки бактерий, включая экспрессию белков внешней мембранных, регулируемых концентрациями железа или кислорода. Экспрессия этих белков не выражена, когда бактерии растут в комплексной среде. Присутствие антител, реагирующих с этими белками, регулируемыми условиями среды, в сыворотках больных гонореей указывает на то, что они экспрессируются в процессе естественной инфекции. Проведены идентификация и молекулярный анализ 63 кД стрессорного белка из *N.gonorrhoeae* [224].

При лимите глюкозы, кислорода или ионов железа (средовые стрессоры) нарастает экспрессия нескольких белков *N.gonorrhoeae*, включая белок 63 кД, идентифицированный с помощью ЭФ в ПААГ с DDS-Na. Этот гонококковый стрессорный белок (Gsp63) был обнаружен в цитозоле и выделен с помощью ацетата лития из внешней мембранны. Успешная очистка была осуществлена с помощью центрифугирования в градиенте сахара-розы и хроматографии на фенилсепарозе. Гель-фильтрация очищенного белка подтвердила, что его мол.м. приблизительно равна 450 000, т.е. белок состоял из 6–8 субъединиц. Иммуноблоттинг с использованием поликлональной антисыворотки против очищенного белка определил перекрестную реакцию с белком той же самой электрофоретической подвижности как Gsp63 с 8 гонококковыми изолятами. Оказалось, что N-концевая аминокислотная последовательность более чем на 65 % гомологична таковой Hsp60 семейства белков. Это свидетельствует о том, что Gsp63 связан с этой группой белков. Эта связь была в дальнейшем подтверждена иммунологическими перекрестными реакциями Gsp63 с микобактериальным Hsp60 [224].

6.3. Стесс у листерий и вирулентность

L.monocytogenes — грамположительные бактерии, широко распространены в природе. В процессе своей сапрофитной фазы существования у них развился быстрый молекулярный ответ, позволяющий выжить в условиях, требующих толерантности к высокой и низкой температурам, голоданию, изменяющимся pH и осмолярности, химическим стрессорам и в соревновании с другими микроорганизмами [248]. Как вирулентные микроорганизмы *L.monocytogenes* выживают и размножаются внутри большинства клеток хозяина, включая макрофаги, где они также приспособливаются к условиям. *L.monocytogenes* имеют механизм внутриклеточного выживания, который отличает их от других бактерий. Не разрушаясь в результате действия гидролитических ферментов внутри цитоплазмы макрофага, микроорганизмы затем переходят в фагосомы [101].

Изучен фенотипический ответ бактерий на фагоцитоз с помощью макрофагов [146]. После фагоцитоза *L.monocytogenes* макрофагальными клетками EGD J774-1 численность бактерий возрастила в 20 раз в течение 5 ч. На этой стадии фагоцитоза происходила селективная индукция 32 белков, что обнаруживалось с помощью двумерного гель-электрофореза. Были также изучены ответы на средовые стрессоры (тепловой и перекись водорода). Обнаружена индукция синтеза 14 БТШ и 13 белков оксидативного стресса соответственно. Общими для обоих видов стрессов оказались 5 из индуцированных белков. Аминокислотная последовательность, гомологичная таковой DnaK и GroEL *E.coli*, была обнаружена среди БТШ.

Есть данные о том, что инвазия и внутриклеточный рост *L.monocytogenes* зависят от продукции нескольких факторов вирулентности, включая интерналин, листериолизин О, фосфолипазы и ActA [266].

У внутриклеточных форм листерий появляется устойчивость к антимикробным факторам защиты клеток хозяина, т.е. к действию токсических форм кислорода, внутрифагосомному окислению и др. [213, 270]. Одним из главных событий для успешного выживания паразита является раннее разрушение мембранны фагосомы эукариотной клетки [75]. Этот процесс требует секреции листериолизина О и фосфолипаз [266].

Транскрипция генов вирулентности регулируется с помощью PrfA-транскрипционного активатора [204] в условиях действия стрессора [79, 186, 273]. В стрессорных условиях факультативный внутриклеточный паразит *L.monocytogenes* продуцирует ClpC АТФ, которая является общим стрессорным белком, кодируемым clpC-геном. Указанная АТФ принадлежит к Hsp-100/Clp семейству белков, к классу высококонсервативных белков, связанных с толерантностью к стрессору как прокариот, так и эукариот [135, 260]. ClpC АТФ, активизируя ранний

выход бактерий из фагосом макрофагов, увеличивает внутриклеточную выживаемость. ClpC — дефицитный мутант *L.monoctogenes*, полученный путем инактивации гена штамма L028, стал высокочувствительным к стрессорным условиям *in vitro*. Внутриклеточный рост этого мутанта был подавлен внутри макрофагов. Вирулентность ClpC АТФ-дефицитного мутанта была снижена для мышей, LD₅₀ изменилась на 3 порядка по сравнению с таковой исходного дикого штамма бактерий. Количественное электронно-микроскопическое изучение показало, что в противоположность бактериям дикого штамма, которые активно размножались в цитоплазме макрофага, мутантные бактерии оставались ограниченными мембранами фагосом. Доказано, что ClpC АТФ *L.monoctogenes* является главным стрессорным белком, необходимым для вирулентности и обеспечивающим ранний выход бактерий из фагосомы макрофага [248].

6.4. Стресс у франсиселл и вирулентность

F.tularensis — факультативный внутриклеточный паразит, поражающий клетки моноцитарно-макрофагальной системы [75]. Инфекция, обусловленная диким штаммом, вызывает туляремию, характеризующуюся пневмонией, высокой температурой и т.д. Аттенуированный мутант *F.tularensis* LVS (вакцинный штамм № 15 Гайского) используют как вакцинский штамм в технологии живой вакцины. Этот штамм обладает низкой вирулентностью для людей, он получен из дикого штамма путем спонтанной мутации. Однако его низкая вирулентность для людей характеризуется нестабильностью. Мышиная модель является хорошей системой изучения *in vivo* патобиологии вирулентности этого микроорганизма [115]. Изучены фенотипические свойства рифампицинустойчивых мутантов штамма LVS, обладающих низкой вирулентностью [74]. Эти Rif-устойчивые мутанты, являясь температурно-чувствительными, не росли при 42 °С. Один из этих мутантов, Rif7, изучен более детально. Его способность размножаться в макрофагах хозяина была минимальной. Вакцинация им мышей обеспечивала защиту от летальной дозы вирулентного родительского штамма.

Из-за относительно низкой токсичности для мышей и способности вызывать протективный иммунитет Rif7-мутант является предполагаемым кандидатом для разработки аттенуированных вакцин против туляремии или вектором для гетерологичных антигенов. Однако для этого нужно идентифицировать мутацию, которая привела к появлению авирulentного фенотипа. Показано, что способность Rif-мутанта адекватно отвечать на действие стрессора в организме хозяина ослаблена, вероятно, из-за температурной чувствительности и неспособности расти в макрофагах [74]. Исследован ответ на темпера-

турный стрессор Rif-мутанта *in vitro* и роль стрессора в выживании микроорганизма в организме хозяина. Мутант Rif7 был авирулентным при внутрибрюшинном введении на мышевой модели инфекции. Действие на Rif7 теплового стрессора в течение 5 ч *in vitro* приводило к снижению на 2 лг LD₅₀ ($p<0,02$). Вирулентность зависела от времени экспозиции при высокой температуре и была максимальной при 5-часовом воздействии теплового шока. В препаратах из стенок клеток, подвергнутых действию теплового стрессора, обнаружено нарастание уровня нескольких белков. Среди этих белков были полипептиды с мол.м. 16, 60 и 75 кД. И вирулентность, и содержание указанных белков возвращались к исходному уровню после выращивания микробных клеток при 37 °С. Ингибирование белкового синтеза с помощью актиномицина D в период действия теплового стрессора блокировало нарастание вирулентности Rif7.

Бесклеточная культуральная жидкость от подвергнутых тепловому стрессору культур Rif7 и убитые нагреванием клетки были нетоксичны для мышей. Rif7-мутант, попадая в стрессорные условия *in vitro*, такие как высокая температура, низкий pH, низкое содержание железа, приобретал часть своей потерянной вирулентности посредством индукции множества стрессорных белков. Гипериммунные сыворотки против Rif7 имели полный спектр антител к белкам бактерий в иммуноблоте. Подвергнутые действию теплового стрессора Rif7-бактерии были вполне способны к репликации в макрофагах как *in vitro*, так и в тканях хозяина, даже если тепловой стрессор только частично восстанавливал вирулентность. Таким образом, показано, что тепловой стрессор изменяет вирулентность рифампицинустойчивого мутанта *F.tularensis LVS* [75].

6.5. Стресс у *иерсиний* и вирулентность

Y enterocolitica — инвазивный энтеропатогенный микроорганизм, который обуславливает целый спектр болезней человека — от гастроэнтерита до сепсиса. *Y.enterocolitica* обладает рядом механизмов, обеспечивающих выживание микробных клеток в условиях постоянного перехода из окружающей среды в организм человека. Этот микроорганизм адаптирован к условиям оксидативного стрессора и способен противостоять фагоцитозу [191]. Ингибирование фагоцитоза и другие свойства, обеспечивающие вирулентность, связаны с экспрессией набора внешних белков, кодируемых плазмидами. Кроме того, выживание в организме хозяина обеспечивают консервативные хромосомные детерминанты. Как и у других микроорганизмов, в выживании *Y.enterocolitica* играет роль экспрессия специальных групп белков. Семейство таких белков включает белки

HtrA. Ген htrA Y.enterocolitica 0:8 был клонирован и секвенирован. Анализ аминокислотной последовательности показал, что htrA содержит сайт серин-протеазной активности и катализическую часть, характерную для трипсиноподобных серин-протеаз. Эти структурные черты характерны для ранее описанных HtrA-белков. Для изучения биологических функций этих белков был сконструирован изогенный мутант (by a reverse-genetics PCR-based approach) [190]. Характеристика этого мутанта со всей очевидностью подтвердила, что продукт гена htrA Y.enterocolitica имеет функцию ответа на стрессоры. В противоположность родительскому штамму мутант обнаружил нарастающую чувствительность к летальному действию H_2O_2 , O_2^- и температуры 50 °C. Мутант был авирулентным на мышиной модели иерсиниозной инфекции и защищал мышей от вирулентного родительского штамма.

На своем пути между природой и организмом хозяина бактерии подвергаются действию многих стрессоров. В результате у них включается комплекс взаимосвязанных систем ответа. Регуляторные белки обеспечивают контроль, который соединяет эти системы, включая их в многокомпонентную стратегию выживания. Экспрессия генов вирулентности активируется комплексом внешних стрессоров, таких как высокая температура, низкий pH, лимит железа, низкое содержание кислорода и др. Стрессоры индуцируют многие хорошо охарактеризованные белки, которые подготавливают бактерии к вредным внутриклеточным воздействиям, и, таким образом, могут действовать как факторы, обуславливающие вирулентность. На многих видах нескольких родов патогенных бактерий показана однотипность ответа на стрессоры и связь между стрессом у микроорганизмов и фенотипическим выражением их вирулентности.

Эти данные необходимо учитывать при разработке вакцин, иммунодиагностических препаратов, а также во многих исследованиях в области иммунобиотехнологии.

Глава 7

Общие стрессорные белки

В предыдущих главах неоднократно подчеркивалась гомология многих стрессорных белков не только различных видов и родов бактерий, но и стрессорных белков клеток прокариот и эукариот. В связи с важностью этой проблемы целесообразно посвятить этому вопросу отдельную главу.

7.1. Общие стрессорные белки у бактерий

Выживание *B. subtilis* в верхних слоях почвы требует особой стратегии преодоления влияния различных средовых стрессоров [55]. Кроме голодания, в почве часто действуют температурный, оксидативный, солевой и другие виды стрессоров. Индукция главных стрессорных белков General stress proteins (*Gsp_s*) — это одна из ответных реакций *B. subtilis* на такие лимитирующие рост условия [149, 151, 240, 295]. Кроме *Gsp_s*, тепловой стрессор индуцирует также синтез специфичных для теплового стрессора белков [151, 240]. Среди этих белков есть шапероны *DnaK*, *GroE* и *GroEL* [192, 262, 304], которые были идентифицированы с помощью двумерного электрофореза [208, 295, 296].

Большинство главных стрессорных белков, синтез которых индуцируется тепловым и солевым стрессорами, обработкой этанолом или голоданием по глюкозе или кислороду, относятся к σ^b -зависимому регулону стационарной фазы роста [67, 82, 83, 296]. Только несколько главных стрессорных белков индуцируются σ^b -независимым способом. К этой группе относятся стрессор-индукционные протеазы или шапероны [175, 211]. Сигма В (σ^b) оперон, кодирующий множество генов, сам регулируется с помощью σ^b -зависимого промотера. Ключевым событием в индукции регулона стационарной фазы является активация σ^b , который инактивируется в экспоненциальной фазе роста [66, 68, 69, 81, 106].

Анализ белкового синтеза показал, что 39 *Gsp_s* прекращают экспрессироваться после действия стрессоров у σ^b -дефицитных мутантов. Это подтверждает, что транскрипционный фактор σ^b контролирует стационарную фазу, т.е. является стрессорным регулоном [82, 296].

σ^b -Зависимые главные стрессорные белки *B. subtilis* (*Gsp_s*) необходимы для развития перекрестной устойчивости к оксидативному сигналу голодящих по глюкозе клеток [56]. Однако белки, принимающие непосредственное участие в этой неспецифической устойчивости к оксидативному стрессору, также должны были быть идентифицированы. Обнаружено, что один из *Gsp_s* располагает строгой аминокислотной последовательностью, подобной ранее охарактеризованной последовательности белка *B. subtilis* *MrgA*, индуцированного оксидативным стрессором, и белка *E. coli* *Dps/PexB*, индуцированного голоданием. Поэтому этот белок обозначен *Gsp Dps*. Поскольку *MrgA* относится к белкам, индуцированным перекисью водорода, он необходим для адаптивного ответа на оксидативный стрессор. *Dps* относится к белкам, индуцированным нагреванием, соленостью, этанолом и голоданием по глюкозе, но не сублетальными оксидативными сигналами. Опыты идентифицировали 2 промотера, кодирующие область *dps*: один является σ^b -зави-

симым (P_b), другой σ^b -независимым (P_1), оба промотера обеспечивали базальный уровень *dps* в процессе роста. После действия стрессора или при переходе в стационарную фазу роста транскрипция P_b четко нарастала, в то время как транскрипция P_1 снижалась. Мутантные штаммы, дефектные по *dps*, полностью теряли устойчивость к голоданию по глюкозе и к оксидативному стрессору. Эти результаты подтверждают, что σ^b -зависимые общие стрессорные белки *B.subtilis* абсолютно необходимы для развития неспецифической устойчивости к оксидативному стрессору.

Проведен анализ экспрессии *sig B* (сигма B) гена у *B.subtilis* в ответ на слабый (мягкий) кислотный шок [173]. Обнаружено, что экспрессия *sig B* участвует в толерантности к кислоте. Предполагают, что ген *sig B* обеспечивает защиту от кислотного шока. Закисление цитоплазмы индуцирует синтез главных стрессорных белков *B.subtilis*.

Ген *uspA* *E.coli* уникален по своей почти универсальной способности отвечать на действие стрессоров [125, 216, 217, 218]. Продукт этого гена 15,8 кД цитоплазматический белок, который синтезируется, когда рост ингибирован голоданием по углероду, азоту, сульфату или фосфату, осмотическим шоком или добавлением различных токсических агентов, таких как тяжелые металлы, оксиданты, кислоты и антибиотики [216]. *UspA*-продукция связана с fazой роста больше, чем скорость роста. Транскрипция *uspA*-гена быстро отключается, когда питание восстанавливается. Различная экспрессия гена является результатом изменения транскрипции. Этот ген — часть FadR-регулона и поэтому может играть роль в метаболизме жирных кислот и мембранных липидов [111].

UspA-белок является серин-fosфопротеином. Его fosфорилирование происходит в результате индукции транскрипции *uspA*-гена, т.е. когда рост ингибирован. Фосфорилирование зависит от функции о591-тирозин-fosfопротеина.

Показано, что универсальный стрессорный белок *E.coli UspA* необходим для обеспечения устойчивости микробы к ДНК-повреждающим агентам, поскольку мутанты, лишенные *uspA*-гена, были чувствительными к УФ-облучению и к действию митомицина С [104].

С помощью ЯРМ определена структура рибосомального белка L25 *E.coli* [283]. Обнаружена его гомология с главным стрессорным белком и глутамил-tРНК (tRNA) синтетазой.

Изучено влияние высоких концентраций NaCl (35 и 65 г/л) на синтез белков *L.monocytogenes* [108]. Синтез многих белков, которые обычно синтезируются в изоосмотических условиях (5 г/л NaCl), частично или полностью подавлен. При 35 г/л NaCl экспрессия 6 белков увеличивалась, 5 — не изменялась, а 5 — подавлялась. Среди белков, экспрессия которых увеличивалась при 35 г/л NaCl, экспрессия 1 белка (18,7 кД, рI 5,05)

также увеличивалась и при 65 г/л NaCl. Из 21 белка, которые были репрессированы при 65 г/л NaCl, 11 полностью исчезали. Некоторые белки, экспрессия которых увеличивалась при 65 г/л NaCl, имели молекулярную массу и изоэлектрические точки, близкие к таковым ранее описанного универсального стрессорного белка *L.monoctyogenes*.

Идентифицированы главные стрессорные гены *E.faecalis* [242]. Обнаружена толерантность *E.faecalis* к нагреванию, солености, изменению концентрации этанола, NaCl, перекиси водорода, pH и др. С помощью двумерного электрофореза определены 167 стрессорных белков. Показано, что по крайней мере 6 из 8 видов стрессоров индуцируют главные стрессорные белки (Gsp). Методом перекрестной иммунологической реакции идентифицированы 2 из них как DnaK и GroEL. Из 4 других 2 ранее не были описаны.

Анализ ответов на стрессоры у штаммов цианобактерий (Cyanobacterial strains) показал, что большинство стрессорных белков относится к группе общих стрессорных белков, поскольку индукция их синтеза наступала в ответ на тепловую, солевую и световую обработку [126]. Выявили также, что некоторые белки были специфичны для солевой и тепловой обработок. Перекрестные реакции со специфическими антителами позволили среди стрессорных белков идентифицировать шапероны DnaK *E.coli*.

7.2. Бактериальные стрессорные белки, подобные антигенам человека

Существует мнение, что БТШ играют роль в защите от инфекционных болезней [316]. Нарастание синтеза БТШ имеет место как у прокариотических, так и у эукариотических клеток, когда они подвергаются действию стрессора. Путем нарастания количества БТШ клетки защищаются от летального действия стрессора. БТШ продуцируются не только клетками, подвергнутыми действию стрессора, но и конститтивно, выполняя важные функции. В соответствии с этим БТШ можно отнести к сообществу молекул, играющих значительную роль в иммунной системе. Не удивительно, что благодаря их широкому распространению и гомологии среди различных видов БТШ представляют собой антигennую мишень в иммунном ответе.

Многократная встреча иммунной системы с консервативными областями БТШ, которые являются общими для разных микробов, может вызывать антимикробный иммунитет. Однако длительная конфронтация иммунной системы с антигенами БТШ, которые подобны антигенам хозяина, может конвертировать иммунный ответ, т.е. направить его против подобных антигенов хозяина и вызвать аутоиммунное заболевание.

БТШ являются эволюционно высококонсервативными, поскольку синтезируются в различных стрессорных условиях, чтобы сохранить клеточные функции. Главный антиген микробактерий 65 кД является БТШ, который имеет определенную последовательность, подобную и перекрестно реагирующую с антигенами различных других микробов. Моноклональные антитела против главного бактериального БТШ были использованы для идентификации молекул подобного размера, расположенных в макрофагах. Макрофаги, подвергнутые различным стрессорным воздействиям, включающим активацию γ -интерфероном или вирусную инфекцию, охарактеризованные с помощью класса I restricted СД8 Т-клеток, были направлены против бактериальных БТШ [171]. Эти данные показывают, что БТШ включаются в процессы клеток хозяина. Установлено, что эпитопы БТШ бактериального происхождения подобны БТШ клеток хозяина.

Здоровые индивидуумы имеют природную Т-клеточную реактивность на эпитопы 60 кД БТШ (hsp 60) как собственного, так и бактериального происхождения [172]. Изучена возможность использования определенных пептидов 60 кД БТШ в качестве Т-зависимого носителя эпитопов низкомолекулярного Т-независимого капсульного полисахарида Vi-антитела *S.typhi*. Гомологичные пептиды были получены из молекул мышечного пептида — Hsp60 (CP1m.) (common protein — mouse), из молекул близкого Hsp60 пептида человека (CP1h.) (common protein — human), из молекул более далеких пептидов *E.coli* (CP1 e.c.) и из *M.tuberculosis* Hsp60 (CP1 m.t.). Пептиды были конъюгированы с Vi-антителами и тестированы по их иммуногенности. Рекомендуется использовать собственные и чужеродные Т-зависимые эпитопы пептидов 60 кД БТШ в качестве иммуногенных носителей Т-независимых углеводных антигенов.

P.gingivalis имеет значение в этиологии периодонтита. Взаимосвязь между вирулентностью микробы и экспрессией стрессорных белков обнаружена и при других инфекциях [194]. Например, установлено, что гомологии Hsp90 обуславливают вирулентность нескольких видов микроорганизмов. Гомология Hsp90 у *P.gingivalis* (HspG) перекрестно реагирует с Hsp90 человека. Более того, в сыворотках крови людей, у которых обнаружен этот микроб, имелись антитела к стрессорному белку Hsp90, содержание которых коррелировало с тяжестью течения периодонтита.

Антитела к универсальным белкам теплового шока *S.aureus* (UspS) найдены в сыворотках больных стафилококковым эндо-кардитом. Эти белки являются иммуногенами [232]. На модели культуры человеческих эпителиальных клеток определена роль этих белков в инициировании инфекции. Установлено, что клинический изолят отвечает на сигнал клеток хозяина путем

селективного регулирования синтеза многочисленных белков, включая стрессорный белок Hsp60 (GroEL), Hsp70 (DnaK) и уникальный 58 кД белок.

Многочисленными исследованиями последних лет многих видов бактерий доказано, что в ответ на действие разнообразных чрезвычайных раздражителей — средовых стрессоров — у бактерий развивается состояние стресса. Это состояние характеризуется экспрессией множества генов, кодирующих синтез продуктов — белков, которые не синтезируются в оптимальных условиях. Среди этих так называемых стрессорных белков есть немало общих не только для разных стрессоров, но и для различных видов бактерий. Они играют важную роль в биологии бактериальных клеток, являясь протекторами-шаперонами, т.е. защищают их от вредных воздействий. С другой стороны, эти белки весьма перспективны в микробиологической технологии, поскольку некоторые из них, но не те, которые имеют общие эпитопы с антигенами человека, могут быть использованы в качестве кандидатов вакцин нового поколения.

Часть II

ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

В повседневной работе каждый микробиолог имеет дело с популяциями бактерий, находящимися, как правило, в состоянии стресса в связи с действием разнообразных средовых стрессоров. Знание этой проблемы может позволить или исключить действие стрессоров, или, наоборот, направить их в русло, соответствующее задачам данного исследования или производства.

Примеры, приведенные во второй части книги, могут помочь разобраться в результатах прикладных биотехнологических работ на основе теоретических предпосылок, изложенных в первой части.

