

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ESCHERICHIA COLI K12

Проведен анализ влияния температуры культивирования на динамику репродуктивного потенциала и физико-химических свойств (гидрофобность, z-потенциал) *Escherichia coli* K12 в периодических культурах. При оптимальной температуре 37 °С у эшерихий наблюдается хронологическая сопряженность изменения указанных свойств. Адаптация *E. coli* к суб- и супраоптимальной температуре (27 °С и 42 °С) сопровождается выраженной модификацией анализируемых признаков и десинхронизацией их динамики.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli* K12, периодическое культивирование, гидрофобность, z-потенциал.

Для мезофильных бактерий, многие из которых относятся к патогенным или потенциально патогенным для человека микроорганизмам, оптимальной температурой роста считается 37 °С, хотя они способны размножаться в широком температурном диапазоне от – 22 °С до 42 °С [1]. Миграция таких бактерий по вектору макроорганизм - окружающая среда - макроорганизм, происходящая с изменением температурного режима, определяет актуальность изучения их адаптации к разным температурным условиям. Исследование влияния критических (высоких и низких) температур на микроорганизмы позволило обосновать концепцию стресса у бактерий и охарактеризовать у них ряд морфофизиологических особенностей, в том числе связанных с синтезом термопротекторов – белков теплового ( $H_{sp}$ ) и холодового ( $C_{sp}$ ) шока, некоторые из которых обнаружены только в мембранной фракции [2].

В то же время многие вопросы адаптации мезофильных бактерий к суб- и супраоптимальным температурам остаются открытыми, несмотря на то, что они имеют важное значение для эпидемиологии, инфектологии и биотехнологии. Логично предположить, что развитие микроорганизмов в этих условиях может отразиться не только на их метаболизме и скорости роста, но и на таких интегральных физико-химических характеристиках бактериальной поверхности, как гидрофобность и электрокинетический потенциал (z-потенциал).

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ динамики репродуктивного потенциала и модификации физико-химичес-

ких свойств поверхности бактерий, растущих в периодических бульонных культурах при разной температуре.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования послужил музейный штамм *E. coli* K12 (№240367 из ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Эшерихии культивировались в пробирках с 3 мл официального мясопептонного бульона – МПБ (НПО «Питательные среды», г. Махачкала) при температуре 27°, 37° и 42° С без встряхивания. Для определения фаз роста и репродуктивного потенциала бактерий каждый час регистрировалась оптическая плотность (OD) культур на фотоэлектроколориметре (КФК-2,  $l=540$  нм, ширина кюветы 0,5 см) и рассчитывалась удельная скорость роста ( $m, ч^{-1}$ ) [3].

Для измерения электрокинетического потенциала (z-потенциала) бактериальные взвеси отбирались в каждую фазу роста, с целью обезвреживания (подвижных штаммов) выдерживались на водяной бане в течение 30 мин. при 56 °С и дважды отмывались дистиллированной водой в течение 15 мин. при 3000 об/мин. Полученную бактериальную массу ресуспензировали в дистиллированной воде, доводя мутность до 5 ед. по стандарту ГИСК. Электрокинетический потенциал (z-потенциал) бактерий определяли амплитудно-частотным методом, измеряя их подвижность в микроэлектрофоретической камере 22×22 мм и высотой 0,2 мм при фазово-контрастной микроскопии и режиме работы дзетометра (Дзетометр-1М, амплитуда – 10 В, частота –

0,2 Гц). Z-потенциал рассчитывали по аппроксимированной формуле Смолуховского [4, 5]:

$$\zeta = \frac{\eta \cdot W}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon \cdot E},$$

где  $\zeta$  – электрокинетический потенциал (z-потенциал), mV,

$\varepsilon_0$  – диэлектрическая постоянная жидкости ( $\varepsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12}$ ),

$\varepsilon$  – относительная диэлектрическая постоянная воды ( $\varepsilon = 80,85$ ),

$\eta$  – вязкость дистиллированной воды при  $t = 21^\circ\text{C}$ ,

$W$  – скорость перемещения частицы (микрообъекта) (м/сек),

$E$  – напряженность электрического поля в камере ( $\frac{B}{\text{см}}$ ).