Глава 8

Критерий синхронизации деления клеток для оценки стрессорного воздействия на популяцию *S.typhi*

Основой любого микробиологического исследования или производства является деление микробных клеток. Однако обычные популяции состоят из асинхронно делящихся микробных клеток на разных стадиях между двумя делениями. Данные, полученные при исследовании таких популяций, являются усредненными, не отражающими ни свойств отдельной микробной клетки, ни структуры популяции, например, в отношении продолжительности генерации отдельных групп клеток. При этом практически невозможно учесть результат воздействия на единичную клетку. Поэтому важно иметь синхронно делящиеся культуры, основная масса клеток которых делится почти одновременно.

Синхронность деления клеток является одним из проявлений стрессорного (шокового) воздействия на микробную популяцию [10].

В синхронных культурах можно выделить такие показатели, как время деления клеток популяции и продолжительность клеточного цикла (генерации).

В настоящее время в качестве количественного критерия синхронизации деления клеток используется индекс синхронизации (ИС), который оценивается [19] следующим образом:

$$IS = (n/n_0 - 1) (1 - \tau_k/\tau_r), \quad (1)$$

где τ_k — время синхронного деления всей совокупности клеток; τ_r — средняя продолжительность генерации; n_0 , n — число клеток в начале и в конце цикла, т.е. сразу после синхронного деления клеток популяции и непосредственно перед следующим синхронным делением.

Синхронизация считается хорошей, если ИС находится в пределах 0,65 — 0,85.

Однако расчет ИС сопряжен с определенными трудностями, связанными в первую очередь с необходимостью частых замеров для точного определения времени начала и конца деления клеток популяции. Кроме того, вид графика и выбор границ τ_k и τ_r зависят от субъективных оценок экспериментатора. К тому же при определении τ_k и τ_r , как правило, рассматривают лишь первый или второй циклы деления, так как затем наступает явная десинхронизация, причиной которой является наличие групп клеток с различной продолжительностью генерации τ_r .

Выявленные затруднения потребовали разработки статистического критерия синхронности деления клеток и методов его расчета на ЭВМ на основании экспериментальных данных, полученных при температурных и метаболических воздействиях на популяции *S.typhi* [22].

8.1. Объекты, методы и результаты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны эталонные штаммы *S.typhi* Tu₂ 4446 и Ту А. Выбор штаммов определялся тем, что они имели полноценный набор антигенных компонентов, типичные морфологические и культуральные свойства, биохимическую активность и антигенную структуру.

Культивирование как исходных, так и синхронно делящихся популяций проводили в одинаковых условиях в жидкой питательной среде (казеиновый бульон) с аэрацией при 37 °C.

Пробы для подсчета числа клеток в опытах синхронизации деления отбирали через каждые 5—15 мин в зависимости от скорости размножения и времени удвоения популяции. Каждую пробу фиксировали 10 % раствором формальдегида (1:1). Этим достигалась остановка роста, движения и размножения микробных клеток. Подсчет клеток проводили в камере Тома.

Для получения синхронно делящихся культур применяли

метод однократного холодового шока и метаболическое (met) шоковое воздействие.

По методу холодового шока 18-часовую культуру засевали в 50 мл свежей питательной среды из расчета 250—300 тыс кл/мл. После 3—3,5 ч роста, когда число клеток достигало 15—20 млн кл/мл, культуру помещали в универсальный термостат при 37 °С. Дальнейшее культивирование проводили в аппарате для встряхивания

По методу разведения экспоненциально растущую культуру, содержащую 500 млн—1 млрд кл/мл, разводили свежей питательной средой при 37 °С до 10—15 млн кл/мл (разведение 1:50 — 1:100).

Для совокупности клеток с разной продолжительностью генерации в общем виде можно записать:

$$N(\tau) = \sum n_{0i}(\tau_r) 2^k, \quad (2)$$

где $N(\tau)$ — общее количество клеток; $n_{0i}(\tau_r)$ — начальное количество клеток с продолжительностью генерации τ_n ; $K_1 = \tau/\tau_n$ — число циклов, прошедшее за время τ для группы клеток с продолжительностью генерации τ_n ; $k_i = 0, 1, 2, \dots$.

В предельном случае каждая клетка имеет свою продолжительность генерации.

При обработке экспериментальных данных по размножению микробных клеток *S.typhi* прирост клеток в единицу времени за время синхронного деления τ_k имел явно симметричную колоколообразную форму, что предполагает наличие нормального распределения клеток с разной продолжительностью генерации.

В этом случае в начальный момент времени доля клеток n_{0i} с продолжительностью генерации τ_n равна [5, 24]:

$$n_{0i}(\tau_n) = N_0 \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(\tau_n - \tau_r)^2}{2\sigma^2} \right], \quad (3)$$

где N_0 — начальное количество клеток; τ_r — средняя продолжительность генерации для всей совокупности клеток; σ — дисперсия.

Параметры τ_r и σ позволяют описать временную структуру микробной популяции. В качестве безразмерного критерия синхронного деления клеток популяции можно принять отношение:

$$KC = \sigma/\tau_r \quad (4)$$

В частности, КС для одной клетки равен 0.

Для определения параметров τ_r и σ по экспериментальным

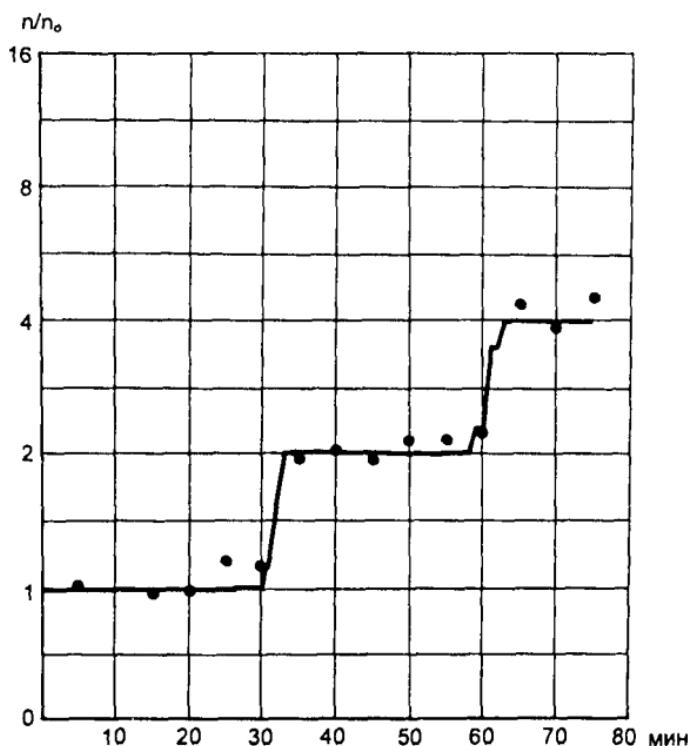


Рис. 8.1. Экспериментальные (•) и расчетные (—) данные относительного роста числа клеток (n/n_0) штамма Ty A (опыт № 109) после температурного шока (КС 0,019)

данным использовали метод минимизации среднеквадратичной ошибки (S):

$$S = \sqrt{(n_e - n_p)^2/M} , \quad (5)$$

где n_e и n_p — экспериментальное и расчетное число клеток; M — число замеров.

При расчетах всю популяцию разбивали на 15 групп ($i = 1, 2 \dots 15$). Продолжительности генерации отдельных групп клеток τ_{ri} отличались от среднего τ_r на $-7, -6, -5, \dots -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7$ мин. Доля клеток для каждой группы $n_{0i}(\tau_{ri})$ соответствует вероятности нахождения τ_{ri} в промежутке времени $\tau_{ri} = +0,5$ мин. С целью сохранения однородности в расчетах при вычислении ошибки (S) использовали не абсолютное значение числа клеток (n), а величину, равную отношению числа клеток в пробах к числу клеток в начале эксперимента (n/n_0).

В табл. 8.1 и на рис. 8.1 и 8.2 суммированы полученные результаты.

В табл. 8.1 представлены результаты обработки части экспериментов, проводимых с целью выявления воздействия температурного или метаболического шока на синхронизацию де-

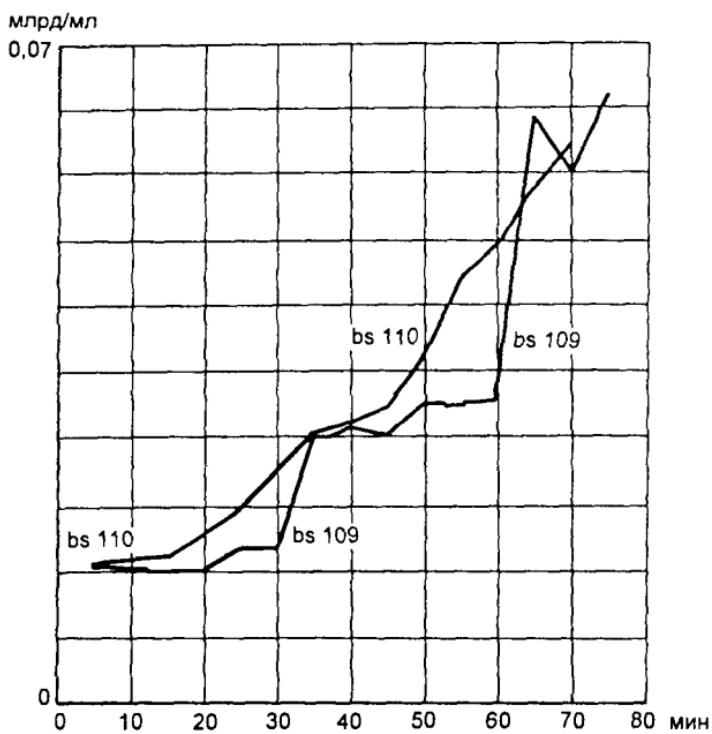


Рис. 8.2. График роста числа клеток Ту А после шокового воздействия ($t=8^{\circ}\text{C}$ и $\tau=1,5$ ч) на культуру (bs 109, КС 0,019) и в контрольном опыте (bs 110, КС 0,148).

ленияя клеток популяции *S.typhi*. Видно, что средняя продолжительность генерации лежит в пределах 30—40 мин.

На рис.8.1 дан график роста числа клеток штамма Ту А, построенный на основании расчетных значений $\sigma = 0,6$ и $\tau_g = 30$ мин, полученных при обработке экспериментальных дан-

Таблица 8.1 Результаты обработки экспериментальных данных температурного и метаболического шоковых воздействий на штаммы Ту₂ 4446 и Ту А

Штамм	Вид воздействия (шок)	Код опыта	$\tau_{\text{з}}$	τ_g	КС	ИС	S
Ту ₂ 4446	$t = 10^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 030	120	40	0,100	0,67	0,21
Ту ₂ 4446	$t = 10^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 026	150	40	0,075	0,75	0,12
Ту ₂ 4446	$t = 6^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 070	70	30	0,053	0,82	0,11
Ту ₂ 4446	$t = 5^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 069	150	40	0,100	0,67	0,22
Ту А	$t = 8^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 076	50	21	0,085	0,72	0,11
Ту А	$t = 8^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 081	140	28	0,043	0,86	0,15
Ту А	$t = 8^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 089	135	30	0,047	0,85	0,10
Ту А	$t = 8^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 091	125	27	0,074	0,76	0,13
Ту А	$t = 8^{\circ}\text{C} \tau = 1,5$ ч	bs 109	65	31	0,019	0,95	0,09
Ту А	Контроль ↑	bs 110	70	27	0,148	0,51	0,08

Продолжение

Штамм	Вид воздействия (шок)	Код опыта	$\tau_{\text{з}}$	$\tau_{\text{г}}$	КС	ИС	S
Tу А	$t = 8^{\circ}\text{C} \tau = 2,0 \text{ ч}$	bs 080	120	40	0,100	0,67	0,18
Tу А	$t = 8^{\circ}\text{C} \tau = 2,0 \text{ ч}$	bs 084	120	35	0,114	0,62	0,09
Tу А	$t = 6^{\circ}\text{C} \tau = 1,5 \text{ ч}$	bs 056	55	21	0,028	0,91	0,14
Tу А	met 1 100	bs 122	100	40	0,035	0,85	0,15
Tу А	met 1 100	bs 123	100	33	0,072	0,64	0,15
Tу А	met 1 100	bs 125	110	31	0,078	0,64	0,15
Tу А	met 1 100	bs 126	120	32	0,038	0,86	0,09
Tу А	met 1 50	bs 127	80	28	0,086	0,64	0,12
Tу А	met 1 100	bs 130	120	31	0,052	0,81	0,12

Примечание Вид шокового воздействия температурный шок (t — температура, τ — продолжительность действия, ч), метаболический шок (met, 1 100, 1 50 — степени разбавления), $\tau_{\text{з}}$ — продолжительность эксперимента (мин), $\tau_{\text{г}}$ — средняя продолжительность генерации (мин), КС — критерий синхронизации, ИС — индекс синхронизации, S — среднеквадратичная ошибка расчета

ных одного опыта (bs 109, см. табл. 8.1). КС для этого случая равен 0,019, S не превышает 0,09.

На рис.8.2 изображены графики роста числа клеток штамма Ту А после шокового воздействия ($t = 8^{\circ}\text{C}$, $\tau = 1,5 \text{ ч}$) на культуру и контрольного опыта (без шокового воздействия). КС для контрольного опыта (bs 110) равен 0,148 и существенно больше КС опыта с температурным шоковым воздействием, равного 0,019 (bs 109, см. табл.8.1).

КС использовали с целью выявления оптимальных температур и продолжительности шокового температурного воздействия на штаммы *S.typhi*. Как показали опыты, оптимальным температурным шоковым воздействием на микробную популяцию являются условия: $t = 6^{\circ}\text{C}$ при продолжительности воздействия 1,5 ч. Выявлено существенное влияние метаболического шока на синхронизацию культуры.

8.2. Обсуждение

Статистический критерий в качестве оценки степени синхронизации деления клеток микробной популяции обладает определенными преимуществами перед ИС. Так, определение ИС связано с частыми отборами проб и подсчетом количества клеток в пробах с целью более точного построения графика — кривой роста популяции, по которому выбираются границы времени синхронного деления τ_k и продолжительности генерации $\tau_{\text{г}}$. Вычисление КС не требует предварительного построения графика, а наличие модели роста количества клеток в популяции (уравнения 2 и 3) позволяет реже отбирать пробы для уточнения параметров σ и $\tau_{\text{г}}$ модели. При этом можно

использовать всю совокупность экспериментальных данных, не ограничиваясь первыми двумя циклами деления. Следует отметить, что КС всегда имеет положительное значение. Значение КС больше единицы означает, что время деления τ_k больше средней продолжительности генерации τ_r . При этих же условиях ИС имеет отрицательное значение.

Между ИС и КС существует определенная связь. Она выражается в виде: ИС = 1 - 3,3 КС.

Стрессорное воздействие, в частности низкотемпературное, замедляет (и даже останавливает) одну из стадий развития клеток, относительно которой и происходит синхронизация развития всей популяции микроорганизмов. После снятия воздействия нормальный цикл развития клеток восстанавливается и последующие деления происходят синхронно. Для объективной оценки глубины стрессорного воздействия на микробную популяцию можно использовать КС, который отражает качество (долю) одновременно делящихся клеток. Для полностью синхронизированной культуры КС равен 0, при этом все клетки делятся одновременно и имеют одинаковую продолжительность генерации τ_r . В реальных условиях КС отличен от 0, что предполагает наличие в популяции клеток с разной продолжительностью генерации, что в свою очередь приводит к десинхронизации микробной культуры после нескольких циклов деления.

Однаковую продолжительность генерации также имеют клетки в проточном биореакторе в условиях установившегося равновесия. Постоянная концентрация клеток в биореакторе в этих условиях (без учета отмирания клеток) возможна лишь при наличии баланса между удвоением количества клеток ($n/n_0 = 2$) и вымыванием клеток за период, равный τ_r :

$$n_1 = n \exp (-d \tau_r),$$

где $d = F/V$ (1/ч); F – величина протока (л/ч); V – объем жидкости в биореакторе (л).

Из условия равенства $n_0 = n_1$ следует: $\tau_r = 0,693/d$, что справедливо как для асинхронной, так и для синхронно делящейся культуры. В асинхронной культуре начало деления клеток происходит в разное время, но все клетки должны иметь одинаковую продолжительность генерации τ_r . Из этого же следует, что культура, синхронизированная в проточном биореакторе, будет оставаться синхронно делящейся достаточно продолжительное время.

Производительность по биомассе проточного биореактора не зависит от того, выращивается синхронная или асинхронная культура. Однако знание о минимальной продолжительности генерации групп клеток и факторах, обуславливающих увеличение продолжительности генерации этих групп клеток, важно

для выбора оптимальных технологических режимов, обеспечивающих максимальную производительность биореактора. Сведения о продолжительности генерации отдельных групп клеток можно получить в процессе вычисления КС после шокового воздействия на популяцию.

Таким образом, предложен КС деления клеток для микробной популяции *S.typhi*, основанный на предположении о нормальном распределении количества клеток с разной продолжительностью генерации в популяции после стрессорного (шокового) воздействия. КС использовали для оценки и выбора оптимального стрессорного воздействия при синхронизации деления микробных популяций *S.typhi*.

Глава 9

Сравнение выхода Vi- и O-антигенов в процессе адаптации штаммов *S.typhi* к стрессорным условиям голодаания

Микроорганизмы в природе редко находятся в оптимальных условиях, чаще всего жизнь микробов протекает при несбалансированности элементов питания и при неблагоприятных стрессорных физико-химических условиях: сухость, недостаток или избыток кислорода, отдельных элементов питания, повышенная или пониженная температура, УФ-облучение, неoptимальные значения pH и др. Способность микроорганизмов адаптироваться к действию стрессоров увеличивает их шанс на выживание и размножение в новых условиях жизни. Адаптация микроорганизмов к стрессорным условиям существования изучается давно и в разных аспектах [43, 46, 47, 48, 49, 51, 61, 288]. При этом отмечено, что в результате адаптации происходят изменения химического состава клеточных структур. Наблюдаются изменения в липидном составе мембран, синтез протекторных соединений (углеводов, аминокислот, специальных белков и др.). Действие неблагоприятных факторов на микробные клетки приводит к появлению во внеклеточной среде большого количества указанных выше соединений [43].

Интерес к проблеме адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды в настоящее время велик, поскольку в этой области эффективно решаются вопросы регуляции генной активности, биосинтеза белков и многие другие [49].

Есть сведения об адаптации *S.typhimurium* к стрессорам окружающей среды. Эти бактерии адаптировались к кислой среде путем их экспозиции в мягких кислотных условиях (pH

5,8). Установлена взаимосвязь “кислотной адаптации” и толерантности к другим стрессорам окружающей среды, таким как высокая температура, повышенная концентрация солей и др. Показано, что “кислотная адаптация” увеличивает гидрофобность поверхности клеток, индуцирует синтез дополнительных специфических белков внешней мембраны [189]. На модели S-форм сальмонелл и их R-вариантов изучено влияние температуры культивирования на состав и свойства липополисахарида (ЛПС). У S-форм сальмонелл максимальный выход ЛПС наблюдали при 34 °C, а у R-вариантов температурный оптимум был различным у разных штаммов. При этом температура культивирования оказывала влияние на степень полимеризации O-полисахаридных цепей [261].

Можно предположить, что ЛПС грамотрицательных бактерий, являясь компонентом внешней мембраны, принимающим непосредственное участие во взаимодействии бактерий с окружающей средой, изменяясь в результате реакции на стрессор, может выполнять роль протектора. Аналогичную роль может играть также и капсулный полисахарид.

Имеются данные о стрессе, вызванном голоданием в связи с исчерпанием субстратов при переходе популяции от экспоненциальной к стационарной фазе роста. Представляется, что “голодный стресс” можно вызвать, используя управляемое культивирование в голодной синтетической среде. Такой подход весьма целесообразен при изучении штаммов-продуцентов антигенов, применяемых в качестве вакцин. Это важно и потому, что в этих средах отсутствуют высокомолекулярные примеси, загрязняющие вакциновые препараты, предназначенные для введения в организм человека. При этом необходимо сохранение достаточного выхода протективных антигенов с заданными иммунобиологическими характеристиками [43]. В этом плане приобретает определенный интерес изучение возможности повышения синтеза целевого продукта — Vi-антigenа, который является капсулным полисахаридом и в то же время используется в качестве вакцины против брюшного тифа.

В настоящей главе приведены результаты сравнительного изучения выхода Vi- и O-антител в процессах адаптации 2 штаммов *S.typhi* к стрессорным условиям культивирования в голодной синтетической питательной среде [12].

9.1. Объекты, методы и результаты исследования

Объектами исследования избраны производственный вакциновый штамм *S.typhi* Ty₂ 4446 и селекционированный в лаборатории моделирования процессов культивирования микробов НИИВС им. И.И.Мечникова РАМН штамм Vi-1S. Оба штамма обладали характерными морфологическими и культуральными свойствами, биохимической активностью и

типичной антигенной структурой, т.е. имели O, Vi, H(d)-антигены.

S.typhi выращивали на мясопептонном агаре (МПА) и в голодной синтетической питательной среде Ледерберга в пробирках, чашках, колбах, 5- и 10-литровых биореакторах "Mabishi" (Япония). Все процессы выращивания включали этап подготовки посевного материала и основное культивирование, которое проводили гомогенным периодическим и многоциклическим способами. Приготовление посевного материала, как правило, включало изучение отдельных колоний при выращивании на полноценных питательных средах, размножение микробных клеток и засев культуры для проведения основного культивирования.

Концентрацию биомассы определяли по оптической плотности культур с помощью фотоэлектроколориметра-нефелометра ФЭК-Н-56 при длине волны 560 нм в кюветах с оптическим расстоянием 10 мм. Содержание Vi- и O-антител в культуральной жидкости определяли в реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА) с использованием коммерческих Vi- и O-диагностикумов и Vi- и O-антител собственного приготовления. O-антител изучали в ЭФ в ПААГ в системе U.K.Laemmli [10] с последующим окрашиванием раствором азотникислого серебра по методу С.-М.Tsai [292].

Статистическую обработку результатов проводили по формулам, рекомендованным И.П.Ашмаринным и А.А.Воробьевым [5], с использованием критерия Стьюдента — Фишера.

Изучали процесс адаптации штаммов к стрессорным условиям роста в жидкой голодной синтетической питательной среде. Для этого сначала посевную культуру выращивали на плотной питательной среде — МПА (I пассаж), затем пересевали в жидкую голодную синтетическую питательную среду и выращивали во флаконах или колбах (II пассаж). При этом оптическая плотность культур к 24 ч увеличивалась всего в 2—3 раза по сравнению с культурой в момент засева. Величина pH культуральной жидкости снижалась от 7,15 до 6,0 — 6,5; содержание Vi-антител в культуральной жидкости увеличивалось в зависимости от плотности культуры. Из табл.9.1 видно, что при выращивании штамма Tu₂ 4446 содержание Vi-антител к 24 ч роста при OD = 0,37 ± 0,09 Et было 0,175 ± 0,090 мкг/мл. При выращивании штамма Vi-1S в аналогичных условиях этот показатель составлял при OD = 0,29 ± 0,07 Et — 0,330 ± 0,120 мкг/мл. Иными словами, штамм Vi-1S продуцировал большее количество Vi-антител. Содержание O-антител в культуральной жидкости к 24 ч роста для штамма Tu₂ 4446 при OD = 0,37 ± 0,09 Et равнялось 10,00 ± 7,70 мкг/мл; для штамма Vi-1S при OD = 0,29 ± 0,07 Et — 0,898 ± 0,330 мкг/мл. Отношение Vi-антитела к O-антителу для штамма Tu₂ 4446 составляло 1:57, для штамма Vi-1S — 1,2,72.