Замеряли амплитуду колебаний 50 бактериальных клеток и вычисляли среднее значение электрокинетического потенциала (z-потенциала) для данного штамма.

Для измерения степени гидрофобности эшерихий использовали метод разделения популяции клеток в двухфазной системе «жидкость - жидкость» с несмешивающимися водными фазами в 0,15 М растворе NaCl, обогащенными полиэтиленгликолем (PEG 6000) и декстраном (Т500) [6, 7, 8]. Конечные концентрации указанных компонентов в системе доводились до уровня 6,2% декстрана и 4,5% полиэтиленгликоля, что обеспечивало широкий диапазон чувствительности методики и средний уровень межфазного поверхностного натяжения. Эмульгирование смеси производили непосредственно после добавления в нее бактерий путем интенсивного встряхивания в течение 120 секунд при комнатной температуре на вортексе (2000 об/мин). Расслаивание осуществляли в два этапа: сначала мягким центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут, затем отстаиванием при комнатной температуре в течение 30 минут [9]. О гидрофобности бактерий судили по показателю гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ), который рассчитывали по формуле:  $\text{ГЛБ} = \text{Lg}(\text{OD}_{\text{PEG}} / \text{OD}_{\text{Dextran}})$ , где  $\text{OD}_{\text{PEG}}$  – оптическая плотность верхней фазы,  $\text{OD}_{\text{Dextran}}$  – оптическая плотность нижней фазы системы после расслоения, для чего с помощью спектрофотометра (СФ-46,  $l = 541$  нм, ширина кюветы 1 см) замеряли оптическую плотность верхней (гидрофобной фазы, обогащенной PEG

6000) и нижней (гидрофильной фазы, обогащенной декстраном Т500).

Статистическую обработку данных осуществляли методами вариационной статистики [10].

### Результаты исследования

Анализ динамики накопления биомассы и модификации физико-химических характеристик поверхности *E. coli* K12 при росте в МПБ выявил высокую степень хронологической сопряженности этих процессов и их зависимость от температуры культивирования (рисунок).

Прежде всего дана оценка направленности изменения репродуктивного потенциала и физико-химических свойств эшерихий при оптимальной температуре культивирования ( $37^\circ\text{C}$ ). Адаптированные к МПБ *E. coli* K12 при  $37^\circ\text{C}$  проявляли в течение первых двух часов культивирования относительно высокую удельную скорость роста ( $m = 0,7 \text{ ч}^{-1}$ ), которая затем постепенно снижалась, что свидетельствовало о переходе культуры из экспоненциальной фазы в фазу замедления роста и стационарную фазу [11]. Уменьшение удельной скорости роста бактерий до ( $m = 0,4 \pm 0,2 \text{ ч}^{-1}$ ) к третьему часу культивирования совпадало с уменьшением их гидрофобности до (ГЛБ =  $-1,72 \pm 0,01$  усл.ед.). Следует отметить, что эшерихии в фазу замедленного роста (4-5 часов) восстанавливали степень своей гидрофобности (ГЛБ =  $-1,33 \pm 0,12$  усл.ед.), практически достигая исходного уровня (ГЛБ =  $-1,21 \pm 0,22$  усл.ед.). Изменение z-потенциала также было синхронизировано с фазами развития бактериальных культур при  $37^\circ\text{C}$ : его значения были максимальными ( $-24,4 \pm 2,8$  mV) в конце экспоненциальной фазы (после 2-х часов культивирования), а затем к 5-му часу прогрессивно снижались ( $-17,3 \pm 0,9$  mV).

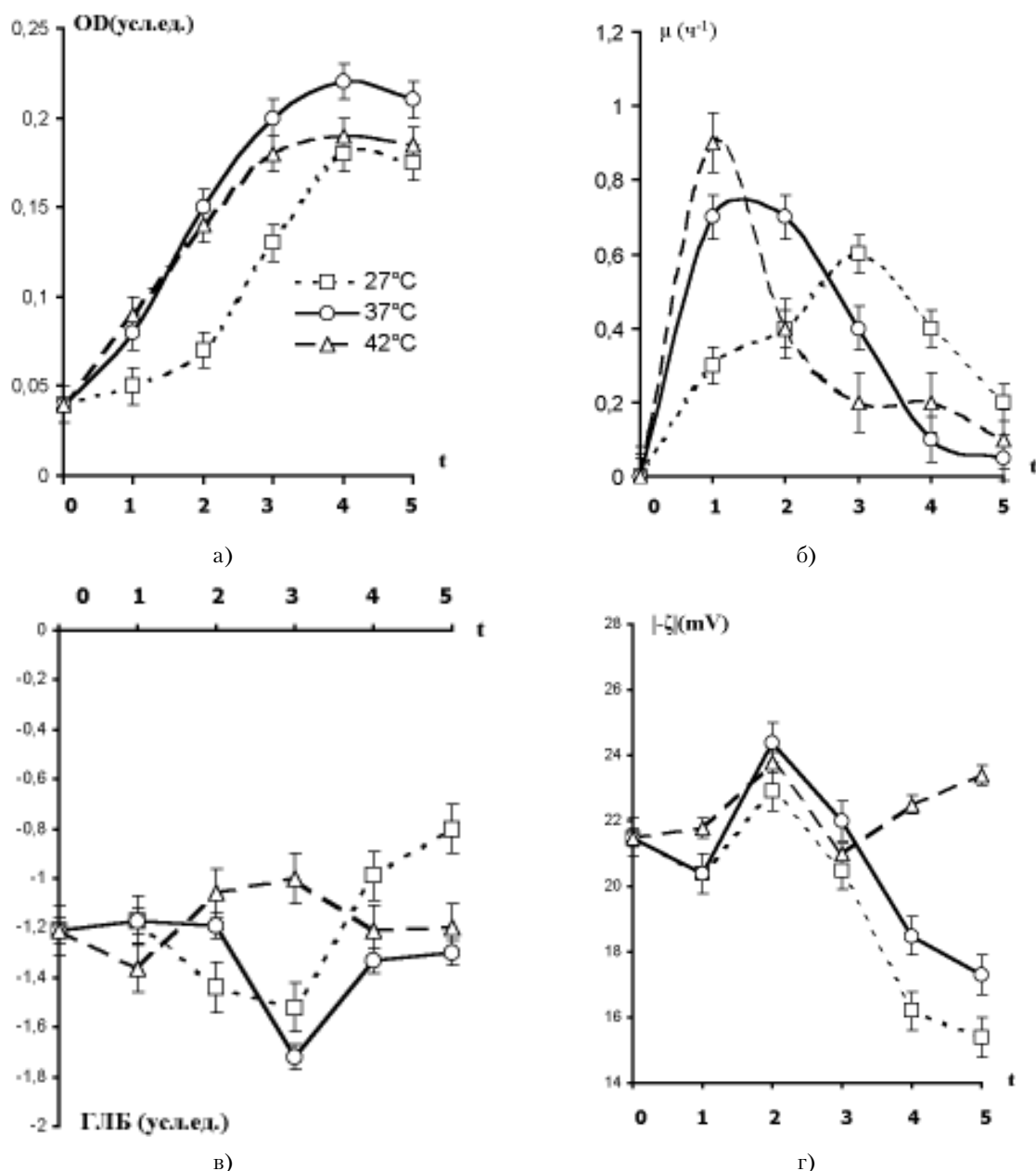
Похожую динамику анализируемых параметров бактерий демонстрировали культуры эшерихий, выращиваемые при субоптимальной температуре  $27^\circ\text{C}$ , хотя и в ней имелись определенные отличия. В частности, адаптация бактерий к этой температуре сопровождалась медленным нарастанием удельной скорости роста, которая достигала своего максимума ( $m = 0,6 \pm 0,1 \text{ ч}^{-1}$ ) лишь к 3-му часу развития культур, а также более выраженным повышением степени гидрофобности (ГЛБ =  $-1,52 \pm 0,09$  усл.ед.) и более значимым снижением z-потенциала

( $-20,5 \pm 1,3$  mV) эшерихий спустя 5 часов культивирования.

Иначе говоря, приспособление эшерихий к субоптимальной температуре роста  $27^\circ\text{C}$  кардинально не отражалось на интегральных физиологических и физико-химических характеристиках *E. coli*, но сочеталось с изменением выраженности анализируемых параметров бактерий, что позволяет рассматривать данный

температурный режим как «мягкое» экологическое воздействие, не приводящее к развитию стресса у микроорганизмов.