Содержание О-антигена в культуральной жидкости на порядок меньше у штамма Vi-1S по сравнению со штаммом Ту₂ 4446 ($0,898 \pm 0,330$ против $10,00 \pm 7,70$ соответственно). Характеристика О-антигена проводилась с помощью ЭФ в ПААГ с последующим серебрением. Результаты свидетельствовали о том, что штамм Vi-1S выделял в процессе роста в культуральную жидкость низкомолекулярный О-антителен, тогда как штамм Ту₂ 4446 выделял в культуральную жидкость как низкомолекулярный, так и высокомолекулярный О-антителен.

Таблица 9.1. Характеристика культур двух штаммов *S.typhi*, выращенных в течение 24 ч в жидкой голодной синтетической питательной среде в колбах (II пассаж) при использовании посевной культуры, полученной с плотной среды (I пассаж)

Штамм	Оптическая плотность, OD	Содержание антигена в мкг/мл*		Отношение Vi-к О-антителу
		Vi-	O-	
Ту ₂ 4446	$0,37 \pm 0,09$	$0,175 \pm 0,090$	$10,00 \pm 7,70$	1:57
Vi-1S	$0,29 \pm 0,07$	$0,330 \pm 0,120$	$0,898 \pm 0,330$	1:2,72

* Содержание Vi- и O-антител определяли в РТПГА в бесклеточной культуральной жидкости.

При изучении штаммов, выращенных в жидкой голодной синтетической питательной среде в колбах (III пассаж) при использовании посевной культуры, выращенной также в жидкой голодной синтетической питательной среде в колбах (II пассаж), т.е. адаптированной к новым условиям роста, наблюдали увеличение оптической плотности культур к 24 ч в 5–7 раз по сравнению с исходным значением OD и снижение pH примерно на 0,70.

Содержание Vi-антитела к 24 ч роста для штамма Ту₂ 4446 возросло по сравнению с исходным значением в 4 раза и составляло 0,625 мкг/мл, для штамма Vi-1S возросло в 12 раз и составило 0,750 мкг/мл; содержание О-антитела к 24 ч роста для Ту₂ 4446 осталось на исходном уровне 15,00 мкг/мл, для штамма Vi-1S увеличилось в 7 раз и составило 3,33 мкг/мл. При изучении О-антитела штамма Ту₂ 4446 в ЭФ в ПААГ обнаружены полосы преципитации как в высоко-, так и в низкомолекулярной области. Иными словами, этот штамм синтезировал и низко- и высокомолекулярный ЛПС. При изучении О-антитела штамма Vi-1S обнаружены полосы только в низкомолекулярной области. Это свидетельствует о том, что штамм Vi-1S продуцировал в культуральную жидкость низкомолекулярный О-антителен.

Следующим этапом работы явилось выращивание штаммов в биореакторе (IV пассаж) в голодной синтетической питатель-

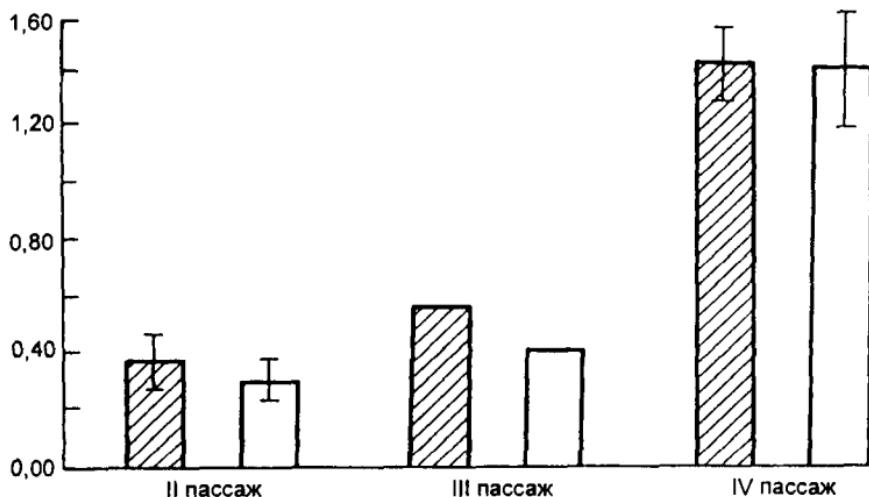
ной среде при использовании посевной культуры III пассажа. В табл. 9.2 представлены оптическая плотность культур и содержание Vi- и O-антител в многоциклических процессах культивирования штаммов *Ty₂* 4446 и Vi-1S. Из табл. 9.2 видно, что уже к 4–6 ч роста в первых циклах оптическая плотность культур достигала значений 0,94–1,50 Et. Видно также, что II и III циклы по сравнению с первыми циклами являются более продуктивными по выходу биомассы. Полученные данные подтвердили целесообразность выращивания штаммов в биореакторе, так как в данном случае по сравнению с выращиванием в колбах или фляконах увеличиваются как выход биомассы, так и содержание Vi-антитела. При выращивании штамма *Ty₂* 4446 в колбах (II пассаж) (рис. 9.1) выход биомассы составил к 24 ч роста $0,37 \pm 0,09$ Et, а в биореакторе (IV пассаж) процесс сократился в среднем до 5 ч, при этом выход биомассы увеличился в 3–4 раза, т.е. до $1,40 \pm 0,13$ Et.

Таблица 9.2. Характеристика культур 2 штаммов *S.typhi*, выращенных в многоциклических процессах в жидкой голодной синтетической питательной среде в биореакторе (IV пассаж) при использовании посевной культуры, выращенной в колбах (III пассаж)

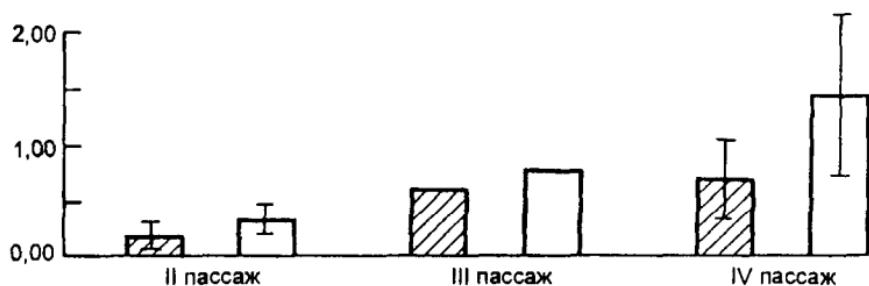
Штамм	Многоциклические процессы		Часы роста	Оптическая плотность, OD	Содержание антигена мкг/мл*		Отношение Vi- к O-антителу
	№ процесса	№ цикла			Vi-	O-	
<i>Ty₂</i> 4446	1	I	5,5	1,28	1,00	10,00	
		II	5,5	1,40	0,50	20,00	
		2	I	6	1,36	0,50	10,00
		II	5	1,40	1,00	10,00	
		III	5	1,56	0,50	20,00	
	Среднее			$1,40 \pm 0,13$	$0,70 \pm 0,35$	$14,00 \pm 6,9$	1,20
	3	I	6	1,50	1,00	5,00	
		II	5	1,84	4,00	5,00	
		III	5	1,90	2,00	5,00	
<i>Vi-1S</i>	2	I	5	1,20	1,00	2,50	
		II	5	1,30	0,50	2,50	
	3	III	4	1,20	1,00	1,25	
		IV	4	1,32	1,00	2,50	
	4	I	6	0,94	1,00	1,25	
		II	4,4	1,32	1,00	2,50	
		III	4	1,30	2,00	5,00	
Среднее				$1,38 \pm 0,21$	$1,45 \pm 0,72$	$3,25 \pm 1,14$	1:2,24

* Содержание Vi- и O-антител определяли в РТПГА в культуральной жидкости

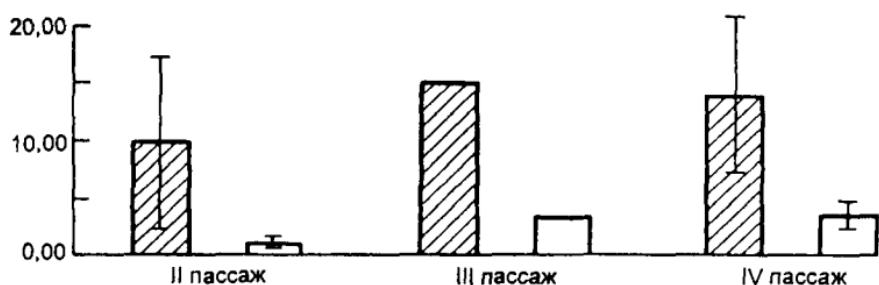
Содержание Vi-антитела достоверно увеличилось ($p<0,1$) от $0,175 \pm 0,09$ мкг/мл (II пассаж) до $0,70 \pm 0,35$ мкг/мл (IV пассаж). Содержание O-антитела осталось на том же уровне. При



а



б



в

Рис. 9.1. Накопление биомассы Ig 100 Et (а), Vi-антитела, мкг/мл (б) и O-антитела, мкг/мл (в) (оси ординат), в культуральной жидкости II, III и IV пассажей *S.typhi* штаммов Ty₂ 4446 (заштрихованные столбики) и Ty-1S (незаштрихованные столбики) при выращивании в жидкой синтетической питательной среде

этом О-антитело находился как в высоко-, так и низкомолекулярной форме.

При сравнении процессов культивирования штаммов Vi-1S в колбах и в биореакторе отмечена та же закономерность в отношении выхода биомассы и накопления Vi-антитела, которая описана для штамма Ty₂ 4446 (см. рис. 9.1). Так, культура штамма Vi-1S, выращенная в колбах (II пассаж) в течение 24 ч, содержала $0,33 \pm 0,12$ мкг/мл Vi-антитела (см. рис. 9.1 и табл. 9.1). В культурах, выращенных в биореакторе (IV пассаж) в течение примерно 5 ч, содержание этого антигена составило $1,45 \pm 0,72$ мкг/мл, т.е. наблюдалось достоверное увеличение ($p < 0,1$) Vi-антитела при адаптации культуры к синтетической питательной среде. При этом прослеживалась тенденция к увеличению выхода Vi-антитела в многоциклических процессах от цикла к циклу. Кроме того, наблюдалось достоверное увеличение ($p < 0,1$) О-антитела по мере усовершенствования процессов культивирования. Содержание О-антитела в культурах II пассажа равнялось $0,898 \pm 0,33$, в культурах III пассажа — $3,25 \pm 1,14$ (см. рис. 9.1). О-антитело находился только в низкомолекулярной форме.

При сравнительном анализе результатов культивирования в биореакторе 2 штаммов оказалось, что в культуральной жидкости, полученной при выращивании штамма Vi-1S, содержание Vi-антитела в 2 раза выше, чем при выращивании штамма Ty 4446 (см. рис. 9.1) ($1,45 \pm 0,22$ мкг/мл против $0,70 \pm 0,35$ мкг/мл соответственно), а содержание О-антитела — в 3 раза меньше ($3,25 \pm 1,14$ мкг/мл против $14,00 \pm 6,9$ мкг/мл соответственно) при одинаковых значениях оптической плотности культур.

9.2. Обсуждение

Микроорганизмы постоянно находятся в состоянии стресса: не только в лаг-фазе и в фазе замедления роста, но даже и в экспоненциальной фазе, если они выращиваются в голодных минимальных средах, не обеспечивающих им возможность реализовать свою максимальную скорость роста, заложенную в геноме. Подтверждение можно видеть в том, что скорость роста микробов в этих средах обычно ниже той, которая достигается при их выращивании в полноценных питательных средах. Синтез полимеров клеточной стенки в синтетических средах часто усиливается. Поэтому выращивание в синтетических средах можно рассматривать как один из видов стрессорного воздействия (starvation stress) на популяцию микроорганизмов, позволяющего управлять их жизнедеятельностью [43, 46, 47, 48, 49, 51, 61, 288].

Результаты исследования показали, что многократные пассажи *S.typhi* в голодную синтетическую питательную среду приводят к адаптации культуры к стрессорным условиям. По-

лучены данные о накоплении биомассы и синтезе Vi- и O-антител в зависимости от количества пассажей и усовершенствования процессов при выращивании штаммов Vi-1S и Ту₂ 4446 во флаконах, в колбах и в биореакторе в голодной синтетической питательной среде. При адаптации культур к новым условиям роста и по мере совершенствования процессов культивирования наблюдалось 4-кратное увеличение выхода биомассы у этих штаммов при сокращении времени выращивания от 24 ч (в колбах) до 5 ч (в биореакторе). При этом увеличение содержания Vi- и O-антител в культуральной жидкости отмечено у штамма Vi-1S, в культурах штамма Ту₂ 4446 повысился только выход Vi-антитела.

Приведенные данные свидетельствуют о целесообразности использования управляемого стресса, вызываемого изменениями условий культивирования, т.е. увеличением числа пассажей в голодную синтетическую питательную среду для повышения выхода Vi- и O-антител, которые, возможно, играют роль протекторов.

Глава 10

Влияние ионов металлов на продукцию пенициллинацилазы культурой *E.coli* штамма NAT-99 50R

Добавление ионов металлов в среду культивирования индуцирует у микроорганизмов механизмы защиты от их токсического действия.

В зависимости от концентрации ионов металлов в среде у микроорганизмов могут быть задействованы механизмы регуляции на уровне генома, подобные тем, которые возникают в ответ на действие различных стрессоров, в том числе iron stress [123, 225].

По данным литературы, микроорганизмы отличаются степенью устойчивости или чувствительности к различным металлам, что также генетически детерминировано.

По мнению авторов, исследовавших ингибирование и стимулирование роста *E.coli* ртутью [27], существует пороговая доза ртути, при которой изменяются свойства этого микроба. Концентрации, меньшие пороговой дозы, могут стимулировать увеличение выхода биомассы.

Представляется, что во взаимодействии микроорганизмов с ионами металлов наиболее вероятна роль ионов металлов как

стрессоров, а в результате их действия на микроорганизмы может усиливаться или осуществляться синтез *de novo* протекторов, в качестве которых могут быть белки, ферменты и др.

Прямых указаний в литературе на такие аспекты взаимодействия ионов металлов с микроорганизмами не встречено. Однако весьма перспективны подобные исследования, т.к. они могут быть полезны в прикладных разработках, касающихся синтеза целевых продуктов медицинского назначения. Одним из таких важных продуктов является пенициллинацилаза.

Пенициллинацилазы, применяемые в производстве 6-аминопенициллановой кислоты — исходного полупродукта для синтеза различных пенициллинов, получают при культивировании специальных штаммов бактерий, в том числе *E.coli*. В производственных условиях для выращивания *E.coli* используют жидкую питательную среду на основе:

- кукурузного экстракта (КУК), представляющего собой в основном аминокислотнопептидный комплекс;
- фенилуксусной кислоты (ФУК) как индикатора пенициллинацилазы [1, 17, 9, 225];
- аргинина.

В связи с тем что КУК — это нестабильный компонент, выход пенициллинацилазы и соответственно продукта производства — пенициллина часто бывает низким.

Целесообразно изучение возможности повышения синтеза целевого продукта — пенициллинацилазы, которая является ферментом, т. е. белком, с помощью стрессорного воздействия ионов металлов на культуру *E.coli* [2].

10.1. Объекты, методы и результаты исследований

Работа проводилась с производственным штаммом *E.coli* NAT-99 50R, селекционированным во ВНИИ антибиотиков из родительских штаммов НРА 3/5 и 9637.

Выращивание штамма осуществляли на мясопептонном бульоне (МПБ), мясопептонном агаре (МПА), агаре Хоттингера и агаре, содержащем КУК и ФУК. Кроме того, выращивание *E.coli* осуществляли в синтетической среде. В качестве стрессоров использовали соли редкоземельных металлов — азотнокислый лютей Lu(NO₃)₃, азотнокислый церий Ce(NO₃)₄, а также азотнокислое железо Fe(NO₃)₂ в различных концентрациях.

В процессе культивирования штамма *E.coli* NAT-99 50R в культуральной жидкости контролировали pH, количество биомассы, активность пенициллинацилазы. pH определяли потенциометрически, количество биомассы — нефелометрически по оптической плотности (OD), активность пенициллинацилазы — спектрофотометрически: за единицу активности принимали ко-

личество фермента, которое в условиях определения при гидролизе бензилпенициллина катализирует образование 1 ммоль 6-аминопенициллановой кислоты за 1 ч.

При культивировании штамма на МПБ рост был придонный. При сравнении роста при 24 °С на чашках с агаром, содержащим КУК и ФУК, в течение 48 ч, с ростом на чашках с агаром Хоттингера обнаружен более обильный рост на чашках с КУК и ФУК. Выросшие колонии изучали с помощью бинокулярной лупы в косопроходящем свете. Они были различны по плотности и размеру, имели резкую исчерченность поверхности и "звездчатую" форму с неровными "рваными" краями, имели тусклое розовато-желто-зеленое свечение. Все перечисленное свидетельствует о резко выраженной диссоциации штамма. Далее штамм был адаптирован к новым условиям роста. После 15 пассажей штамм стал расти на МПА через 24 ч. При многократных пассажах на 0,3 % МПА культуры оказались строго неподвижными и выпадали в осадок (на +++) при пробе с кипячением по Бернгофу. По биохимическим свойствам культура относилась к эшерихиям, была индолпозитивной, уреазонегативной, не образовывала ацетилметилкарбинола, не образовывала сероводорода, не росла на среде Симмонса, ферментировала с образованием кислоты углеводы и спирты: глюкозу, лактозу, ксилозу, сахарозу (на 4—5-е сутки), раффинозу, маннит, сорбит, дульцит (на 5—7-е сутки); не ферментировала мальтозу, рамнозу, целлобиозу, адонит, инозит, салицин; не утилизировала малонат натрия, фенил-аланин, лизин, аргинин; в отношении орнитина установлено 2 биовара: орнитинпозитивный и орнитиннегативный. В мазках, окрашенных по Граму, культуры орнитинпозитивного биовара были представлены грубыми полиморфными ярко окрашенными (грамотрицательными) палочками; орнитиннегативного — менее грубыми полиморфными, менее яркими (грамотрицательными) палочками.

Далее полноценная среда была заменена на стандартную синтетическую питательную среду с добавлением солей металлов, т.е. культура подвергалась стрессорным воздействиям. Важно было выяснить, как в этих условиях происходит синтез пенициллинацилазы. Для этого осуществляли выращивание *E. coli* NAT-99 50R во флаконах как в полноценной среде, содержащей КУК, ФУК и аргинин (контроль), так и в синтетической питательной среде, содержащей минеральные соли, ФУК, глюкозу и аргинин (контроль), а также в той же синтетической среде с добавлением солей металлов, таких как азотнокислое железо, или азотнокислый лютеций, или азотнокислый церий в концентрациях 0,01, 0,001, 0,0001 % соответственно (опыт).

Биохимические свойства культур, выращенных в синтетической среде, сохранялись. В мазках, окрашенных по Граму,

Таблица 10.1 Характеристика культур *E.coli*, выращенных в полноценной и в синтетической питательных средах, а также в синтетической питательной среде с добавлением солей металлов

№ про- бы	Среда	Концентра- ция солей металлов	Величины показателей по часам роста					
			0		3		24	
			pH	OD	pH	OD	pH	OD
1	Синтетическая	0,01	7,15	0,19	7,00	0,23	6,30	0,44
2	среда + ФУК + аргинин + $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$	0,001	7,20	0,20	7,10	0,19	5,80	1,14
3		0,0001	7,25	0,10	7,10	0,18	5,60	0,96
4	Синтетическая	0,01	7,15	0,17	7,05	0,16	6,55	0,44
5	среда + ФУК + аргинин + $\text{Lu}(\text{NO}_3)_3$	0,001	7,20	0,25	6,95	0,26	5,95	0,58
6		0,0001	7,20	0,22	7,00	0,22	5,80	0,98
7	Синтетическая	0,01	7,15	0,23	7,00	0,20	6,15	0,60
8	среда + ФУК + аргинин + $\text{Ce}(\text{NO}_3)_4$	0,001	7,15	0,20	6,95	0,17	6,10	0,64
9		0,0001	7,15	0,26	7,05	0,18	5,75	0,80
10	Синтетическая	Без солей	7,15	0,24	7,00	0,22	5,80	0,80
11	среда + ФУК + аргинин	Без солей	7,15	0,14	7,10	0,16	6,05	0,92
12	Полноценная	Без солей	7,30	0,51	7,05	0,58	8,20	4,80
13	среда КУК + ФУК + аргинин	Без солей	7,40	0,35	7,25	1,30	8,10	6,00

культур, выращенных в синтетической среде без добавок, микробные клетки были типичными, среди них редко встречались длинные цепочки. В синтетической среде с добавлением солей металлов чаще встречались длинные цепочки, в некоторых случаях клетки окрашивались более интенсивно.

В табл. 10.1 представлены основные параметры роста культуры (OD и pH) в синтетической среде с добавлением солей металлов или без них, а также в контрольной жидкой полноценной среде. Из табл. 10.1 видно, что OD 24-часовой культуры, выращенной в полноценной среде с КУК и ФУК, в 5–6 раз выше OD культуры в синтетической среде, содержащей соли металлов. При этом значение pH культуры в полноценной среде повышалось до 8,2.

В синтетической среде значение pH понижалось до 5,7.

При выращивании культуры в синтетической среде, содержащей высокие концентрации солей металлов, по сравнению с синтетической средой, не содержащей солей металлов, наблюдалось преимущественное снижение выхода биомассы.

В табл. 10.2 представлены данные о накоплении фермента пенициллинацилазы в синтетической среде с добавлением солей металлов (опыт) и в контрольных средах — жидкой синтетической, не содержащей изучаемых ионов металлов, а также в полноценной среде, содержащей КУК и ФУК. При сравнении пенициллинацилазной активности культур, выращенных в

контрольных (полноценной и синтетической) питательных средах, значимой разницы не наблюдалось. При этом необходимо отметить высокую пенициллинацилазную активность культур (364 ед/мг), выращенных в синтетической среде, содержащей азотнокислое железо в концентрации 0,0001 %, и в среде, содержащей азотнокислый лютейций в концентрации 0,01 % (539 ед/мг) (табл. 10.2).

Таблица 10.2 Пенициллинацилазная активность культур *E.coli*, выращенных в полноценной и в синтетической питательных средах, а также в синтетической питательной среде с добавлением солей металлов

№ про- бы	Среда	Конcenтра- ция солей металлов	Пенициллинацилазная активность	
			ед/мл	ед/мг
1	Синтетическая среда + ФУК +	0,01	25,40	51,00
2	+ аргинин + Fe(NO ₃) ₂	0,001	0,00	0,00
3		0,0001	364,00	364,00
4	Синтетическая среда + ФУК +	0,01	188,00	539,00
5	+ аргинин + Lu(NO ₃) ₃	0,001	51,00	102,00
6		0,0001	38,00	38,00
7	Синтетическая среда + ФУК +	0,01	47,00	47,00
8	+ аргинин + Ce(NO ₃) ₄	0,001	30,00	49,50
9		0,0001	40,30	34,00
10	Синтетическая среда + ФУК +	Без солей	28,00	28,00
11	+ аргинин	Без солей	51,00	51,00
12	Полноценная среда КУК +	Без солей	95,40	50,00
13	+ ФУК + аргинин	Без солей	121,00	48,00

10.2. Обсуждение

Из литературы известно, что влияние солей металлов на микроорганизмы изучается в основном с целью снижения или устранения токсичности металлов микроорганизмами за счет биосорбции, биоаккумуляции, связывания токсичных ионов метаболитами микробов и т.д. Интересен другой аспект этой проблемы, а именно изучение механизмов защиты микроорганизмов от солей металлов как стрессоров.

Регуляция потребления ионов металлов, в частности ионов железа, осуществляется, например, у *E.coli* на уровне генома. Этот процесс сопровождается синтезом дополнительных, так называемых железорегулируемых белков [123]. Некоторые авторы называют их стрессорными белками [224]. Особенно интересно это изучение в прикладных исследованиях, т.е. в тех случаях, когда эти белки, являясь для микробной клетки протекторами, в то же время могут быть важными для производства целевыми продуктами медицинского назначения.

При выращивании культуры *E.coli* в синтетической среде, содержащей соли металлов, наблюдалось снижение выхода

биомассы по сравнению с контролем и замедление роста бактерий. При этом показано, что азотокислое железо в концентрации 0,0001 % или азотокислый лютейций в концентрации 0,01 %, содержащиеся в синтетической среде, усиливают в 7–10 раз синтез пенициллинацилазы штамма *E.coli* NAT-99 50R.

Эти результаты можно объяснить стрессорным действием изученных концентраций ионов металлов на микроорганизмы, а пенициллинацилазу тогда можно рассматривать как протектор.

*Полученные данные позволяют наметить пути оптимизации технологии изготовления пенициллинацилазы на основе стрессорных воздействий на культуру *E.coli*.*

Глава 11

Влияние стрессоров на белки наружной мембрany *N.meningitidis* серогруппы В в процессе периодического культивирования в биореакторе

При периодическом выращивании на микроорганизмы в разных фазах роста действуют разные виды стрессоров. В лаг-фазе клетки находятся под влиянием химического или метаболического стрессоров в результате их пересева с истощенной среды в свежую питательную среду. В экспоненциальной фазе роста, по мнению И.Л.Работновой и др. [41, 42], клетки не испытывают стрессорного воздействия, находятся в физиологически активном состоянии. Представляется, что микроорганизмы могут находиться в состоянии стресса не только в лаг-фазе, но даже и в экспоненциальной фазе, если они выращиваются в средах, не обеспечивающих их питательные потребности. В фазе замедления скорости роста уменьшается процент насыщения среды кислородом, уровень pH или повышается, или понижается, истощается питательная среда, накапливаются метаболиты, т.е. клетки вновь находятся под влиянием стрессоров, таких как недостаток субстрата, избыток продуктов метаболизма или изменение физико-химических показателей – pH, pO₂, pCO₂ и т.д. В стационарной фазе, когда рост прекращается, действие указанных выше видов стрессоров на клетки усугубляется.

Есть данные о том, что стресс выражается прежде всего в замедлении роста популяции, а синтез полимеров клеточной стенки при этом даже усиливается [41, 42]. В настоящее время в этом отношении изучаются изменения в липидном составе

мембран, синтез протекторных соединений (углеводов, аминокислот и др.), образование ростингибирующих соединений и специальных белков [46, 47, 48]. Особое внимание обращено на то, что действие неблагоприятных факторов на микробные клетки приводит к появлению во внеклеточной среде большого количества перечисленных выше соединений [43].

В последние годы общепризнано, что экспрессия многих детерминант вирулентности у патогенных бактерий контролируется условиями роста [224]. Менингококки, выращенные при лимите железа, при низком рН, в 1200 раз более вирулентны, чем клетки, растущие в сбалансированной питательной среде. Изменение вирулентности коррелирует с различными изменениями поверхностных свойств клетки бактерии, включая экспрессию железо- и кислородрегулируемых белков наружной мембранны. Отсутствие экспрессии этих белков наблюдается при выращивании бактерий в сбалансированной благоприятной питательной среде. Показано увеличение экспрессии менингококкового белка 63 кД (Msp63) при многих стрессорных условиях [224]. При этом продемонстрировано увеличение связывания с Msp63 специфических антител после роста бактерий в условиях лимита питания, особенно ионов железа.

Интерес исследователей к изучению белков внешней мембранны нейссерий понятен не только с точки зрения реакции на стрессорное воздействие и в связи с их ролью в серотипировании этих микроорганизмов, но и в связи с разработкой нового поколения вакцин [22, 29].

Следует отметить, что до работы Н.Н. Алексахина и И.А. Баснакьян [1] в литературе отсутствовали сведения о наборе серотиповых белков на разных фазах роста популяции менингококка. Однако такие исследования имеют значение не только для углубления знаний о биологии бактериальной клетки, но и полезны в практическом отношении в биотехнологии получения антигенов с заданными свойствами [10]. Поэтому приводим исследование реакции на стрессорное воздействие у вакциновых штаммов *N.meningitidis* серогруппы В в процессе периодического культивирования в биореакторе.

11.1. Объекты, методы и результаты исследования

Объектами исследования были вакциновые штаммы *N.meningitidis* серогруппы В: № 125 и 150.

Эти штаммы селекционированы в лаборатории моделирования процессов культивирования микроорганизмов НИИВС им. И.И.Мечникова РАМН из исходных штаммов Вс5 и В15 соответственно и депонированы в коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Основным объектом изучения менингококка являлся штамм № 125 серогруппы В, серотипа 2, субтипа 2в.

Выращивание культуры *N.meningitidis* сначала проводили на плотной питательной среде — агаре Хоттингера, а затем в модифицированной жидкой полусинтетической питательной среде Коэн-Виллер, в состав которой входят набор аминокислот гидролизата казеина, минеральные соли, диализат дрожжей, крахмал [45]. Периодическое глубинное культивирование *N.meningitidis* осуществляли в биореакторах "Анкум-2М" (Россия) и "Marubishi" (Япония) при непрерывном перемешивании. В процессах глубинного культивирования штаммов в биореакторе контролировали оптическую плотность суспензий, рН культуральной среды, концентрацию растворенного в среде кислорода. Проводили расчет скоростей роста, построение графиков кривой роста по динамике оптической плотности и рН. Количество белка в клетках и в культуральной жидкости определяли по методу O.H.Lowry, α -аминный азот — по методу O.Muring и E.Kaiser, углеводы — по M.Dubois с использованием фенола и серной кислоты.

Из биомассы менингококка серогруппы В штаммов № 125 и 150, выращенных в среде Коэн-Виллер до разных фаз роста, готовили антигенный комплекс (АК) по методу C.E.Frasch и E.C.Gotchlich. В состав АК входили белок и ЛПС. Серотиповые антигены (СТА): T-1, T-2-7, T-2-10, T-4, T-5, T-6, T-8, T-9, T-11, T-12, T-13, T-15, были предоставлены доктором C.E.Frasch.

Изучение белкового состава АК осуществляли с помощью ЭФ в ПААГ с DDS-Na по U.K.Laemmli. Мол.м. белков определяли по белковым маркерам с известной мол.м. (фосфорилаза В — 92,5 кД, бычий сывороточный альбумин — 67 кД, карбоангидраза — 45 кД и овальбумин — 29 кД). Окрашенные гели сканировали на денситометре фирмы LKB. Площадь пика каждого индивидуального белка определяли по графику и выражали в процентах от общей площади всех пиков.

Антигенный состав полученных АК менингококка серогруппы В из культур разных фаз роста — экспоненциальной и начала стационарной — изучали методом встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) с использованием диагностических менингококковых сывороток серогруппы A, C, D, X, Y, Z, W-135 производства Ставропольского ИВС, менингококковых сывороток серогруппы В и сывороток к СТА: T-1, T-2-7, T-2-10, T-4, T-5, T-6, T-8, T-9, T-11, T-12, T-13, T-15 собственного приготовления. Кроме того, АК изучали в реакции преципитации в геле по Оухтерлони с серотиповыми сыворотками.

В работе использовали кроличьи менингококковые сыворотки серогруппы В собственного приготовления, полученные иммунизацией кроликов культурами менингококка, выращенными до разных фаз роста.

Статистическую обработку результатов проводили путем

расчета доверительных интервалов по формулам, рекомендованным И.П Ашмарным и А.А.Воробьевым [5].

На рис.11.1 представлены зависимости накопления биомассы ($\lg 100 Et$) от времени периодического культивирования менингококка серогруппы В штамма № 125 в биореакторе в среде Коэн-Виллер. Из рис 11.1 видно, что в процессе культивирования менингококка в данной среде лаг-фаза отсутствовала. Сразу же после засева инокулята, полученного путем смыва физиологическим раствором хлорида натрия культуры с плотной среды, наступала фаза экспоненциального роста. После короткой фазы замедления скорости роста культура переходила к стационарной фазе роста.

В течение экспоненциальной фазы роста наблюдалось интенсивное потребление α -аминного азота. В некоторых случаях в течение стационарной фазы роста его содержание оставалось на одном и том же уровне. Процент потребления субстрата колебался в разных опытах от 64 до 94 в зависимости от начальной концентрации α -аминного азота и количества выросшей микробной массы.

При изучении изменения количественного содержания углеводов в ходе периодического процесса культивирования оказалось, что в экспоненциальной фазе роста содержание углеводов снижалось с 1200 до 600 мкг/мл, а затем в стационарной фазе роста этот показатель постоянно колебался около этой величины. Можно предположить, что в состав питательной среды входят, помимо глюкозы и мальтозы, другие сахара, которые не утилизируются менингококком, но определяются используемым методом. Предыдущими исследованиями показано, что при дополнительной подаче глюкозы в экспоненциальной фазе роста наблюдаются повышенный выход биомассы и увеличение длительности экспоненциальной фазы роста [3]. Это свидетельствует о том, что глюкоза в данном случае является лимитирующим рост фактором.

В процессе роста культуры происходило защелачивание культуральной среды. В экспоненциальной фазе значения pH среды изменялись от 6,2 до 7,6, в стационарной фазе — от 7,8 до 9,0, достигнув при этом максимальных величин

Концентрация растворенного в среде кислорода в процессе периодического культивирования от первоначального уровня 100—50 % резко снижалась, а в середине или в конце экспоненциальной фазы роста достигала значений, примерно равных нулю, т.е наступало лимитирование роста по кислороду. Переход культуры в стационарную фазу роста характеризовался прекращением роста и снижением интенсивности дыхания. Поэтому уровень растворенного в среде кислорода вновь повышался до 70—100 % и в течение всей стационарной фазы роста оставался на этом уровне при постоянной подаче воздуха. Следующие серии опытов показали, что лимитирование куль-

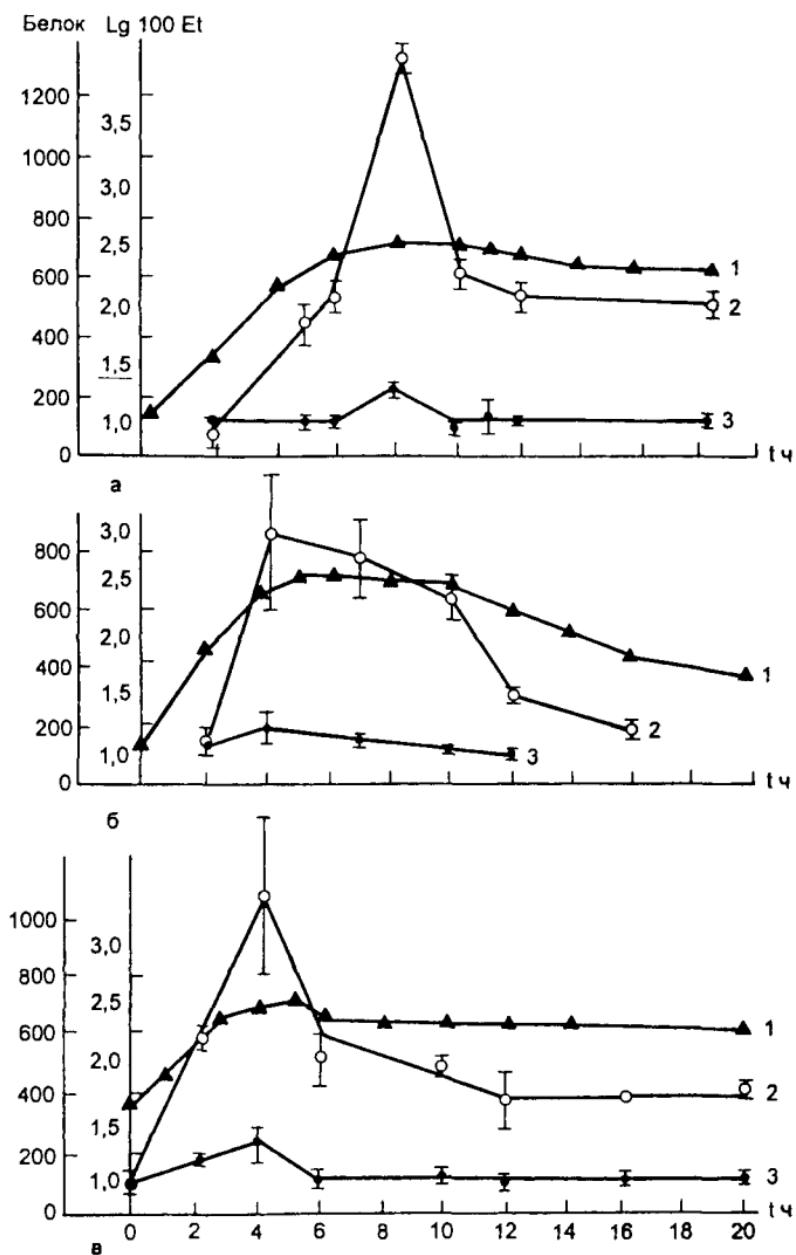


Рис. 11.1. Зависимость накопления биомассы (x) Ig 100 Et (1), количества белка в клетках, содержащихся в 1 мл культуры, мкг/мл (2) и в мкг на 1 единицу оптической плотности Et (3) (оси ординат), от времени t (оси абсцисс) периодического культивирования менингококка серогруппы В штамма № 125 в биореакторе в среде Коэн-Виллер в разных опытах (а, б, в)

туры по кислороду может быть снято за счет постоянного поддержания в экспоненциальной фазе роста pO_2 на определенном уровне. Это приводило к увеличению скорости роста и продлению экспоненциальной фазы роста. При этом необходимо отметить, что максимальная удельная скорость роста менингококка зависела от содержания в среде кислорода. При поддержании pO_2 в среде в экспоненциальной фазе роста в пределах примерно от 20 до 50 % величина максимальной удельной скорости роста колебалась в пределах 0,64–0,16 1/ч, а при поддержании pO_2 примерно от 5 до 20 % этот показатель соответствовал 0,92–0,23 1/ч. При значениях растворенного в среде кислорода, близких к нулевым (воздух при этом постоянно подавался), величина максимальной удельной скорости роста равнялась 0,56–0,19 1/ч. Эти данные подтвердили представление о том, что лимит кислорода оказывает стрессорное воздействие даже в экспоненциальной фазе роста, что выражается в уменьшении значений максимальной скорости роста. Поэтому в дальнейшем использовали периодический процесс, в экспоненциальной фазе роста которого величины pO_2 были близки к нулевым.

Обобщая изложенное, можно заключить, что в начале стационарной фазы роста микроорганизмы испытывают совокупное влияние разных видов стрессоров, включая дефицит элементов питания и изменения физико-химических параметров культивирования.

Следующим этапом работы явилось изучение динамики накопления белка и его количественного перераспределения между культуральной жидкостью и клетками в культурах менингококка в условиях глубинного культивирования (см. рис. 11.1).

На рис. 11.1 прослеживаются закономерности накопления биомассы (кривая 1) и содержания клеточного белка (кривые 2, 3) в менингококковых культурах на различных этапах роста. Динамика накопления белка в клетках в разных опытах (а, б, в) существенно не отличалась, хотя максимальное его содержание наблюдалось в разное время. Общая закономерность накопления белка заключалась в следующем. Содержание клеточного белка (в мкг/мл) в первые часы роста (экспоненциальная фаза) увеличивалось, достигая максимальных значений в начале стационарной фазы роста. Затем его количество несколько снижалось. При пересчете содержания белка в клетках на единицу оптической плотности (OD) установлена та же закономерность. Накопление белка в культуральной жидкости повторяло кинетику накопления биомассы, достигая максимума в начале стационарной фазы роста.

С целью изучения влияния стрессорных условий культивирования на качественные характеристики белков менингококка на следующем этапе работы из культур менингококка серо-

группы В штаммов № 125 и 150, выращенных в среде Коэн-Виллер в биореакторе до разных фаз роста, были выделены АК. Результаты серотипирования этих АК в реакции преципитации в геле по Оухтерлони показали (табл. 11.1), что в экспоненциальной фазе роста культура характеризовалась следующим набором типовых антигенов: Т-2-7, Т-12, Т-13; в начале стационарной фазы роста — Т-2-7, Т-12, Т-14, Т-2-10, Т-15; в конце стационарной фазы роста культура имела более полный набор серотиповых антигенов: Т-2, Т-2-7, Т-2-10, Т-4, Т-6, Т-8-1, Т-12, Т-13, Т-14.

Таблица 11.1 Результаты серотипирования антигенных комплексов (АК), полученных из культур менингококка серогруппы В штамма № 125 разных фаз роста, в реакции преципитации в геле по Оухтерлони

Фаза роста культуры, к которой получены АК	Типоспецифическая активность АК*
Экспоненциальная фаза	Т-2-7, Т-12, Т-13
Начало стационарной фазы	Т-2-7, Т-2-10, Т-12, Т-14, Т-15
Конец стационарной фазы	Т-2, Т-2-7, Т-2-10, Т-4, Т-6, Т-8-1, Т-12, Т-13, Т-14

* В данной колонке представлены обозначения сывороток к серотиповым антигенам, с которыми изучаемые АК дали преципитаты

Результаты изучения в ВИЭФ состава АК, выделенных из клеток менингококка серогруппы В штамма № 125, выращенного в биореакторе в среде Коэн-Виллер до конца экспоненциальной и начала стационарной фаз роста, с указанными сыворотками показали следующее. Оба препарата АК реагировали с сыворотками, полученными к СТА — Т-2-7, Т-4, Т-5, Т-8, Т-15. АК начала стационарной фазы роста образовывали полосы преципитации, помимо названных выше, еще и дополнительно с сыворотками к СТА — Т-6, Т-9, Т-13, тогда как АК экспоненциальной фазы роста не реагировали с указанными сыворотками.

АК, полученные из культур менингококка серогруппы В штамма № 150 экспоненциальной фазы роста, в ВИЭФ не образовывали полосы преципитации с сыворотками к СТА — Т-1, Т-5, Т-11, Т-12 АК, выделенные из клеток стационарной фазы роста этого же штамма, вступали в реакцию с названными сыворотками. При этом выявлялись четкие полосы преципитации, т.е. наблюдалась та же закономерность, что и с препаратами АК штамма № 125. Иными словами, в ВИЭФ наибольшее количество полос преципитации с сыворотками к различным СТА образовывали АК, полученные из клеток начала стационарной фазы роста.

Результаты изучения АК с помощью ЭФ в ПААГ изображе-

ны на рис.11.2: представлены 3 денситограммы пептидного состава АК, полученные из клеток менингококка серогруппы В штамма № 125, выращенного в биореакторе до конца экспоненциальной фазы роста (кривая 1), начала стационарной фазы роста (кривая 2) и конца стационарной фазы роста (кривая 3). Кривая 1 демонстрирует, что АК экспоненциальной фазы роста содержал несколько пептидов, основным из которых являлся пептид с мол.м. 41 000 Д. Его содержание составляло 40–42 % от суммы площадей всех пиков данной денситограммы. Общая сумма площадей пиков пептидов с мол.м выше 41 000 Д составляла 18–20 %, пептидов с мол.м. от 20 000 до 41 000 Д – 37–39 %. Кривая 2 – изображение пептидного состава АК, выделенного из клеток начала стационарной фазы роста. Видно, что этот препарат в отличие от препарата АК экспоненциальной фазы роста содержал больший набор (10) пептидов, среди которых основным также являлся пептид с мол.м. 41 000 Д, однако его содержание несколько снижалось и составляло 27–29 %, остальные пептиды имели мол.м. 20 000, 22 000, 26 000, 28 000, 37 000, 44 000, 59 000, 86 000, 90 000 Д. Сумма площадей всех пиков пептидов с мол.м. от 20 000 до 41 000 Д оставалась на прежнем уровне и составляла 39–41 %, содержание пептидов выше 41 000 Д возрастало до 31–33 %. На рис.11.2 (кривая 3) изображена денситограмма пептидного состава АК конца стационарной фазы роста. Заметно, что по мере роста культуры содержание основного пептида 41 000 Д в процентном отношении оставалось на прежнем уровне 29–31 %, но уменьшалось содержание пептидов с мол.м. от 20 000 до 41 000 Д, они составляли 15–17 % от всей суммы площадей пиков, изображенных на данной денситограмме (кривая 3). Общее содержание пептидов выше 41 000 Д составляло 53–55 %.