Несколько иной характер модификации изучаемых свойств бактерий наблюдался при адаптации эшерихий к супраоптимальной температуре  $42^\circ\text{C}$ . В этих условиях бактерии быстро наращивали свой репродуктивный потенциал, который уже к первому часу культивирова-



По оси абсцисс: время культивирования (час); по оси ординат: а – биомасса OD (усл. ед.); б – удельная скорость роста –  $\mu$  ( $\text{ч}^{-1}$ ); в – z-потенциал (mV); Г – гидрофобность (ГЛБ, усл. ед.).

Рисунок. Влияние температуры культивирования на физиологические и физико-химические свойства *E. coli* K12

ния достигал максимума ( $=0,9 \pm 0,3 \text{ ч}^{-1}$ ), а затем ко 2-3-му часу развития культур резко его снижали – до  $m=0,4-0,2 \text{ ч}^{-1}$ . При этом гидрофобность и z-потенциал *E. coli* изменялись «парадоксальным» образом. Так, в отличие от бактерий, культивируемых при 37 °С и 27 °С в течение 2-3 часов, у которых ГЛБ снижался, эшерихии, растущие при 42 °С, в этот временной интервал демонстрировали увеличение степени гидрофобности своей поверхности. Кроме того, на 4-5-й час культивирования в этих температурных условиях у эшерихий фиксировались повышенные значения z-потенциала ( $-22,5...-23,4 \text{ mV}$ ), тогда как в случаях роста бактерий при оптимальной и субоптимальной температуре наблюдалось прогрессивное их снижение (до  $-17,3...-15,4 \text{ mV}$ ). Эти данные свидетельствовали о выраженной модификации интегральных физико-химических параметров эшерихий при их адаптации к супраоптимальной температуре роста 42 °С, что позволяет оценить данный температурный режим как более «жесткий» экологический фактор, хотя и не лимитирующий рост *E. coli*, но вызывающий у микроорганизмов ряд серьезных «перестроек», в том числе затрагивающих их поверхность.

Анализируя материал в целом, следует отметить, что процесс адаптации микроорганизмов к суб- и супраоптимальной температуре в условиях периодических бульонных культур характеризуется не только выраженной модификацией интегральных физиологических и физико-химических параметров *E. coli*, но и десинхронизацией их динамики, которая наблюдается у культур эшерихий при оптимальной температуре роста.

### Заключение

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют как о хронологической сопряженности изменений темпа роста эшерихий и физико-химических параметров их поверхности при периодическом культивировании бактерий в жидких полиауксийных средах (МПБ), так о существенном влиянии температуры на характер модификаций анализируемых свойств микроорганизмов. Очевидно, в основе указанных процессов лежит адаптация бактерий к меняющимся условиям культивирования путем генетически детерминированной «настройки» их метаболизма на формирующийся комплекс кон-

кретных абиогенно-биотических факторов среды обитания (температура, доступность пищевого субстрата, концентрация метаболитов, накопление регуляторов «quorum sensing», pH,  $pO_2$  и др.). Как показали результаты экспериментов, это неминуемо отражается на таких интегральных физиологических и физико-химических характеристиках эшерихий, как их репродуктивность, поверхностная гидрофобность и z-потенциал, которые могут рассматриваться в качестве своеобразных маркеров адаптации микроорганизмов к определенным условиям роста.

В эпидемиологическом плане внимание привлекают данные о повышении гидрофобности и снижении z-потенциала бактерий через 5 часов культивирования при субоптимальной температуре (27 °С), поскольку подобная разнонаправленная модификация указанных свойств у эшерихий может способствовать повышению их адгезивности к эпителиальным клеткам [14], а при экзогенной контаминации макроорганизма – колонизации его тканей с возможным развитием инфекционно-воспалительного заболевания, если в эти процессы будут вовлечены патогенные (энтероинвазивные, энтерогеморрагические и др.) варианты *E. coli*.