С использованием метода ЭФ в ПААГ с DDS-На проведено определение пептидного состава лиофильно высушенной бесклеточной культуральной жидкости, полученной путем центрифугирования культур менингококков, выращенных до разных фаз роста. Результаты этих исследований представлены на рис. 11.3, из которого видно, что в препарате из культуральной жидкости, полученной из культуры менингококка серогруппы В стационарной фазы роста (кривая 2), можно выделить 12–15 минорных пептидов с мол.м. от 20 000 до 95 000 Д и 2 основных пептида с мол.м. 41 000 и 36 000 Д, процентное содержание которых соответственно равнялось 22–24 и 7–9

В препарате культуральной жидкости, полученной из культур экспоненциальной фазы роста (кривая 1), обнаруживается 1 основной пептид с мол.м. 41 000 Д, процентное содержание которого составляло 28–30, и 10–12 минорных пептидов с мол.м. от 20 000 до 95 000 Д. Сумма площадей пиков пептидов с мол.м. от 20 000 до 41 000 Д в культуральной жидкости

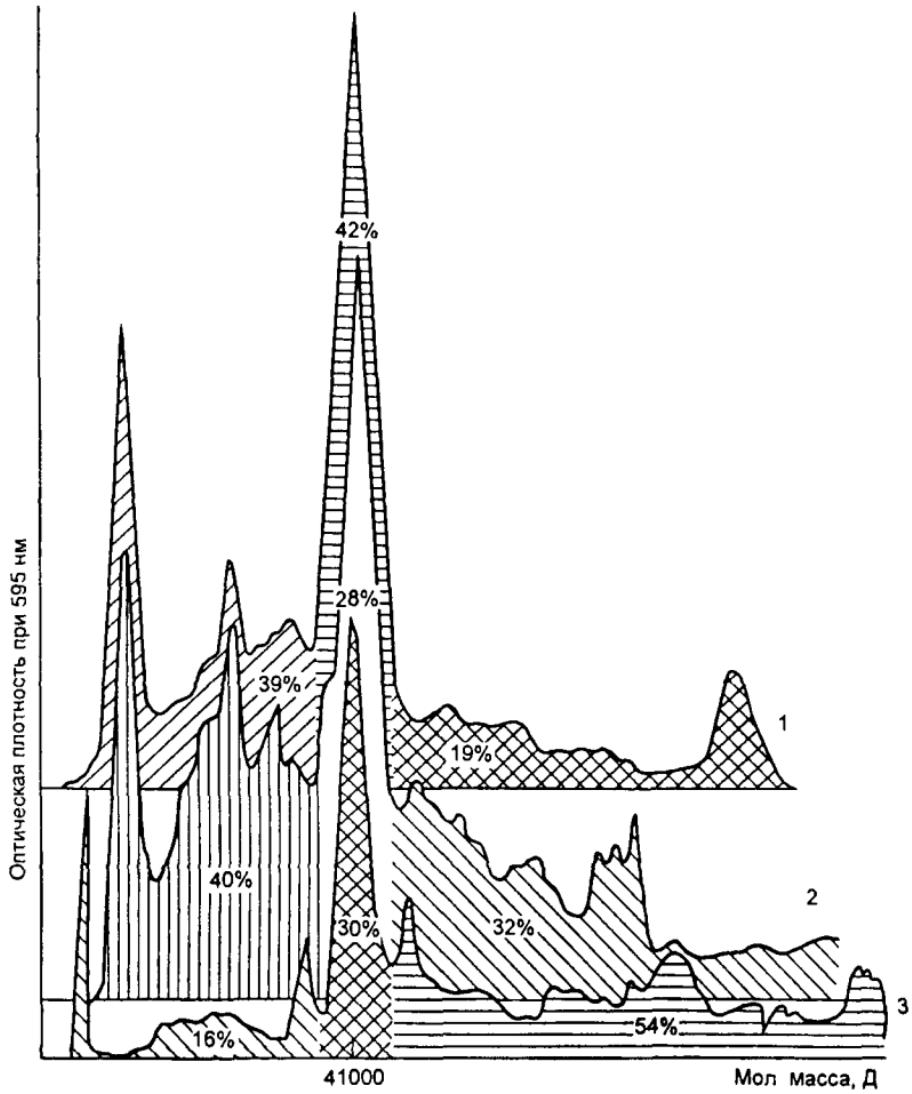


Рис. 11.2. Денситограммы препаратов антигенных комплексов (АК), полученных из клеток разных фаз роста менингококка серогруппы В штамма № 125, выращенного в биореакторе в среде Коэн-Виллер. По оси ординат — оптическая плотность при длине волн 595 нм, по оси абсцисс — мол. м., Д

Денситограммы

АК, выделенный из клеток экспоненциальной фазы роста (1), АК, выделенный из клеток начала стационарной фазы роста (2), АК, выделенный из клеток конца стационарной фазы роста (3)

Площади пиков денситограмм 1, 2 и 3 отражают содержание пептидов с разной мол. м. в процентах от суммы площади всех пиков (принятой за 100 %)

Денситограмма 1 горизонтальная штриховка — 41 000 Д, штриховка косая вправо — ниже 41 000 Д, сетка — выше 41 000 Д Денситограмма 2 без штриховки — 41 000 Д, вертикальная штриховка — ниже 41 000 Д, штриховка косая влево — выше 41 000 Д Денситограмма 3 сетка — 41 000 Д, штриховка косая влево — ниже 41 000 Д, горизонтальная штриховка — выше 41 000 Д

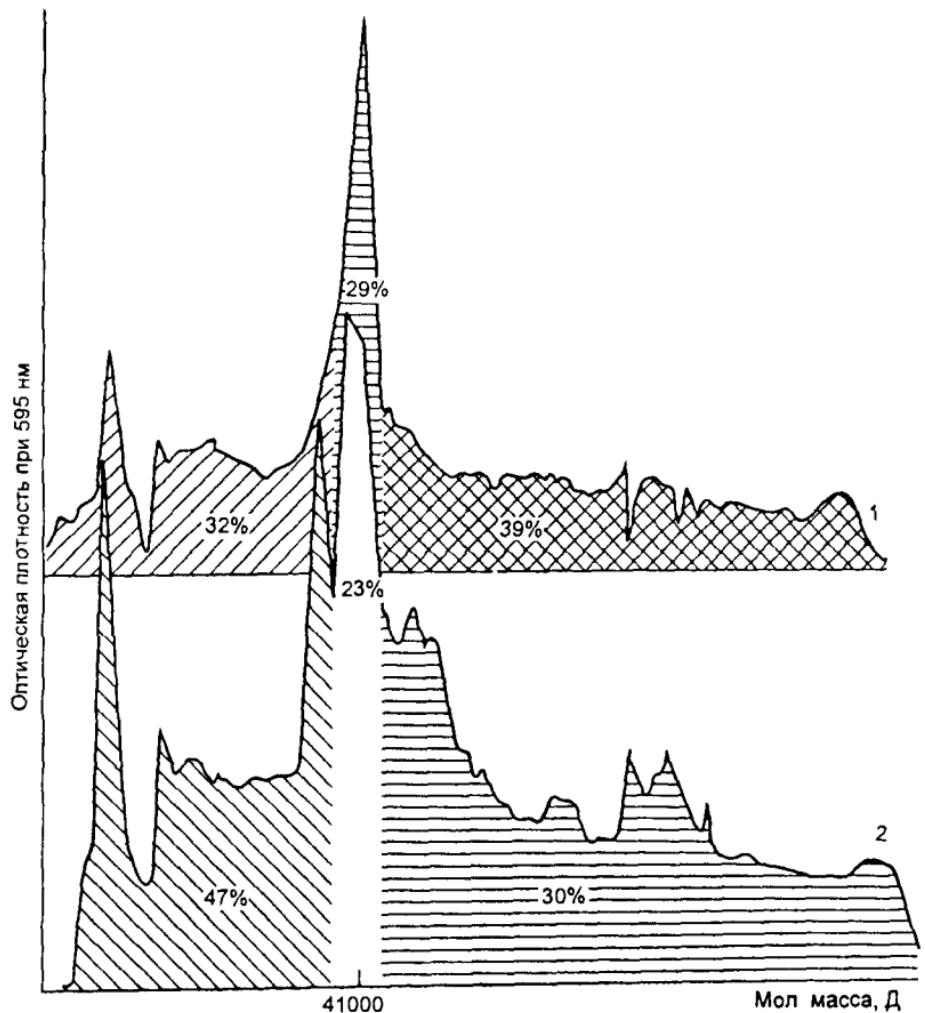


Рис. 11.3. Денситограммы бесклеточных культуральных жидкостей, полученных из культур менингококка серогруппы В штамма № 125, выращенных в биореакторе в среде Коэн-Виллер до конца экспоненциальной (денситограмма 1) и стационарной (денситограмма 2) без роста

По оси ординат — оптическая плотность при длине волн 595 нм, по оси абсцисс — мол. м., Д

Площади пиков денситограмм 1 и 2 отражают содержание пептидов с разной мол. м в процентах от суммы площадей всех пиков (принятой за 100 %)

Денситограмма 1 горизонтальная штриховка — 41 000 Д, штриховка косая вправо — ниже 41 000 Д, сетка — выше 41 000 Д. Денситограмма 2 без штриховки — 41 000 Д, штриховка косая влево — ниже 41 000 Д, горизонтальная штриховка — выше 41 000 Д

экспоненциальной фазы роста составляла 32–33 %, в культуральной жидкости стационарной фазы роста их содержание увеличивалось до 46–48 %. Сумма площадей пиков пептидов с мол.м выше 41 000 Д в указанных препаратах составила соответственно 38–40 и 29–31 %. Можно предположить, что этот результат объясняется лизисом части нежизнеспособных микробных клеток.

Далее было проведено сравнительное изучение сывороток, полученных иммунизацией кроликов культурами менингококка серогруппы В штамма № 125 разных фаз роста, с помощью иммунодиффузии в геле по Оухтерлони с использованием антигенных препаратов СТА типов T-1, T-2-7, T-4, T-5, T-6, T-8, T-9, T-11, T-12, T-13, T-14, T-15. Выявлена различная типоспецифическая активность.

Таблица 11.2 Результаты изучения сывороток, полученных иммунизацией кроликов культурами менингококка серогруппы В штамма № 125 разных фаз роста, в реакции преципитации в геле по Оухтерлони

Фаза роста культуры, к которой получены сыворотки	Типоспецифическая активность сывороток*	
	нативных	концентрированных
Экспоненциальная фаза	T-5 T-13	T-2-7, T-5, T-13
Начало стационарной фазы	T-2-7, T-5, T-13	T-1, T-2-7, T-5, T-9, T-11, T-13 T-15

* В данной колонке представлены обозначения серотиповых антигенов с которыми изучаемые сыворотки дали преципитаты.

Результаты экспериментальных исследований показали (табл. 11.2), что нативные сыворотки, полученные к микробной взвеси культур менингококков, выращенных до конца экспоненциальной фазы роста, образовывали полосы преципитации к T-5 и T-13. В концентрированных сыворотках выявлялись еще дополнительно преципитаты к T-2-7. Нативные сыворотки, полученные к культурам менингококка, взятым в стационарной фазе роста, реагировали с серотиповыми антигенами T-2-7, T-5, T-13. Указанные концентрированные сыворотки выявляли дополнительные полосы преципитации к СТА T-1, T-9, T-11, T-15 (см. табл. 11.2). Наиболее четкие преципитаты получены с концентрированными сыворотками.

11.2. Обсуждение

Представленные результаты исследования показали, что в начале стационарной фазы роста происходило количественное перераспределение белка между клетками и культуральной жидкостью. Повышенное содержание белка в культуральной жидкости в указанной фазе роста, очевидно, связано с интен-

сивным отщеплением фрагментов клеточной стенки во внешнюю среду. Это согласуется с данными литературы. В работах с использованием метода электронной микроскопии показано, что в конце экспоненциальной фазы роста менингококка наблюдаются интенсивное отщепление везикулов от поверхности клеток и их выброс в культуральную жидкость. Не исключено, что это может быть связано, во-первых, с истощением питательной среды; во-вторых, с ухудшением физико-химических параметров культивирования — с лимитом по кислороду и с защелачиванием культуральной среды и как следствие с действием этих стрессорных факторов на микробные клетки. В ответ на это действие микробные клетки адаптируются к новым стрессорным условиям, проявляя защитную реакцию, которая выражается не только в повышении синтеза белков, но и в увеличении набора серотиповых антигенов.

Полученные результаты исследования препаратов АК, выделенных из клеток разных фаз роста, в реакции преципитации в геле по Оухтерлони и в ВИЭФ позволили нам сделать вывод о том, что по мере перехода культуры от экспоненциальной фазы роста к стационарной фазе, т.е. по мере усиления действия стрессоров — истощение питательной среды, ухудшение физико-химических параметров культивирования и накопления метаболитов происходило увеличение числа регистрируемых серотиповых антигенов.

Суммируя данные по изучению пептидного состава АК ЭФ в ПААГ с DDS-Na можно сказать следующее. Основной пептид (41 000 Д), характеризующий типовую принадлежность штамма, присутствовал во всех АК, полученных из клеток разных фаз роста, и являлся мажорным, остальные пептиды в качестве минорных пептидов также обнаруживались в препаратах. Прослеживалась тенденция к снижению содержания низкомолекулярных пептидов в клетках при переходе от одной фазы роста к другой. В клетках экспоненциальной фазы роста они составляли 39 %, начала стационарной фазы роста — 40 %, конца стационарной фазы роста — 16 %. Увеличение их содержания в бесклеточной культуральной жидкости наблюдалось по мере роста культуры: 32 % в экспоненциальной фазе роста, 47 % в стационарной фазе роста. Кроме того, обнаружено увеличение количества пептидов с мол.м. от 41 000 до 95 000 Д в клетках при переходе от одной фазы роста к другой и т.д. (19 % в клетках экспоненциальной фазы роста, 32 % в клетках начала стационарной фазы роста, 54 % в клетках конца стационарной фазы роста). При этом необходимо отметить, что пептидный состав бесклеточной культуральной жидкости соответствовал пептидному составу АК, полученных из клеток. Кроме того, выявлено следующее: препарат — культуральная жидкость экспоненциальной фазы роста — содержал небольшой набор пептидов, но по мере увеличения срока культиви-

рования их набор в бесклеточной культуральной жидкости увеличивался. Подтверждением выявленных закономерностей явились результаты исследования сывороток, полученных при иммунизации кроликов культурами менингококка разных фаз роста. Показано, что в сыворотках стационарной фазы роста, когда наблюдается сочетанное влияние нескольких стрессоров — глубокие лимиты по субстратам, кислороду и т.д., выявляется наибольший спектр антител к серотиповым антигенам в сравнении со спектром антител в сыворотках, полученных при иммунизации животных культурами менингококка, выращенными до конца экспоненциальной фазы роста, когда действие стрессоров еще не велико.

В заключение следует отметить, что менингококки в ответ на неблагоприятные условия культивирования (сочетанное действие различных стрессоров при периодическом выращивании) в стационарной фазе роста усиливают синтез высокомолекулярных пептидов, связанных с поверхностью клетки, возможно играющих роль протекторов. При серотипировании менингококка необходимо обращать внимание на фазы роста культуры и состав питательной среды.

Глава 12

Влияние метилированного циклодекстрина на накопление коклюшного токсина в культуре *B.pertussis* в биореакторе

В последние годы внимание исследователей, разрабатывающих коклюшные вакцины, сосредоточено на коклюшном токсине как основном компоненте любого противококлюшного препарата.

Коклюшный токсин, по данным электронной микроскопии, иммуноэлектрофореза и ультрацентрифугирования, представляет собой специфические белковые структуры размером около 6 нм с мол. м. 105—117 кД [10]. Он состоит из 2 фрагментов, включающих 5 субъединиц, и в целом соответствует строению токсинов А—В структуры [285]. Фрагмент А коклюшного токсина представлен промотором С₁, несущим каталитическую активность, в то время как фрагмент В ответственен за фиксацию коклюшного токсина на поверхности клетки-мишени. Фрагмент В коклюшного токсина состоит из 2 димеров, каждый из которых включает субъединицу С₄. Димер D₁ дополнительно содержит субъединицу С₂, а димер D₂ — субъединицу С₃. Связующую роль между димерами выполняет субъединица С₅.

Мол. м. субъединиц соответственно равняется: $C_1 = 28-30$, $C_2 = 24-26$, $C_3 = 23-25$, $C_4 = 11-12$, $C_5 = 9,3-11,3$ кД [227].

По данным литературы, производные декстринов обладают стимулирующим действием на рост коклюшных бактерий, блокируя ингибирующее влияние ненасыщенных жирных кислот [155]. Есть сведения о том, что использование 2-б-0-диметил-β-циклогексстраина (β ЦД) оказывает стимулирующее действие на продукцию экзотоксина *B.pertussis* [285].

Целесообразным было исследование влияния метилированного циклогексстраина и на рост бактерий, и на накопление коклюшного токсина параллельно в одних и тех же процессах глубинного культивирования [44].

12.1. Объекты, методы и результаты исследований

Объектом исследований избран свежевыделенный от больных детей г. Уфы штамм *B.pertussis* № 30/85, культура которого обладала гистаминсенсибилизирующей активностью, высоким уровнем продукции коклюшного токсина и находилась в I фазе, т.е. была наиболее полноценна в антигенном отношении. Этот штамм, получивший название "Уфа-85", был принят на депонирование в коллекцию ГИСК им. Л.А.Тарасевича под № 173.

Для культивирования *B.pertussis* была использована синтетическая среда "С". Эта среда, кроме минеральных солей, содержала следующие аминокислоты: глутаминовую, аспарагиновую, лизин, триптофан, метионин, серин, цистин, аланин, глицин, лейцин, изолейцин и валин.

Посевным материалом для проведения периодического глубинного культивирования *B.pertussis* служила суспензия коклюшных бактерий, полученная путем смыва микробов с поверхности казеиново-угольного агара питательной средой, предназначеннной для проведения основного процесса.

Культивирование проводили в биореакторе "Анкум-2М" (Россия) при $36 \pm 0,2$ °C, содержании растворенного в среде кислорода от 20 до 30 % от полного насыщения и при поддержании величины pH на уровне 7,2–7,4 на протяжении всего процесса.

Концентрацию биомассы в процессе роста определяли по величине оптической плотности (OD) в соответствии с показаниями прибора, связанного с датчиком OD. Перевод значений экстинкции в Международные оптические единицы (МОЕ) осуществляли с помощью калибровочной кривой, для построения которой использовали отраслевой стандартный образец мутности (ОСО 42-59-85) ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Максимальную удельную скорость роста вычисляли по формуле [25]:

$$\mu = \frac{2,3 \times (\lg X_1 - \lg X_0)}{t_1 - t_0}, \quad (6)$$

где μ — максимальная удельная скорость роста; X_0 и X_1 — концентрация микроорганизмов в начале и конце отрезка времени; t_1 , t_0 — начало и конец отрезка времени.

Продуктивность процесса по выходу биомассы (Q_x) определяли по формуле:

$$Q_x = \frac{(X_1 - X_0)}{t} \text{ (МОЕ/ч).} \quad (7)$$

Морфологические свойства культур коклюшных бактерий на этапах культивирования оценивали в мазках, окрашенных по Граму.

Динамику накопления коклюшного токсина в культуральной среде на этапах культивирования оценивали в пробах надосадочной жидкости после центрифугирования при 30 000 G, т.е. в бесклеточной культуральной жидкости. Количественное определение коклюшного токсина осуществляли на основе ИФА [28]. Реакцию проводили в планшетах фирмы "Nunc", которые сенсибилизировали фетуином при 37 °C в течение 1 ч. Несвязавшийся фетуин отмывали 3 раза 0,1 М фосфатным буфером, содержащим 2% бычий сывороточный альбумин, для предотвращения неспецифического связывания, после чего вносили в лунки исследуемый материал. После инкубации в течение 1 ч при 37 °C планшеты отмывали и последовательно обрабатывали кроличьей антитоксической коклюшной сывороткой, а после инкубации и отмычки — антисывороткой к IgG кролика, меченной пероксидазой. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин, реакцию останавливали 4 N серной кислотой. Результаты реакции учитывали по экстинкции при 492 нм на приборе "Titerik-Uniscan". Для выражения коклюшного токсина в мг/л пользовались калибровочной кривой, полученной путем параллельного титрования ОСО 42-28-108-87.

Статистическую обработку результатов проводили путем расчета доверительных интервалов при уровне вероятности $P = 0,95$ по известным формулам [5].

В табл. 12.1 представлены сведения о содержании коклюшного токсина в бесклеточной культуральной жидкости по часам роста штамма № 173 в синтетической питательной среде "С". При изучении ростовых и токсигенных свойств штамма в условиях глубинного гомогенного культивирования в среде "С" без добавления ВЦД установлена достаточно высокая максимальная удельная скорость роста 0,184 — 0,232 1/ч и высокая продуктивность по выходу биомассы (3,35 МОЕ/ч). Максимальный уровень токсинообразования, по данным З последо-

вательных процессов культивирования, составил 2,0 мг/л и характеризовался пиком накопления токсина в среде через 18 ч от начала культивирования, что соответствовало фазе замедления скорости роста.

Таблица 12.1 Динамика накопления коклюшного токсина в бесклеточной культуральной жидкости в условиях периодического глубинного гомогенного культивирования *B.pertussis* штамма № 173 в синтетической питательной среде "С"

Часы роста	Концентрация микроорганизмов в lg 100El*	Содержание коклюшного токсина в мг/л
2	1,03	0,06 0,18
		0,10
4	1,22	0,13 0,17
		0,15
6	1,36	0,07 0,57
		0,20
9	1,54	0,23 0,42
		0,31
10	1,58	0,39 0,63
		0,50
12	1,66	0,87 0,93
		0,90
14	1,74	1,28 1,51
		1,38
16	1,78	1,25 3,16
		1,80
18	1,84	1,73 2,29
		2,00
20	1,90	1,68 2,13
		1,91
22	1,93	1,54 1,60
		1,57
24	1,95	1,25 1,65
		1,30

* Представленные данные отражают среднегеометрические значения, рассчитанные на основании 3 однотипных экспериментов

В табл. 12.2 представлены данные накопления биомассы и динамики токсинообразования коклюшных бактерий при периодическом глубинном гомогенном культивировании в той же среде с добавлением ВЦД в дозе 0,1 мг/л культуральной жидкости. Они отражают среднегеометрические значения, рассчитанные на основании 3 однотипных экспериментов. Динамика роста и токсинообразования при использовании ВЦД была во многом аналогична базовому процессу (см. табл. 12.1), что наглядно видно из полученных результатов: максимальная удельная скорость роста составила 0,181 — 0,268 1/ч, а продук-

тивность по выходу биомассы 2,84 МОЕ/ч. Однако следует отметить, что кинетика токсинаобразования лишь на начальных этапах культивирования была тождественна кинетике базового процесса. При использовании ВЦД процесс накопления токсина был более растянут во времени, т.е характеризовался несколько большей длительностью. При переходе культуры в стационарную фазу концентрация токсина оставалась на достигнутом уровне на протяжении наблюдаемого отрезка времени (см. табл. 12.2). По табл. 12.2 видно, что максимальное содержание коклюшного токсина в культуральной среде наблюдалось на 26 — 28 ч роста и составило 19,2 — 19,4 мг/л, т.е. было в 10 раз выше по сравнению с базовым процессом.

Таблица 12.2 Динамика накопления коклюшного токсина в бесклеточной культуральной жидкости в условиях периодического глубинного гомогенного культивирования *B. pertussis* штамма № 173 в синтетической питательной среде "С" с добавлением 2-6-0-диметил-β-циклогексстраина

Часы роста	Концентрация микроорганизмов в Ig 100Et*	Содержание коклюшного токсина в мг/л
2	0,70	0,047 1,060 0,070
4	0,85	0,059 0,107 0,081
6	0,98	1,00 1,090 1,020
8	1,20	0,871 1,200 1,110
10	1,36	1,230 1,340 1,300
12	1,50	1,320 1,690 1,500
14	1,64	1,000 2,300 2,000
16	1,72	1,940 2,223 2,100
18	1,78	3,610 6,910 5,010
20	1,85	5,880 8,500 7,100
22	1,90	5,620 14,400 9,100
24	1,92	12,500 18 100 15,100
26	1,96	18,100 19,900 19,200
28	1,96	17,300 21,800 19,400

* Представленные данные отражают среднегеометрические значения рассчитанные на основании 3 однотипных экспериментов

12.2. Обсуждение

В известной нам литературе не встречались данные, объясняющие механизм действия βЦД и других производных декстринов на процесс токсинопродукции. Есть предположение о том, что реализация его действия, помимо блокирования ненасыщенных жирных кислот, может быть связана с комплексированием с глутатионом, играющим важную роль в процессе роста и токсинообразования [57]. Однако в используемой среде глутатион отсутствовал.

Существенное влияние на уровень накопления токсина в культуре оказывает и замедление процесса его деградации. При обычных условиях культивирования процессы секреции токсина и его деградации находятся в динамическом равновесии. При переходе культуры в стационарную фазу роста в результате деградации части клеток и нарушения проницаемости цитоплазматических мембран происходит нарастание уровня протеолитических ферментов в культуре и усиление процесса разрушения токсина. С другой стороны, полученные данные об увеличении периода активного роста *B.pertussis* и токсинообразования под влиянием βЦД позволяют сделать предположение об изменении метаболизма микробы и повышении стабильности цитоплазматических мембран клеток.

βЦД может действовать как стрессор, влияющий не столько на рост бактерий, сколько на синтез коклюшного токсина как белка-протектора, позволяющего микробным клеткам выжить в создавшихся условиях.

Подтверждением является то, что в присутствии βЦД в культуральной среде в фазе замедления скорости роста происходит увеличение синтеза коклюшного токсина микробной клеткой в 10 раз по сравнению с условиями, в которых отсутствует βЦД. Это согласуется с представлениями [41, 42], что основным показателем состояний стресса у бактерий является повышение синтеза полимеров.

Заключение

Под воздействием различных неблагоприятных факторов (стрессоров) в популяциях бактерий происходят изменения, приводящие к состоянию стресса, наивысшей формой которого является шок. Культуры бактерий, находящихся в таких состояниях, характеризуются значительными морфологическими изменениями, а также синтезом дополнительных веществ, играющих роль протекторов. Наиболее изучены в этом отношении стрессорные БТШ, появляющиеся под воздействием повышенной температуры. Впервые БТШ были обнаружены в начале 80-х годов у микробактерий и позднее выявлены у более 50 видов бактерий, а также у паразитов и млекопитающих. Практический интерес к стрессорным белкам патогенных бактерий определяется тем, что последние могут рассматриваться в качестве антигенов, имеющих большое значение в иммунологии.

Показана однотипность реакции различных видов и родов бактерий на действие низкой температуры. Холод индуцирует гены холодового шока, в результате чего происходят значительные изменения в регуляции синтеза белков. Подавляется синтез основных белков микробной клетки. Однако синтезируется множество новых белков, так называемых белков холодового шока. Главным из этого семейства белков является CspA *E.coli*, который активизирует трансляцию других генов холодового шока и негативно регулирует экспрессию своего собственного гена. Гомологии CspA *E.coli* были идентифицированы у многих бактерий. Они могут быть найдены и у других микроорганизмов, в том числе у возбудителей инфекционных болезней. Этим можно объяснить наличие общих антигенов у разных бактерий, что необходимо учитывать в вопросах идентификации бактерий, а также при разработке иммунодиагностических препаратов, если в их технологии есть стадия охлаждения культуры.

Анализ данных литературы позволил установить преемственность, взаимосвязь и приоритет отечественных исследований 70–80-х годов, посвященных голоданию бактерий как стрессу, вызванному лимитом субстрата, и работ 90-х годов, касающихся голодания бактерий — starvation stress. Это состояние характеризуется синтезом дополнительных, так называемых стрессорных белков, которые не только обеспечивают выживание бактерий в условиях лимита субстрата, но и защищают их от ряда других стрессоров (cross protection). Несмотря на то что расшифрованы генетические механизмы регуляции

синтеза некоторых из стрессорных белков, их значение в микробиологической технологии остается неизученным. Наиболее важная их роль как протективных антигенов, необходимых для конструирования вакцин нового поколения, требует отдельного анализа.

Оксидативный стресс у бактерий обусловлен действием реактивных форм кислорода (O_2 , H_2O_2 и OH) в качестве средовых стрессоров, повреждающих ДНК, РНК, белки и клеточные мембранные. Описаны эффективные механизмы защиты бактерий от этих стрессоров с помощью продуктов (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза), обезвреживающих реактивные формы кислорода.

На многих примерах показано значение кислотного стресса для их выживания в окружающей среде

Кислотный стресс характеризуется глубокими изменениями в жизнедеятельности бактерий: увеличением синтеза одних белков, которые защищают их от повышенной кислотности и других стрессоров, и снижением синтеза других белков; экспрессией генов, включением регуляторных локусов и т.д. Тolerантность к кислоте — реакция на закисление среды — наиболее заметное для исследователя звено в цепи последовательных событий, происходящих в микробной популяции после изменения pH.

Значение кислотного стресса зависит от той роли, которую играют бактерии в жизни человека. Тolerантность к кислоте позволяет бактериям полости рта выживать и размножаться в своей экологической нише, вызывая и поддерживая развитие кариеса, толерантность к кислоте помогает энтеропатогенным возбудителям преодолевать кислотный барьер желудка, чтобы достичь свою нишу в кишечнике и вызвать инфекционное заболевание. Аналогичный механизм позволяет бактериям-пробиотикам попадать в кишечник и там размножаться, обеспечивая выздоровление человека от дисбактериоза.

Изложенное свидетельствует, что кислотный стресс у бактерий имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

Проведен анализ роли стрессорных белков в проявлении вирулентности патогенных бактерий на примерах *Salmonella*, *Neisseria*, *Listeria*, *Francisella* и др. Приведены данные, подтверждающие, что экспрессия генов вирулентности активизируется внешними стрессорами, такими как высокая температура, низкий pH, лимит железа, низкое содержание кислорода. Показана связь между синтезом бактериями стрессорных белков и фенотипическим выражением их вирулентности. Эти сведения необходимо учитывать при разработке вакцин и иммунодиагностических препаратов.

На многих примерах показано значение кислотного стресса для их выживания в окружающей среде

Проблемы стресса у бактерий и стрессорных белков в настоящее время приобретают особый интерес. Это связано с гомологией многих стрессорных белков не только разных видов и родов бактерий, но и некоторых общих бактериальных стрессорных белков с антигенами человека. В книге подобраны работы последних лет, посвященные этому вопросу [171, 172, 194, 232, 316].

Предложен КС деления клеток для микробных популяций на примере *S.typhi*, основанный на предположении о нормальном распределении количества клеток с разной продолжительностью генерации в популяции после стрессорного (шокового) воздействия. КС равен отношению дисперсии продолжительностей генерации клеток в популяции к средней величине продолжительности генерации всей популяции и определяется из параметров математической модели. Количественные значения параметров модели получены при минимизации ошибки между расчетными и экспериментальными данными. КС использовали для оценки и выбора оптимального стрессорного воздействия при синхронизации деления *S.typhi*.

Штаммы *S.typhi* Ту₂ 4446 и Vi-1S многократно пассировали в жидкой голодной синтетической питательной среде, содержащей, кроме воды и солей, глюкозу. При адаптации культур к этим стрессорным условиям (starvation stress) наблюдали увеличение выхода биомассы от пассажа к пассажу. В процессе накопления Vi- и O-антител отмечена разница у 2 изучаемых штаммов. В культурах штамма Ту₂ 4446 увеличение содержания антигена от пассажа к пассажу было незначительным. В культурах штамма Vi-1S было обнаружено 4—5-кратное увеличение содержания Vi- и O-антител. Отношение Vi-антитела к O-антителу по мере адаптации культуры изменялось для штамма Ту₂ 4446 от 1:57 до 1:20, для штамма Vi-1S оно составляло 1:2,7 и 1:2,2. Штамм Ту₂ 4446 имел преимущество перед штаммом Vi-1S в отношении синтеза O-антитела, в то время как последний имел преимущество в синтезе Vi-антитела. Эти данные свидетельствуют о целесообразности использования для получения противотифозной вакцины не только штамма Ту₂ 4446, но и штамма Vi-1S, особенно при изготовлении вакцины на основе Vi-антитела.

Осуществлены процессы выращивания *E.coli* NAT 99-50R в синтетической питательной среде, содержащей соли металлов (азотнокислое железо, азотнокислый лютеций, азотнокислый церий), возможно играющих роль стрессоров. Показано, что добавление в синтетическую питательную среду солей металлов в разных концентрациях по-разному влияло на пенициллинацилазную активность культуры *E.coli*. Эта активность повышалась по сравнению с контролем в 7—10 раз при выращивании микроорганизмов в синтетической среде с добавлением азот-

нокислого железа в концентрации 0,0001 % или азотнокислого лютеция в концентрации 0,01 %.

Средовые стрессоры оказывают влияние на белки наружной мембранны *N.meningitidis* серогруппы В в процессе периодического культивирования в биореакторе. Бесклеточная культуральная жидкость культуры экспоненциальной фазы роста *N.meningitidis* серогруппы В штамма № 125 содержала небольшой набор серотиповых антигенов, но по мере увеличения срока культивирования их набор в бесклеточной культуральной жидкости увеличивался. Подтверждением выявленных закономерностей явились результаты исследования сывороток, полученных при иммунизации кроликов культурами менингококка разных фаз роста. Показано, что в сыворотках стационарной фазы роста, когда наблюдается сочетанное влияние нескольких стрессоров — лимиты по субстратам, кислороду и т.д., выявляется наибольший спектр антител к серотиповым антигенам в сравнении со спектром антител в сыворотках, полученных при иммунизации животных культурами менингококка, выращенными до конца экспоненциальной фазы роста, когда действие стрессоров еще невелико. Следует отметить, что менингококки в ответ на неблагоприятные условия культивирования (сочетанное действие различных стрессоров при периодическом выращивании) в стационарной фазе роста усиливают синтез высокомолекулярных пептидов, связанных с поверхностью клетки, возможно, играющих роль протекторов. При серотипировании менингококка необходимо обращать внимание на фазы роста культуры.

Результаты показали, что β ЦД оказывает влияние на рост *B.pertussis* и накопление коклюшного токсина при периодическом глубинном культивировании в биореакторе. В присутствии β ЦД в дозе 0,1 мг/л культуральной жидкости в фазе замедления скорости роста происходит увеличение синтеза микробной клеткой коклюшного токсина в 10 раз по сравнению с условиями, в которых отсутствует β ЦД. Нельзя исключить, что β ЦД может действовать как стрессор, влияющий на синтез коклюшного токсина — белка-протектора, позволяющего микробу выжить в создавшихся условиях.

Анализ, приведенный в книге, свидетельствует о следующем:

- работы отечественных ученых 60—80-х годов, посвященные синхронизации деления микробных клеток, управляемому и непрерывному их культивированию в условиях лимита субстрата (голодание) и действия других стрессоров, приобрели молекулярно-генетическую основу;
- исходя из современных представлений о стрессе у бактерий, необходимо по-новому осмысливать уже имеющиеся

экспериментальные данные и делать выводы, важные для последующих исследований;

- зная фазы роста периодического процесса культивирования микроорганизмов и режимы непрерывно-проточного культивирования, следует выбирать необходимую фазу или режим, соответствующие целям конкретного исследования;
- при разработке вакцин не получать популяции в фазах замедления скорости роста или начала стационарной, когда под сочетанным действием нескольких стрессоров синтезируются общие для разных видов микроорганизмов стрессорные белки. Некоторые из них, но не те, которые имеют общие эпитопы с антигенами человека, могут быть кандидатами будущих монокомпонентных, но поливалентных вакцин;
- при разработке иммунодиагностических препаратов следует предпочитать фазу экспоненциального роста, в которой исключается действие стрессоров, и поэтому культура становится наиболее специфичной — характерной для данного вида и штамма;
- следует развивать исследования на стыке микробиологической технологии и молекулярной генетики бактерий для того, чтобы как можно ближе подойти к интереснейшему направлению — управляемому стрессу у бактерий, который позволит, используя тот или иной стрессор, получать культуры с заданными характеристиками.

Список литературы

1. Алексахина Н.Н., Баснакьян И.А. Влияние стрессоров на белки наружной мембранны *Neisseria meningitidis* серогруппы В в процессе (периодического) культивирования (в биореакторе)//Вестник РАМН.—1999.—№ 11.—С. 48—54.
2. Алексахина Н.Н., Баснакьян И.А., Романова Н.Б., Суханов Ю.С. Влияние ионов металлов на продукцию пенициллинацилазы культурой *Escherichia coli* штамма Nat-99 50 R//Журн. микробиол.—2001.—№ 3.—С.11—13.
3. Алексахина Н.Н., Баснакьян И.А., Сараева Л.В. Стукалова Н.В. Разработка и изучение периодического и многоциклического культивирования с подпиткой глюкозой менингококка серогруппы В//Журн.микробиол.—1992.—№ 2.—С. 19—22.
4. Андреев В.С., Богрянцева Е.А., Осипов Г.А., Попов В.Г., Сергеева Л.Л., Шабанова У.А. Эксекреция и активация регуляторов стрессустойчивости микроорганизмов при различных внешних воздействиях на культуру//Биотехнология.—1991.—№ 6.—С. 28—32.
5. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.— Л.: Медгиз, 1962.—180 с.
6. Баснакьян И.А. Синхронизация деления брюшнотифозных бактерий для изучения их биологических свойств: Автореф. дис. ... канд.мед.наук.—М., 1965.
7. Баснакьян И.А. Экспериментально-аналитическое исследование жизнедеятельности *Salmonella typhi* при непрерывном культивировании. Автореф. дис. ... д-ра биол.наук. — М., 1974.
8. Баснакьян И.А., Боровкова В.М., Кузьмин С.Н. Патология и физиология микробов//Журн. микробиол.—1981.—№ 9.—С. 14—19.
9. Баснакьян И.А. Патология и физиология микробов. Усовершенствование технологии культивирования//Журн. микробиол.—1982.—№ 12.—С.28—33.
10. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.—М.: Медицина, 1992.—189 с.
11. Баснакьян И.А., Мельникова В.А. Стрессорные белки у бактерий//Журн. микробиол.—1996.—№ 6.—С. 99—103.
12. Баснакьян И.А., Алексахина Н.Н., Львов В.Л., Суханов Ю.С., Алексеев В.Е. Сравнение выхода Vi- и O-антител в процессах адаптации 2 штаммов *Salmonella typhi* к стрессорным условиям культивирования//Журн. микробиол.—2000.—№ 2.—С. 22—25.
13. Баснакьян И.А., Мельникова В.А. Голодание бактерий — стресс, обусловленный лимитом субстрата//Журн. микробиол.—2001.—№ 1.—С. 99—103.

14. Баснакъян И.А. Холодовой шок у бактерий//Вестн. РАМН.—2001.—№ 3.—С. 18—21.
15. Баснакъян И.А., Бондаренко В.М., Мельникова В.А., Беляевская В.А. Стress-индуцибелльные бактериальные белки и вирулентность//Журн. микробиол.—2001.—№ 5.—С. 101—108.
16. Большая медицинская энциклопедия/Под ред. Ф.Н.Бакулева.—М., 1957.—Т. 4.—С. 47—67; Т. 23.—С. 511—518; Т.31.—С.608—630; Т. 39.—С. 679—680.
17. Бондаренко Н.С. Изучение свойств пенициллинацилазы *Escherichia coli*. Автореф. дис. ... канд. мед. наук.—М., 1970.
18. Бондаренко В.М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса//Журн. микробиол.—1999.—№ 5.—С. 34—39.
19. Ван дер Варден Б.Л. Математическая статистика.—М.: Иностранная лит., 1960.—432 с.
20. Волков В.Я. Анализ влияния осмотического стресса и температуры на физиолого-биохимическое состояние микробных клеток, подвергнутых лиофильному высушиванию//Микробиология.—1994.—Т. 63.—Вып.1.—С. 5—16.
21. Воробьев А.А. Современные направления в разработке новых иммунобиологических препаратов//Журн. микробиол.—1999.—№ 5.—С. 16—21.
22. Дельвиг А.А., Семенов Б.Ф., Розенквист Э., Робинсон Д.Г. *Neisseria meningitidis*: от антигенной структуры к новому поколению вакцин.—М.: Медицина, 2000.—250 с.
23. Дружинин О.Г., Баснакъян И.А. Критерий синхронизации деления клеток для оценки стрессорного воздействия на популяцию *Salmonella typhi*//Журн. микробиол.—2000.—№ 1.—С.24—27.
24. Иванов В.Н., Угодчиков Г.А. Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций—Киев: Наукова думка, 1984.—278 с.
25. Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов.—М., 1963.—357 с.
26. Ильницкая И.Ю., Кузьмин С.Н. Закономерности роста и токсинообразования *Corynebacterium diphtheriae* при трехциклическом культивировании//Процессы культивирования патогенных микроорганизмов/НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова.—М., 1981.—С. 67—73.
27. Кузовникова Т.А. О механизмах ингибирования и стимуляции роста *Escherichia coli* ртутью (Hg^{2+})//Лимитирование и ингибирование роста микроорганизмов: Тез.докл. Всесоюз. конф. Дек.1989 г.— Пущино, 1989.—С.49—50.
28. Максютов Р.В., Смирнов В.Д., Сюндюкова Р.А. и др. Научно-производственные проблемы улучшения качества вакцинино-сывороточных препаратов: Сб. тр. ТашНИИВС. Вып.2—Ташкент, 1986.—С. 28—30.
29. Медуницын Н.В. Вакцинология.—М.: Триада-Х, 1999.—272 с.
30. Мельникова В.А., Баснакъян И.А. Изучение содержания макромо-

- лекулярных соединений при непрерывном культивировании ти-
фозных бактерий//Журн микробиол —1972 — № 2 —С 11—16
- 31 *Мельникова В А , Баснакьян И А , Ратникова Т Н , Власенко А П* Патология и физиология микробов Сообщение 3 Критерии оценки функциональных состояний//Журн микробиол —1984 № 1 —С 42—46
- 32 *Мельникова В А , Баснакьян И А* Патология и физиология мик-
робов Сообщение 4 Экономический и метаболический коэффи-
циенты в оценке функциональных состояний *S typhi*//Журн мик-
робиол —1984 — № 5 —С 62—67
- 33 *Мельникова В А , Баснакьян И А* Экономический коэффициент как показатель физиологического и патологического состояний микроорганизмов//Журн микробиол —1984 — № 11 —С 9—11
- 34 *Мельникова В А , Баснакьян И А , Запорожцев Л Н , Власенко А П , Ратникова Т Н* Изучение экономических показателей в процессе периодического и многоциклического культивирования *C perfringens* типа A//Журн микробиол —1984 — № 11 —С 65—68
- 35 *Николаев Ю А* Защитное влияние тетрациклиновчувствительного штамма *Escherichia coli* на рост тетрациклинустойчивого штамма в присутствии тетрациклина при совместном культивировании//Микробиология —1996 —Т 65 —№6 —С 745—748
- 36 *Николаев Ю А* Множественный защитный эффект экзометаболита (экзаметаболитов), выделяемого *Escherichia coli* при обработке тетрациклином//Микробиология —1996 —Т 65 —№6 —С 749—752
- 37 *Николаев Ю А* Участие экзаметаболитов в адаптации *Escherichia coli* к стрессам//Микробиология —1997 —Т 66 —№1 —С 38—41
- 38 *Николаев Ю А* Сравнительное изучение свойств двух внеклеточных протекторов, выделяемых *Escherichia coli* при повышенной температуре//Микробиология —1997 —Т 66 —№6 —С 790—795
- 39 *Позмогова И Н* Культивирование микроорганизмов в перемен-
ных условиях —М , 1983 —201 с
- 40 *Работнова И Л* Пути управления биосинтезом у микроорганиз-
мов Обзор литературы//Управление биосинтезом микроорганиз-
мов —Красноярск, 1973 —С 242—244
- 41 *Работнова И Л , Позмогова И Н* Хемостатное культивирование и ингиби-
рование роста микроорганизмов —М Наука, 1979 —
207 с
- 42 *Работнова И Л , Позмогова И Н , Баснакьян И А* Хемостатное и
периодическое культивирование при изучении физиологии мик-
роорганизмов//Итоги науки и техники Сер “Микробиоло-
гия” Т 11 Культивирование микроорганизмов —М ВИНИТИ,
1981 —С 3—54
- 43 *Рощина Е К , Петров Л Н* Выделение белка во внеклеточное
пространство как неспецифическая реакция *Escherichia coli* на
стресс//Микробиология —1997 —Т 66, № 2 —С 179—184
- 44 *Сюндюкова Р А , Баснакьян И А , Стукалова Н В , Алексахина Н Н*
Влияние метилированного циклодекстрина на накопление кок-

- люшного токсина в культуре *Bordetella pertussis* в биореакторе//Журн микробиол — 1999 — № 6 — С 14—17
- 45 *Фаньковская Э К, Костюкова Н Н, Круман И И* Культивирование *Neisseria meningitidis* серогруппы А на полусинтетических жидких питательных средах//Журн микробиол — 1975 — № 9 — С 92—96
- 46 *Феофилова Е П* Трегалоза, стресс и анабиоз//Микробиология — 1992 — Т 61, № 5 — С 741—755
- 47 *Феофилова Е П* Изменения в углеводном и липидном составе мицелия *Cunninghamella japonica* во время длительного высокотемпературного стресса//Микробиология — 1993 — Т 62, № 1 — С 62—69
- 48 *Феофилова Е П* Биохимическая адаптация грибов к температурным воздействиям//Микробиология — 1994 — Т 63, № 5 — С 757—776
- 49 *Циоменко А Б, Туиметова Г П* Секреторные белки теплового шока дрожжей — новое семейство стрессорных белков//Биохимия — 1995 — Т 60 — Вып 6 — С 837—842
- 50 *Abshire K Z, Neidhardt F C* Growth rate paradox of *Salmonella typhimurium* within host macrophage//J Bact — 1993 — Vol 175 — P 3744—3748
- 51 *Allan E, Mullany P, Tabaqchali S* Construction and characterization of a *Helicobacter pylori* clpB mutant and role of the gene in the stress response//J Bact — 1998 — Vol 180, N 2 — P 426—429
- 52 *Apuche-Aranda C V, Racoosin E L, Swanson J S, Miller S I* *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes//J exp Med — 1994 — Vol 179 — P 601—608
- 53 *Amin U S, Lash T D, Wilkinson B T* Proline betaine is a highly effective osmoprotectant for *Staphylococcus aureus*//Arch Microbiol — 1995 — Vol 163, N 2 — P 138—142
- 54 *Andaythapani S, Mudd M, Deretic V* Interactions of oxyR with the promoter of the oxyR and ahpc genes from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*//J Bact — 1994 — Vol 176 — P 2401—2409
- 55 *Antelmann H, Bernardt J, Schmid R, Hecker M* A gene at 333^O on the *Bacillus subtilis* chromosome encodes the newly identified δb-dependent general stress protein Gsp A//J Bact — 1995 — Vol 177 — P 3540—3545
- 56 *Antelmann H, Engelmann S, Schmid R, Sorokin A, Lapigus A, Hecker M* Expression of a stress- and starvation-induced dbs/pexB-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor δb in *Bacillus subtilis*//J Bact — 1997 — Vol 179 — P 7251—7256
- 57 *Arai H, Munoz J J* Fimbrial hemagglutinin in stationary and shake cultures of *Bordetella pertussis*//Infect Immun — 1979 — Vol 25, N 2 — P 764—767
- 58 *Arnold C N, McElhanon J, Lee A, Leonhart R, Siegele D A* Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response//J Bact — 2001 — Vol 183, N 7 — P 2178—2186

- 59 *Audia J, Webb C C, Foster J W* Breaking through the acid barrier An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria//Ijmm Int J Med Microbiol —2001 —Vol 291, N 2 —P 97—106
- 60 *Av-Gay Y, Y Aharonowitz, G Cohen* Streptomyces contains a 70 kDa cold shock like protein//Nucleic Acids Res —1992 —Vol 20 —P 5478
- 61 *Bae W, Jones P G, Inouye M* CspA, major cold shock protein Escherichia coli, negatively regulates its own gene expression//J Bact —1997 —Vol 179 —P 7081—7088
- 62 *Ban-Yang Chang, Kuo-Yen Chen, Yu-Der Wen, Chao-Tsai Liao* The response of a *Bacillus subtilis* temperature-sensitive *sigA* mutant to heat stress//J Bact —1994 —Vol 176, N 11 —P 3102—3110
- 63 *Baumler A J, Kusters J G, Stojilkovic I, Heffron F* *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages//Infect and Immun —1994 —Vol 62 —P 1623—1630
- 64 *Bearson B L, Wilson Lee, Foster J W* A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress//J Bact —1998 —Vol 170, N 9 —P 2409—2417
- 65 *Benoit S, Benachour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke A* Induction of *vap* genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response//Res Microbiol —2001 —Vol 152, N 5 —P 439—449
- 66 *Benson A K, Haldenwang W G* Characterization of a regulatory network that controls δb expression in *Bacillus subtilis*//J Bact —1992 —Vol 174 —P 749—757
- 67 *Benson A K, Haldenwang W G* The δb -dependent promoter of the *Bacillus subtilis* *sigB* operon is induced by heat shock//J Bact —1993 —Vol 175 —P 1929—1935
- 68 *Benson A K, Haldenwang W G* *Bacillus subtilis* δb is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase//Proc Natl Acad Sci USA —1993 —Vol 90 —P 2330—2334
- 69 *Benson A K, Haldenwang W G* Regulation of δb levels and activity in *Bacillus subtilis*//J Bact —1993 —Vol 175 —P 2347—2356
- 70 *Belden W J, Miller S I* Further characterization of the PhoP regulon identification of new PhoP-activated virulence loci//Infect and Immun —1994 —Vol 62 —P 5059—5101
- 71 *Benjamin W H, Yother J, Hall P, Briles D E* The *Salmonella typhimurium* locus *mviA* regulates virulence in *Ity^s* mice functional *mviA* results in avirulence, mutant (nonfunctional) *mviA* results in virulence//J exp Med —1991 —Vol 174 —P 1073—1083
- 72 *Berger F, Moreller N, Menu F et al* Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis*//J Bact —1996 —Vol 178 —P 2999—3007
- 73 *Bhagvat A A, Apte Shree Kumar* Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp strain H-31//J Bact —1989 —Vol 171, N 9 —P 5187—5189

- 74 *Bhatnagar N B, Getachew E, Straley S et al* Reduced virulence of rifampicin resistant mutant *Francisella tularensis*//J infect Dis — 1994 —Vol 170 —P 841—847
- 75 *Bhatnagar N B, Elkins K L, Fortier A H* Heat stress alters the virulence of a rilampin-resistant mutant of *Francisella tularensis* LVS//Infect and Immun —1995 —Vol 63, N 1 —P 154—159
- 76 *Blackwell J R, Gilmour D J* Physiological response of the unicellular green algal *Chlorococcus submarinum* to rapid changes in salinity//Arch Microbiol —1991 —Vol 157, N 1 —P 86—91
- 77 *Blanco M, Herrera G, Urios A* Increased mutability by oxidative stress in oxyr-deficient *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cells-clonal occurrence of mutants during growth on nonselective media//Mutation Research Lett —1995 —Vol 346 —Iss 4 —P 215—220
- 78 *Bodmer T, Miltner E, Bermudez L E* *Mycobacterium avium* resists exposure to the acid conditions of the stomach//FEMS Microbiol Lett —2000 —Vol 182, N 1 —P 45—49
- 79 *Bohne J, Gruss A, Ehrlich S D, Maguin E* Transcriptional regulation of prfA and prfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*//J Molec Microbiol —1994 —Vol 11 —P 1141—1150
- 80 *Botsford J L* Analysis of protein expression in response to osmotic stress in *Escherichia coli*//FEMS Microbiol Lett —1990 —Vol 72, N 3 —P 355—360
- 81 *Boylan S A, Rutherford A, Thomas S M, Price C W* Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor δb by a regulatory pathway responsive to stationary-phase signals//J Bact —1992 —Vol 174 —P 3695—3706
- 82 *Boylan S A, Redfield A R, Price C W* Transcription factor δb of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon//J Bact —1993 —Vol 175 —P 3957—3963
- 83 *Boylan S A, Redfield A R, Brody M S, Price C W* Stress-induced activation of the δb transcription factor of *Bacillus subtilis*//J Bact —1993 —Vol 175 —P 7931—7937
- 84 *Brandl A, Pietroni P, Gualerzi C et al* Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*//Mol Microbiol —1996 —Vol 19 —P 231—240
- 85 *Buchanan R L, Edelson S G* pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acid ulants//J Food Prot —1999 —Vol 62, N 3 —P 211—218
- 86 *Burnie P J* Antibodies to bacterial stress proteins//Official gazette of the US patent & Trademark office patents —1999 —1228(3) —Nov 16 —No pagination
- 87 *Burnie P J* Corynebacterial stress proteins//Official gazette of the US patent & Trademark office patents —2000 —1232(3) —Mar 21 —No pagination
- 88 *Galdas T, Laalami S, Richarme G* Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2//J biol Chem —2000 —ss 1 —P 855—860

- 89 *Carreiro V , Laux D C , Nelson D R* Characterization of the heat shock response and identification of heat shock protein antigens of *Borrelia burgdorferi*//*Infect and Immun* —1990 —Vol 58, N 7 —P 2186—2191
- 90 *Chan Pan F , Foster S , Ingham E , Clements M O* The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model//*J Bact* —1998 —Vol 180, N 23 —P 6082—6089
- 91 *Choi Sang Ho , Baumler D J , Kaspar C W* Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* 0157 H7//*Appl and Envir Microbiol* —2000 —Vol 66, N 9 —P 3911—3916
- 92 *Chou Lan-Szu , Weimer Bart* Isolation and characterization of acid and biletolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*//*J Dairy Sci* —1999 —Vol 82, N 1 —P 23—31
- 93 *Cotter P D , Gahan Cormac G M , Colin Hill* Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response//*Intern J Food Microbiol* —2000 —Vol 60, N 2—3 —P 137—146
- 94 *Cotter P D , Gahan C G M , Colin Hill* A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid//*Mol Microbiol* —2001 —Vol 40, N 2 —P 465—475
- 95 *Cotter P D , Emerson N , Gahan Cormac G M , Colin Hill* Identification and disruption of hisRK, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress//*J Bact* —1999 —Vol 181, N 21 —P 6840—6843
- 96 *Cloutier J , Prevost D , Nadeau P et al* Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia//*Appl Environ Microbiol* —1992 —Vol 58 —P 2846—2853
- 97 *Costenzo J P , Grenot C , Lee R E* Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*//*J Comp Physiol* —1995 —Vol 165 —P 238—244
- 98 *Cohen M S , Sparling P F* Mucosal infection with *Neisseria gonorrhoeae* Bacterial adaptation and mucosal defenses//*J clin Invest* —1992 —Vol 89 —P 1699—1705
- 99 *Craig J E , Boyle D , Francis K P et al* Expression of the cold-shock gene cspB in *Salmonella typhimurium* occurs below a threshold temperature//*J microbiol* —1998 —Vol 144 —P 697—704
- 100 *Csonka L N* Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress//*Microbiol Rev* —1989 —Vol 53 —P 121—147
- 101 *De Chastellier C , Berche P* Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria//*Infect and Immun* —1994 —Vol 62 —P 543—553
- 102 *Deretic V , Schurr M J , Boucher J C , Martin D W* Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy incystic fibrosis environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors//*J Bact* —1994 —Vol 176, N 10 —P 2773—2780
- 103 *Deretic V , Paganramos E , Zhang Y Q , Dhandayuthapani S , Via L E* The extreme sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to front-line

- 104 Diez A , Gustovsson N , Nystrom T The universal stress protein A of *Escherichia coli* is required for resistance to DNA damaging agents and is regulated by a RecA/FtsK-dependent regulatory pathway// Molec Microbiol —2000 —P 1494—1503
- 105 Driessens A J M Bacterial protein translocation kinetic and thermodynamic role of ATP and the protonmotive force//Trends Biochem Sci —1992 —N 6 —P 219—223
- 106 Dufour A , Haldenwang W G Interactions between a *Bacillus subtilis* anti- δ b factor (RsbW) and its antagonists (RsbV)//J Bact —1994 —Vol 176 —P 1813—1820
- 107 Ernst R K , Dombroski D M , Merick J Anaerobiosis, type I fimbriae and growth phase ara factors that affect invasion of Hep-2 cells by *Salmonella typhimurium*//Infect and Immun —1990 —Vol 58 —P 2014—2016
- 108 Esvan H , Minet J , Lache C , Cormier M Proteins variations in *Listeria monocytogenes* exposed to high silinities//Int J Food Microbiol —2000 —P 151—155
- 109 Fabisiewicz I , Piechowska M Changes of sensitivity to heat shock during logarithmic growth of *Bacillus subtilis*//Acta Biochem Pol —1988 —Vol 35, N 3 —P 207—217
- 110 Fang F C , Libby S J , Buchemier N A , Lotven P C , Switala J et al The alternative sigma factor (RpoS) regulates *Salmonella* virulence//Proc nat Acad Sci USA —1992 —Vol 98 —P 11978—11982
- 111 Farewel A , Diez A A , Dirusso C C , Nystrom T Role of the *Escherichia coli* FadR regulator in stasis survival and growth phase-dependent expression of the uspA, fad and fad genes//J Bact —1996 —Vol 178 —P 6443—6450
- 112 Farr S B , Kogoma T Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*//Microbiol Rev —1991 —Vol 55 —P 561—585
- 113 Fierer J , Eckmann L , Fang R , Pfeiffer C , Finlay B B et al Expression of the *Salmonella* virulence gene spvB in cultured macrophages and nonphagocytic//Infect and Immun —1993 —Vol 61 —P 5231—5236
- 114 Finlay B B , Ruscykowski S , Dedhar S Cytoskeletal rearrangements accompanying Salmonella entry into epithelial cells//J Cell Sci —1991 —Vol 99 —P 283—296
- 115 Fortier A H , Slayter M V , Ziembra R et al Live vaccine strain of *Francisella tularensis* infection and immunity in mice//Infect and Immun —1991 —Vol 59 —P 2922—2928
- 116 Foster J W , Spector M P Phosphate-starvation regulon of *Salmonella typhimurium*//J Bact —1986 —Vol 168 —P 666—669
- 117 Foster J W , Hall H K Adaptive acidification tolerance response//J Bact —1990 —Vol 172 —P 771—778
- 118 Foster J W Salmonella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response//J Bact —1991 —Vol 173 —P 6896—6902

- 119 *Foster J W, Hall H K* Inducible pH homostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*//J Bact —1991 —Vol 173 —P 5129—5135
- 120 *Foster J W* The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins//J Bact —1993 —Vol 175 —P 1981—1987
- 121 *Foster J W, Park Y K, Bang I S, Karem K, Betts H et al* Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*//Microbiol —1994 —Vol 140 —P 341—352
- 122 *Foster J W, Bearson B* Acid sensitive mutants of *Salmonella typhimurium* identified through a dinitrophenol selection strategy//J Bact —1994 —Vol 176 —P 2596—2602
- 123 *Foster J W, Spector M P* How *Salmonella* survive against the odds//Ann Rev Microbiol —1995 —Vol 49 —P 145—174
- 124 *Francis K P, Gallagher M P* Light emission from a mud-lux transcriptional fusion in *Salmonella typhimurium* is stimulated by hydrogen peroxide and by interaction with the mouse macrophage cell-line J774 2//Infect and Immun —1993 —Vol 61 —P 640—649
- 125 *Freestone P, Nystrom T, Trineri M, Norris V* The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stress//J Molec Biol —1997 —N 274 —P 318—324
- 126 *Fulda S, Huclauf J, Schoor A, Hagemann M* Analysis of stress responses in the cyanobacterial strains *Synechococcus* sp PCC 7942, *Synechocystis* sp PCC 6803, *Synechococcus* sp PCC 7418 Osmolyte accumulation and stress protein synthesis//J Plant Physiol —1999 —P 240—249
- 127 *Gahan Cormac G M, Colin Hill* The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*//Int J Food Microbiol —1999 —Vol 50, N 1—2 —P 93—100
- 128 *Gaitit J* Identification of proteins whose synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is induced by DNA damage and heat shock//Int J Radiat Biol —1990 —Vol 57, N 5 —P 981—992
- 129 *Giard J-C, Rince A, Capiaux H, Auffray Y, Hartke A* Inactivation of the stress- and starvation-inducible gls24 operon has a pleiotropic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*//J Bact —2000 —Vol 182 —P 4512—4520
- 130 *Ginnochio C, Pace J, Galan JE* Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of *Salmonella* into cultured epithelial cells//Proc nat Acad Sci USA —1992 —Vol 89 —P 5976—5980
- 131 *Giveskov M, Lberl L, Molin S* Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442 two-dimensional electrophoretic analysis of starvation- and stress-induced proteins//J Bact —1994 —Vol 176 —P 4816—4824
- 132 *Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M* Major cold shock protein of *Escherichia coli*//Proc nat Acad Sci USA —1990 —Vol 87 —P 283—287
- 133 *Goloubinoff P, Gatenby AA, Loimer GH* The role of the GroE

heat-shock proteins in the assembly of forech rubisco oligomers in *Escherichia coli*//*Physiol plant* —1989 —Vol 76, N 3, 2 —P 2—17

- 134 *Gonzalesflecha B , Demple B* Homeostatic regulation of intracellular hydrogen-peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*//*J Bact* —1997 — Vol 179 — Iss 2 —P 382—388
- 135 *Gottesman S , Squires C , Pichersky E , Carrington M , Hobbs M , Mateick J et al* Conservation of the regulatory unit for the ClpA ATP-dependent proteases in prokaryotes and eukaryotes//*Proc nat Acad Sci USA* —1990 —Vol 87 —P 3513—3517
- 136 *Graumann P , Marahiel MA* A case of convergent evolution of nucleic acid-binding modules//*J Bioessays* —1996 —Vol 18 —P 309—315
- 137 *Graumann P , Marahiel MA* Some like it cold Response of microorganisms to cold shock//*J Microbiol* —1996 —Vol 166 —P 293—300
- 138 *Graumann P , Schroder K , Schmid R et al* Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*//*J Bact* —1996 —Vol 178 —P 4611—4619
- 139 *Groisman E A , Ochman H* Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*//*EMBO J* —1993 —Vol 12 —P 3779—3787
- 140 *Gulig PA , Caldwell A L , Chiodo V* Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7,8-kd virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid//*Mol Microbiol* —1992 —Vol 6 —P 1395—1311
- 141 *Gulig PA , Danbara H , Guiney D G , Laf AJ , Norel F et al* Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids//*Mol Microbiol* —1993 —Vol 7 —P 825—830
- 142 *Gulig PA , Doyle TJ* The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of *Salmonellae* in mice//*Infect and Immun* —1993 —Vol 61 —P 504—511
- 143 *Gutierrez JA , Crowley P , Cvitkovitch D G , Brady L J , Hamilton J R , Hillman J D , Bleiweis A S* Streptococcus mutans ffh, a gene encoding a homologue of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle, is involved in resistance to acidstress//*J Microbiol* —1999 —Vol 145, N 2 —P 357—366
- 144 *Guzzo J , Jobin M -P , Delmas F , Forteir L -C , Garmyn D , Tourdot-Marechal R , Lee B , Divies C* Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase//*Int J Food Microbiol* —2000 —P 27—31
- 145 *Halliwell B , Gutteridge* Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease an overview//*Methods Enzymol* —1990 —Vol 186 —P 1—85
- 146 *Hanawa T , Yamamoto T , Kamiya S* *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses //*Infect and Immun* —1995 —Vol 63, N 12 —P 4595—4599
- 147 *Hanawa T , Fukuda M , Kawakami H , Hirano H , Kamiya S , Yamamoto T* The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages//*Cell Stress & Chaperones* —1999 —P 118—128

- 148 Hecker M , Richter A Physiological studies to the production of heat shock proteins in *Bacillus subtilis*//J Basic Microbiol —1987 —Vol 27, N 5 —P 253—261
- 149 Hecker M , Heim C , Volker U , Wolfel L Induction of stress protein by sodium chloride treatment in *Bacillus subtilis*//Arch Microbiol —1998 —Vol 150 —P 564—566
- 150 Hecker M Von der Okophysiologie zur Molekularbiologie der Hit zeszchockantwort neue Expressionsvektoren fur *Bacillus*//Wiss Z E M Arndt-Univ , Greifswald, Math -Naturwiss R —1990 —Vol 39, N 1 —P 30—37
- 151 Hecker M , Volker U Genral stress proteins in *Bacillus subtilis*//FEMS Microbiol Ecol —1990 —Vol 74 —P 197—213
- 152 Hengge-Aronis R Survival of hunger and stress the role of *rpoS* in *Escherichia coli*//Cell —1993 —Vol 72 —P 165—168
- 153 Hoffman P S , Houston L , Butler C A *Legionella pneumophila* htpAB heat shock operon nucleotide sequence and expression of the 60-kilo dalton antigen in *L pneumophila*-infected hela cells//Infect and Immun —1990 —Oct —P 3380—3387
- 154 Holland D B , Robert S G , Wood E J et al Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes//J invest Derm —1993 —Vol 101 —P 196—199
- 155 Hornibrook J W Cultivation of phase I *Bordetella pertussis* in a semisynthetic liquid medium//Publ Hlth Rep —1939 —Vol 54 —P 1847—1851
- 156 Houston L S , Cook R G , Norris S J Isolation and characterization of a *Treponema pallidum* major 60-kilodalton protein resembling the groEL protein of *Escherichia coli*//J Bact —1990 —Vol 172, N 6 —P 2862—2870
- 157 Huesca M , Goodwin A , Bhagwansingh A , Hoffman P , Lingwood C Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70) a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*//Infect and Immun —1998 —Sept —P 4061—4067
- 158 Huttenen C N Use of pH gradient plates for increasing the acid tolerance of *Salmonella*//Appl Environ Microbiol —1975 —Vol 29 —P 309—312
- 159 Jan Gwenael , Leverrier P , Pichereau V , Boyaval P Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*//Appl Environ Microbiol —2001 —Vol 67, N 5 —P 2029—2036
- 160 Jenkins D E , Schultz J E , Matin A Starvation-induced cross protection against heat of H_2O_2 challenge in *Escherichia coli*//J Bact —1998 —Vol 180, N 9 —P 3910—3914
- 161 Jenkins D E , Chaisson S A , Matin A Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*//J Bact —1990 —Vol 172, N 5 —P 2779—2781
- 162 Jiang W , Fang L , Inouye M The role of the 5' End untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli* in cold-shock adaptation//J Bact —1996 —Vol 178 —P 4919 —4925

- 163 *Johnson K S , Charles I G , Dougan G , Miller I A , Pickard D , O'Goara P Costa G , Hormaeche C L* The role of a stress-response protein in bacterial virulence//Res Microbiol —1990 —Vol 142, N 7—8 —P 823—825
- 164 *Johnson K S , Charles I G , Dougan G , Pickard D , O'Goara P Costa G , Ali I , Miller I , Hormaeche C* The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence//J Molec Microbiol —1991 —Vol 5, N 2 —P 401—407
- 165 *Jones P G , Inouye M* Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*//J Molec Microbiol —1994 —Vol 11 —P 811—818
- 166 *Jones P G , Inouye M* RbfA, 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response//J Mol Microbiol —1996 —Vol 21 —P 1207—1218
- 167 *Jones P G , Mitta M , Kim W J , Inouye M* Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*//Proc nat Acad Sci USA —1996 —Vol 93 —P 76—80
- 168 *Jordan K N , Oxford L , O'Byrne C P* Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157 H7 Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance//Appl and Envir Microbiol —1999 —Vol 65, N 7 —P 3048—3055
- 169 *Kaufmann S H E* Heat-shock proteins a missing link in the host-parasite relationship?//Med Microbiol and Immunol —1990 —Vol 179, N 2 —P 61—66
- 170 *Khandjin E* Acidic extracellular environment induces only a subset of heat-shock proteins in primary mouse kidney cell cultures//Biochim and Cell Biol —1990 —Vol 68, N 4 —P 804—807
- 171 *Koga T , Wand-Wurttenberger A , DeBruyn J , Munk M T , Schoel B , Kaufmann S H E* T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages//Science —1989 —Sept —Vol 245 —P 1112—1115
- 172 *Konen-Waisman S , Fridkin M , Cohen I R* Self and foreign 60-kilodalton heat shock protein T cell epitope peptides serve as immunogenic carriers for a T cell-independent sugar antigen//J immunol —1995 —Vol 154 —P 5977—5985
- 173 *Kovacs T , Hargitai A , Kovacs K , Mecs I* pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor sigmaB in *Bacillus subtilis*//FEMS Microbiol Lett —1998 —P 323—328
- 174 *Krause M , Fang F C , Guney D G* Regulation of plasmid virulence gene expression in *Salmonella dublin* involves an unusual operon structure//J Bact —1992 —Vol 174 —P 4482—4489
- 175 *Kruger E , Volker U , Hecker M* Stress induction of clpC in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance//J Bact —1994 —Vol 176 N 11 —P 3360—3367
- 176 *Kullik I , Toledano M B , Tartaglia L A , Sors G* Mutational analysis of redox-sensitive transcriptional regulator oxy R regions important for oxidation and transcriptional activation//J Bact —1995 —Vol 177 —P 1275—1284

- 177 *Kwon YM, Rieke SC* Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids//*Appl Environ Microbiol* —1998 —Vol 64, N 9 —P 3458—3463
- 178 *Laemmli UK* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4//*Nature* —1970 —Vol 227 N 5259 —P 680—685
- 179 *Lange R, Hengge-Aronis R* Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*//*J Molec Microbiol* —1991 —Vol 5 —P 49—59
- 180 *Lange R, Hengge-Aronis R* The cellular concentration of the subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability//*Genes Dev* —1994 —Vol 8 —P 1600—1612
- 181 *Laplace JM, Sauvageot N, Hartke A, Aufray Y* Characterization of *Lactobacillus collinoides* response to heat, acid and ethanol treatments//*Appl Microbiol and Biotechnol* —1999 —Vol 51, N 5 —P 659—663
- 182 *Lausova A, Ferianc P, Polek B* The effect of different oxidative challenge on growth and stress protein induction in *Escherichia coli*//*Biologia (Bratislava)* —1999 —P 649—660
- 183 *Lee CA, Falkow S* The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state//*Proc natl Acad Sci USA* —1990 —Vol 87 —P 4304—4308
- 184 *Lee IS, Slonesewski JL, Foster JW* A low-pH inducible stationary phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*//*J Bact* —1994 —Vol 176 —P 1422—1426
- 185 *Leenanon B, Drake MA* Acid stress, starvation, and cold stress affect poststress behavior of *Escherichia coli* O157 H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*//*J Food Protect* —2001 —Vol 64, N 7 —P 970—974
- 186 *Leismeister-Wachter M, Domann E, Chakraborty T* The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* in thermoregulated//*J Bact* —1992 —Vol 174 —P 947—952
- 187 *Lelivelt M, Kawula TH* Hsp 66 and Hsp 70 homolog in *Escherichia coli*, is induced by cold shock but not by heat shock//*J Bact* —1995 —Vol 177 —P 4900—4907
- 188 *Leung KY, Finlay BB* Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*//*Proc nat Acad Sci USA* —1991 —Vol 88 —P 11470—11474
- 189 *Leyer GJ, Johnson ES* Acid adaptation induces cross-protection against environmental stress in *Salmonella typhimurium*//*Appl and Env Microbiol* —1993 —Vol 59 —Iss 6 —P 1842—1847
- 190 *Libby SJ, Goebel W, Luddwig A, Buchmeier N, Bowe I et al* Acytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages//*Proc nat Acad Sci USA* —1994 —Vol 9 —P 489—493
- 191 *Li S-R, Dorrel N, Everest PH, Dougan G, Wren BW* Construction and characterization of *Yersinia enterocolitica* O:8 high-temperature requirement (htrA) isogenic mutant//*Infect and Immun* —1996 —P 2088—2094

- 192 *Li M, Wong S L* Cloning and characterization of the groESL operon from *Bacillus subtilis*//J Bact —1992 —Vol 174 —P 3981—3992
- 193 *Loewen P S, Von Ossowski I, Switala J et al* KatF (o) synthesis in *Escherichia coli* is subject to posttranscriptional regulation//J Bact —1993 —Vol 175 —P 2105—2153
- 194 *Lopatin D E, Combs A, Sweeter D G, Fenno J C, Dhamya S* Characterization of heat-inducible expression and cloning of HtpG (Hsp90 homologue) of *Porphyromonas gingivalis*//Infect and Immun —2000 —P 1980—1987
- 195 *Lorca G I, de Valdez G Font* A low-pH-inducible, stationary phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639//Current Microbiol —2000 —Vol 42, N 1 —P 21—25
- 196 *Lottering EA, Streips UN* Induction of shock proteins in *Bacillus subtilis*//Curr Microbiol —1995 —Vol 30 —P 193—199
- 197 *Mackey B M, Derrick C* Heat-shock proteins synthesis and termotolerance of *Salmonella typhimurium*//J Appl Bact —1990 —Vol 69 N 3 —P 373—383
- 198 *Mager W H, DeKruyff F JJ* Stress-induced transcriptional activation//J Microbiol Rev —1995 —Vol 59 —P 306—331
- 199 *Mao Ying, Doyle MP, Chen Jinru* Insertion mutagenesis of wca reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7//J Bact —2001 —Vol 183, N 12 —P 3811—3815
- 200 *Martinsonsson VT, Reysenbach A-L, Birrien J-L, Prieur D* A stress proteins is induced in the deep-sea barophilic hyperthermophile *Thermococcus barophilus* when grown under atmospheric pressure//Extremophiles —1999 —Vol 3(4) —P 277—282
- 201 *Mason CA, Dunner J, Indra P, Colangelo T* Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment//Appl Environmental Microbiol —1999 —Vol 65(8) —P 3433—3440
- 202 *Mayr B, Kaplan T, Lecher S et al* Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotolerant *Bacillus cereus* WSBC 10201//J Bact —1996 —Vol 178 —P 2916—2925
- 203 *McCann M P, Fraley C, Matin A* The putative of factor kat F is regulated posttranscriptionally during carbon starvation//J Bact —1993 —Vol 175 —P 2143—2149
- 204 *Mengaud J, Dramsi S, Gouin E, Vazquez-Boland JA, Milon G, Cossart P* Pleiotrophic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated//J Molec Microbiol —1991 —N 5 —P 2273—2283
- 205 *Merrell D S, Camilli A* Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the “ToxR-like” family of transcriptional regulators//J Bact —2000 —Vol 182 N 19 —P 5342—5350
- 206 *Merrell D S, Bailey C, Kaper JB, Camilli A* The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU//J Bact —2001 —Vol 183, N 9 —P 2746—2754

- 207 *Michel V, Lehoux I, Depret G et al* The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low-molecular-mass nucleic acid-binding proteins//J Bact —1997 —Vol 179 —P 7331—7342
- 208 *Miller B S, Kennedy T E* Streips Molecular characterization of specific heat shock proteins in *Bacillus subtilis*//Curr Microbiol —1991 —Vol 22 —P 231—236
- 209 *Monod J* Growth of bacterial cultures//Ann Rev Microbiol —1949 —Vol 3 —P 371—394
- 210 *Monod J* La technique de culture continue Theorie et applications//Ann Inst Pasteur —1950 —Vol 79 —P 390—410
- 211 *Msadek T, Kunst F, Rapoport G* MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATP asa family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperatures// Proc nat Acad Sci USA —1994 —Vol 91 —P 5788—5792
- 212 *Nakashima K, Kanamuru K, Mizuno T et al* A novel member of the cspA family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*//J Bact —1996 —Vol 178 —P 2994—2997
- 213 *Nathan C F, Hibbs J B* Role of nitric oxide synthesis in macrophages antimicrobial activity//Curr Opin Immunol —1991 —Vol 3 —P 65—70
- 214 *Newkirk K, Feng W, Jiang W et al* Solution NMR structure of the major cold shock protein//Proc nat Acad Sci USA —1994 —Vol 91 —P 5114—5118
- 215 *Numi T, Yamashita O, Yaginuma T* A cold inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase// Europ J Biochem —1993 —Vol 213 —P 1125—1131
- 216 *Nystrom T, Neidhardt F C* Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*//Molec Microbiol —1992 —Vol 6 —P 3187—3198
- 217 *Nystrom T, Neidhardt F C* Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the uspA gene, which encodes a universal stress protein//J Bact —1993 —Vol 175 —P 3949—3956
- 218 *Nystrom T, Neidhardt F C* Expression and role of the universal stress protein UspA of *Escherichia coli* during growth arrest//J Molec Microbiol —1994 —Vol 11 —P 537—544
- 219 *O'Byrne C P, Dorman C J* The spv virulence operon of *Salmonella typhimurium* LT-2 is regulated negatively by cyclic AMP (cAMP) receptor protein system//J Bact —1994 —Vol 176 —P 905—912
- 220 *O'Neal C R, Gabriel W M, Furk A M et al* RpoS is necessary for both the positive and negative regulation of starvation survival genes during phosphate, carbon, and nitrogen starvation in *Salmonella typhimurium*//J Bact —1994 —Vol 176 —P 4610—4616
- 221 *Ostrovsky D, Shipanova I, Sibeldina L, Shashkov A, Kharatian E, Malyarova I, Tantsyrev G* A new cyclopyrophosphate as a bacterial antistressor//FEBS Lett —1982 —Vol 298, N 2—3 —P 159—161
- 222 *Ozcanca R, Flint K P* Survival and physiological status of *Escherichia*

- coli under stress conditions//6th Int Symp Microbiol Ecol (ISME-6), Barcelona, 6--11 Sept 1992 —Abstr—Barcelona, 1992 —117 p
- 223 *Pace J, Hayman M J, Galan J E* Signal transduction and invasion of epithelial cells by *Salmonella typhimurium*//*Cell* —1993 —Vol 72 —P 505—514
- 224 *Pannekoek Y, Van Putten J P M, Dankert J* Identification and molecular analysis of a 63-kilodalton stress protein from *Neisseria gonorrhoeae*//*J Bact* —1992 —Vol 174, N 21 —P 6928—6937
- 225 *Panoff J -M, Thammavongs B, Gueguen M et al* Cold stress responses in mesophilic bacteria CY 972069//*J Cryobiol* —1998 —Vol 36 —P 75—83
- 226 *Pebay M, Holl A -C, Simonet J -M, Decaris B* Characterization of the gor gene of the lactic acid bacterium *Streptococcus Thermophilus CNRZ 368*//*Res Microbiol* —1995 —Vol 146 —P 371—383
- 227 *Perera V T, Rogers H, Freer J H* One-dimensional peptide mapping of the subunits of pertussis toxin//*J Gen Microbiol* —1985 —Vol 131, N 8 —P 1897—1901
- 228 *Phan-Thanh L, Gormon T* Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis//*J Electrophoresis* —1995 —Vol 16 —P 444—450
- 229 *Phan-Thanh Luu, Montagne Annick* Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*//*J Gen and Appl Microbiol* —1998 —Vol 44, N 3 —P 183—191
- 230 *Phan-Thanh Luu, Mahouin F, Alige S* Acid responses of *Listeria monocytogenes*//*Intern J Food Microbiol* —2000 —Vol 55, N 1—3 —P 121—126
- 231 *Pullinger G D, Lax A J* A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions//*Molec Microbiol* —1992 —Vol 6 —P 1631—1643
- 232 *Qoronfleh M W, Borther C A, Schwartzberg P, Wilkinson B J* Enhanced levels of *Staphylococcus aureus* stress protein GroEL and DnaK homologs in infection of human epithelial cells//*Infect and Immun* —1998 —Vol 66(6) —P 3024—3027
- 233 *Rallu F, Gruss A, Maguin E* Lactococcus lactis and stress//*Antonie van Leeuwenhoek* —1996 —Vol 70 —P 243—251
- 234 *Rallu F, Gruss A, Dusko E S, Maguin E* Acid- and multistress-resistants of *Lactococcus lactis* Identification of intracellular stress signals//*J Molec Microbiol* —2000 —Vol 35, N 3 —P 517—528
- 235 *Ramires D M, Bentley W A* Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch *E. coli* cultures//*J Bact* —1999 —May 28 —Vol 181 —P 39—58
- 236 *Ray M K, Sitaramamma T, Ghandhi S et al* Occurrence and expression of cspA, a cold shock gene, in Antarctic psychrotrophic bacteria//*FEMS Microbiol Lett* —1994 —Vol 116 —P 55—60
- 237 *Raza S, Jornsgard B, Abou-Taleb H, Christiansen J L* Tolerance of *Bradyrhizobium* sp (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO_3 and antibiotics//*Lett Appl Microbiol* —2001 —Vol 32, N 6 —P 379—383
- 238 *Rhen M, Rukonen P, Taira S* Transcriptional regulation of *Salmo-*

- nella enterica virulence plasmid genes in cultured macrophages//J Molec Microbiol —1993 —Vol 10 —P 45—56
- 239 Riccillo P M , Muglia C I , de Bruyn F J , Roe A J , Booth I R , Aguilar O M Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance//J Bact —2000 —Vol 182, N 6 —P 1748—1753
- 240 Richter A , Hecker M Heat-shock proteins in *Bacillus subtilis* a two dimensional electrophoresis study//FEMS Microbiol Lett —1986 —Vol 37 —P 69—71
- 241 Rukanen P , Makela P H , Saarilahti J , Sukopoul S et al The virulence plasmid does not contribute to growth of *Salmonella* in cultured murine macrophages//Microbiol Pathol —1992 —Vol 13 —P 281—291
- 242 Rince A , Flahaut S , Auffray Y Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*//Int J Food Microbiol —2000 —Vol 55(1—3) —P 87—91
- 243 Robbe-Saule V , Coynault C , Norel F The live oral typhoid vaccine Ty21a is a rpoS mutant and is susceptible to various environmental stresses //FEMS Microbiol Lett —1995 —Vol 126 —P 171—176
- 244 Rocha E R , Andrews S C , Keen J N , Brock J H Isolation of a ferritin from *Bacteroides fragilis*//FEMS Microbiol Lett —1992 —Vol 95 —P 207—212
- 245 Rocha E R , Salby T , Coleman J P , Smith C J Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis* a role for catalase in protection against hydrogen peroxide//J Bact —1996 —Vol 178 —P 6895—6903
- 246 Rocha E R , Smith C J Regulation of *Bacteroides fragilis* katB mRNA by oxidative stress and carbon limitation//J Bact —1997 —Vol 179 —P 7033—7039
- 247 Roth W G , Leckie M P , Dietzler D N Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine//Appl and Environ Microbiol —1998 —Vol 54, N 12 —P 3142—3146
- 248 Rouquette C , de Chastellier C , Nair S , Berche P The ClpC AtPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages//J Molec Microbiol —1998 —Vol 27(6) —P 1235—1245
- 249 Rowbury R J , Hussain N H , Goodson M Extracellular proteins and other components as obligate intermediates in the induction of a range of acid tolerance and sensitization responses in *Escherichia coli*//FEMS Microbiol Lett —1998 —Vol 166, N 2 —P 283—288
- 250 Rowbury R J , Goodson M An extracellular stress-sensing protein is activated by heat and uv irradiation as well as by mild acid by the activation producing an acid tolerance-including protein//Lett Appl Microbiol —1999 —Vol 29, N 1 —P 10—14
- 251 Rowbury R J , Goodson M An extracellular acid-stress sensing protein needed for acid tolerance induction in *Escherichia coli*//FEMS Microbiol Lett —1999 —Vol 174, N 1 —P 49—55
- 252 Rowbury R J , Humphrey T J , Goodson M Properties of an L-gluta

- mate-induced acid tolerance response which involves the functioning of extracellular induction components//J Appl Microbiol—1999—Vol 86 N 2—P 325—330
- 253 *Ryan T P, Aust S D* The role of iron in oxygen-mediated toxicities//Crit Rev Toxicol—1992—Vol 22—P 119—141
- 254 *Ryu J -H, Beuchat L R* Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157 H7 in acidified media and fruit juices//Intern J Food Microbiol—1998—Vol 45, N 3—P 185—193
- 255 *Ryu J -H, Beuchat L R* Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157 H7 after exposure to acidic environments//Food Microbiol (London)—1999—Vol 16, N 3—P 317—324
- 256 *Sato Y, Arai H* Leucocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* 1 Purification and characterization//Infect and Immun—1972—Vol 6—P 899—904
- 257 *Schiemann D A, Shope S R* Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein//Infect and Immun—1991—Vol 59—P 437—440
- 258 *Schindelin H, Jiang W, Inouye M et al* Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*//Proc nat Acad Sci USA—1994—Vol 91—P 5119—5123
- 259 *Schindelin H, Marahiel M A, Heinemann U* Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *Bacillus subtilis* major cold-shock protein//J Nature (London)—1993—Vol 364—P 164—167
- 260 *Schirmer E C, Glover J R, Singer M A, Lindquist S* HSP-100/Clp proteins a common mechanism explains diverse functions//Trends Biochem Sci—1996—Vol 21—P 289—296
- 261 *Schlecht S* Influence of cultivation temperature on the yield of biomass and of lipopolysaccharide of *Salmonella* S forms and R mutants chemical composition//Zbl Bact Mikrobiol und Hygiene series—1986—N 261(2)—P 147—160
- 262 *Schmidt A, Schiesswohl M, Volker U, Hecker M, Schumann W* Cloning, sequencing, mapping and transcriptional analysis of the groESL operon from *Bacillus subtilis*//J Bact—1992—Vol 174—P 3993—3999
- 263 *Schunchel A R, Wiltsscheck R, Czisch M et al* Structure insolution of the major cold shock protein from *Bacillus subtilis*//J Nature (London)—1993—Vol 364—P 169—171
- 264 *Schroder K, Zuber P, Willinsky G et al* Mapping of the cspB gene and cloning of its homologs in thermophilic, mesophilic and psychrotrophic bacilli//J Gene—1993—Vol 136—P 277—280
- 265 *Schroder K, Graumann P, Schuchel A R et al* Mutational analysis of the putative nucleic acid binding surface of the cold shock domain, CspB, revealed and essential role of aromatic and basic residues in binding singlestranded DNA containing the Y box motif//J Molec Microbiol—1995—Vol 16—P 699—708
- 266 *Sheehan B, Kocks C, Gouin E, Klarsfeld A D, Mengaud J et al*

Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process//*Curr Topics Microbiol*—1994—Vol 192—P 187—216

- 267 *Sherman D R , Sabo P J , Hickey M J , Arain T M , Mahairas G G et al* Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria//*Proc nat Acad Sci USA*—1995—Vol 92—P 6625—6629
- 268 *Shukla H D , Singh B R* Identification of DnaJ-like chaperone in *Clostridium botulinum* type A//*J Protein Chem*—1999—Aug—Vol 18(6)—P 695—700
- 269 *Siegele D A , Kolter J* Life after log//*J Bact*—1992—Vol 174—P 345—348
- 270 *Small P L C , Ramakishanan L , Falkow S* Remodeling schemes of intracellular pathogens//*Science*—1994—Vol 263—P 637—639
- 271 *Smirnova G , Oktyabrsky O* Betaam modulates intracellular triol and potassium levels in *Escherichia coli* in medium with high osmolarity and alkaline pH//*Arch Microbiol*—1995—Vol 163, N 1—P 76—78
- 272 *Sokolovic Z , Fuchs A , Goebel W* Systhesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*//*Infect and Immun*—1990—Vol 58, N 11—P 3582—3587
- 273 *Sokolovic Z , Riedel J , Wuenscher M , Goebel W* Surface-associated prfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions//*J Molec Microbiol*—1993—Vol 8—P 219—227
- 274 *Somkuti G A , Steinberg D H* Distribution of plasmid-borne stress protein genes in *Streptococcus thermophilus* and other lactic acid bacteria//*Current Microbiol*—1999—Vol 38(1)—P 43—47
- 275 *Somkuti G A , Steinberg D H* Promoter acivity of the pER 341-borne STPhsp in heterologous gene expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus thermophilus*//*FEMS Microbiol Lett*—1999—Vol 15—P 431—436
- 276 *Spector M P , Altabadi Z , Gonzalea T , Foster J W* Global control in *Salmonella tughimurium* Two-dimensional electrophoretic analysis of starvation-, anaerobiosis-, and heat shock-inducible proteins//*J Bact*—1986—Vol 168—P 420—424
- 277 *Spector M P , Park Y K , Tigran S , Gonzales T , Foster J W* Identification and characterization of starvation-regulated genetic loci in *Salmonella tughimurium* by using Mud-directed lacZ operon fusions//*J Bact*—1988—Vol 170—P 345—351
- 278 *Spector M P* Gene expression in response to multiple nutrient starva tion conditions in *Salmonella tughimurium*//*FEMS Microbiol Ecol*—1990—Vol 74—P 174—184
- 279 *Spector M P , Cubitt C L* Starvation-inducible loci of *Salmonella tughimurium* regulation in starvation survival//*J Molec Microbiol*—1992—Vol 6—P 1467—1476
- 280 *Spector M P , Foster J W* Stravation-stress response (SSR) of *Salmo nella tughimurium* gene expression and survival during nutrient starvati on//In “Starvation in bacteria”/Ed S Kjelleberg — New York Plenum, 1993—P 201—224

- 281 *Spector M P , del Portillo F G , Bearson S M D , Mahmud A , Magut M , Finlay B B , Dougan G , Foster J W , Pallen M J* The rpoS-dependent starvation-stress response locus *stiA* encodes a nitrate reductase (*narZYWV*) required for carbon-starvation-inducible thermo tolerance and acid tolerance in *Salmonella typhimurium*//*Microbiol* —1999 —Vol 145, N 11 —P 3035—3045
- 282 *Spink J M , Pullinger G C , Wood M W , Lax A J* Regulation of *spvR*, the positive regulatory gene of *Salmonella* plasmid virulence genes//*FEMS Microbiol* —1994 —Vol 116 —P 113—122
- 283 *Stoldt M , Woehnert J , Goerlach M , Brown L R* The NMR structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L25 shows homology to general stress proteins and glutaminy-tRNA synthetases//*EMBO J* —1998 —P 6377—6384
- 284 *Storz G , Tartaglia L A , Farr S B , Ames B N* Bacterial defenses against oxidative stress//*Trends Genet* —1990 —Vol 6 —P 363—368
- 285 *Suzuki Y , Imaizumi A , Yamaguchi H et al* Patent 4500639, USA, MKU C 12 1/38 — N427039
Заявлено 29 09 82, опубл 19 02 85
- 286 *Svensater G , Sjogreen B , Hamilton J R* Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins//*J Microbiol* —2000 —Vol 146, N 1 —P 107—117
- 287 *Takahashi N , Yamada T* Acid-induced acid tolerance and acid oxygenicity of non-mutans streptococci//*Oral Microbiol and Immunol* —1999 —Vol 14, N 1 —P 43—48
- 288 *Thorne S H , Williams H D* Adaptation to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli analysis of survival, stress-resistance, and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase//*J Bact* —1997 —Vol 179, N 22 —P 6894—6901
- 289 *Tamarit J , Cabiscool E , Ros J* Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress//*J Biol Chem* —1998 —Vol 273, N 5 —P 3017—3032
- 290 *Tanabe H , Goldstein J , Yang M et al* Identification of the promoter region of the *Escherichia coli*//*J Bact* —1992 —Vol 174 —P 3867—3873
- 291 *Tao H , Bausch C , Richmond C , Blattner F R , Conway T* Functional genomics Expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media//*J Bact* —1999 —Vol 181(20) —P 6425—6440
- 292 *Tsai C -M , Frasch C E , Rivera E , Hochsten H D* Measurement of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal protein and polysaccharide preparations for vaccine//*J Biol Scand* —1998 —Vol 14 —P 25
- 293 *Uchiyama H , Shinohara Y , Tomioka N , Kusakabe I* Induction and enhancement of stress proteins in a trichloroethylene-degrading methanotrophic bacterium, *Methylocystis* sp M//*FEMS Microbiol Lett* —1999 —Vol 170(1) —P 125—130
- 294 *Valone S E , Chikami G K , Miller V L* Stress induction of virulence proteins (*SpvA*, -D and -C) from native plasmid psDL2 of *Salmonella dublin*//*Infect and Immun* —1993 —Vol 61 —P 705—713

- 295 Volker U, Mach H, Schmid R, Hecker M Stress proteins and cross protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*//J gen Microbiol —1992 —Vol 138 —P 2125—2135
- 296 Volker U, Engelmann S, Maul B, Riethdorf S, Volker A, Schmid R, Mach H, Hecker M Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*//Microbiol —1994 —Vol 140 —P 741—752
- 297 Walker D C, Grgis H S, Klaenhammer T R The groESL chaperone operon of *Lactobacillus johnsonii*//Appl Envir Microbiol —1999 Vol 65(7) —P 3033—3041
- 298 Weichant D, Holquist L, Jouper jaan A, Nelson D R Induction patterns of two DnaK cognate proteins in three vibrio sp during exposure to heat, cold and starvation//6th Int Symp Microbiol Ecol (ISME-6), Barcelona, 6—11 Sept 1992 —Abstr —Barcelona, 1992 —P 256
- 299 Wiedmann M, Arvik Torey J, Hurley R J, Boor Kathryn J General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*//J Bact —1998 —Vol 180 N 14 —P 3650—3656
- 300 Welch D T, Reed R H, Herbert RA Osmoadaptation of *Escherichia coli* involvement of K+, Glutamate and trehalose//5th Int Symp Microbiol Ecol (ISME-5), Kyoto, Aug 27 —Sept 1 —1989 —Abstr —Kyoto, 1990 —P 112
- 301 Welch D T, Reed R H, Herbert RA The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCJB 9484 Interaction of trehalose, K+ and glutamate during osmoadaptation in continuous culture//J Gen Microbiol —1991 —Vol 137, N 4 —P 745—750
- 302 Welch D T, Herbert RA Identification of organic solutes accumulated by purple and green sulphur bacteria during osmotic stress using ^{13}C NMR spectroscopy//6th Int Symp Microbiol Ecol (ISME-6) Barcelona, 6—11 Sept 1992 —Abstr —Barcelona, 1992 —P 256
- 303 Welch D T, Barlett D H Presure induced stress responses of bacteria//6th Int Symp Microbiol Ecol (ISME-6), Barcelona, 6—11 Sept 1992 —Abstr —Barcelona, 1992 —P 189
- 304 Wetstein M, Volker U, Dedo J, Lobau S, Zuber U, Schiesswohl M, Herget C, Hecker M, Schumann W Cloning, sequencing and molecular analysis of the dnaK locus from *Bacillus subtilis*//J Bact —1992 —Vol 174 —P 3300—3310
- 305 Welch W How cells respons to stress//Sci Am —1993 —Vol 268 —P 34—41
- 306 White L G, Inniss W E Cold shock proteins in a psychrotrophic bacterium//Can J Microbiol —1992 —Vol 38 —P 1281—1285
- 307 Wild J, Altman E, Yura T, Gross CA DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein expert in *Escherichia coli*//Genes and Dev —1992 —Vol 6, N 7 —P 1165—1172
- 308 Wolfe A P Structural and functional properties of the evolutionary ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins//J Bioessays —1994 —Vol 16 —P 245—251
- 309 Wong Hin-Chung, Peng Po-Yen, Han Jun-Ming Chang Chia Yu Lan Shang-Lun Effect of mild acid treatment on the survival, en

Монография

ИРИНА АРТАШЕСОВНА БАСНАКЬЯН

Стресс у бактерий

Завед редакцией *Т П Осокина*

Редактор *Е А Кузнецова*

Художественный редактор *С Л Андреев*

Технический редактор *В И Табенская*

Корректор *Т С Овчинникова*

ЛР № 010215 от 29 04 97 Сдано в набор 07 10 2002
Подписано к печати 10 11 2002 Формат бумаги
60×90 $\frac{1}{16}$ Бумага офс № 1 Гарнитура Таймс Печать
офсетная Усл.печ л 8,50 Усл.кр -отт 9,0 Уч -
изд л 8,87 Тираж 1500 экз Заказ № 2513

Ордена Трудового Красного Знамени
издательство "Медицина"
101990, Москва, Петроверигский пер., 6/8

Отпечатано с оригинал-макета в ФГУП ордена
"Знак Почета" Смоленской областной
типоверхии им В И Смирнова 214000,
Смоленск, пр им Ю Гагарина, 2

ISBN 5 225-04368 2



9 785225 043681