С другой стороны, выявленный характер модифицирующего влияния субоптимальной температуры на физико-химические характеристики и связанную с ними адгезивную способность эшерихий заставляет задуматься о пересмотре биотехнологических схем производства такого пробиотика, как колибактерин, содержащего живые бактерии штамма *E. coli* M17. Возможно, при производстве данного пробиотика следует изменить используемые для культивирования эшерихий температурные условия с 37 °С на 27 °С, а также применять периодическое культивирование с отбором бактерий на этапе перехода культуры из фазы замедленного роста в стационарную фазу. Безусловно, проверка обоснованности данных предложений требует проведения дальнейших исследований и детальной проработки нового технологического регламента по выпуску колибактерина. Кроме того, учитывая, что выход бактериальной биомассы может несколько снизиться, а адгезивный потенциал эшерихий, наоборот, повыситься, возникнет необходимость скорректировать рекомендованные дозировки препарата с учетом результатов его клинической апробации.

Не меньший интерес вызывают данные о влиянии на анализируемые признаки эшерихий супраоптимальной температуры (42 °С). Нельзя исключить, что адаптация бактерий к этой температуре и сопровождающие ее изменения их физико-химических свойств сопряжены с синтезом мембранных термопротекторов, возможно, из разряда белков теплового шока (Hsp<sub>α</sub>) [2], что способно существенно трансформировать у эшерихий их гидрофобность и z-потенциал, которые принимают непосредственное участие во взаимодействии микроорганизмов с эукариотическими клетками – эпителиоцитами и профессиональными фагоцитами [11-13]. Характер термоиндуцированной модификации указанных свойств (особенно повышение у эшерихий z-потенциала) наталкивает на

мысль о том, что отклонение температуры в сторону супраоптимальных значений (например, при развитии инфекционно-воспалительного процесса) может выступать дополнительным фактором санации макроорганизма от бактериальных патогенов, вызывая у них снижение адгезивной способности и тем самым препятствуя дальнейшей колонизации инфицированных тканей.

Таким образом, анализ влияния на бактерии температуры позволяет не только решать задачи фундаментального характера, связанные с изучением особенностей адаптации микроорганизмов к одному из наиболее значимых экологических факторов [1, 2], но и искать ответы на некоторые вопросы эпидемиологии, инфектологии и биотехнологии.

**Список использованной литературы:**

1. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Под ред. Д. Кашнера. М.: Мир, 1981. 519 с.
2. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. М.: Медицина, 2003. 136 с.
3. Гриценко В.А. Анализ взаимосвязи между размером клеток и уровнем антилизосимной активности у *Escherichia coli* в периодических культурах // Микробиология, 2001, 70 (3): 421-423.
4. Hunter R. J. Introduction to modern colloid science. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 1993.
5. Soni K. A., Balasubramanian A. K., Beskok A., Pillai S. D. Zeta Potential of Selected Bacteria in Drinking Water When Dead, Starved, or Exposed to Minimal and Rich Culture Media. *Curr. Microbiol.* 2008. 56: 93-97.
6. Gerson D.F. Cell surface energy, contact angle and phase partition: I. Lymphocytic cell lines in biphasic aqueous mixtures. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. 602: 269-280.
7. Magnusson K.E., Stendahl O., Tagesson C., Edebo L., Johansson G. The tendency of smooth and rough *Salmonella typhimurium* bacteria and lipopolysaccharide to hydrophobic and ionic interaction, as studied in aqueous polymer two-phase systems. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B).* 1977. 85: 212-218.
8. Джерсон Д. Применение методов физики поверхностей в иммунологии / Иммунология. Методы исследований / Под ред. И. Лефковитс, Б. Пернис, М.: Мир, 1983: 122-158.
9. Брудастов Ю.А., Гриценко В.А., Журлов О.С., Чертков К.Л. Характеристика гидрофобных свойств бактерий при их взаимодействии с сывороткой крови // Журн. микробиол. 1997. 4: 73-77.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
11. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М.: Медицина, 1992. 189 с.
12. Баснакьян И.А., Мельникова В.А. Стрессовые белки у бактерий // Журн. микробиол. 1996. 6: 99-103.
13. Бондаренко В.М. Общий анализ представлений о патогенных и условнопатогенных бактериях // Журн. микробиол. 1997. 4: 20-26.
14. Cheryl-Lynn Y. Ong, Glen C. et al. Identification of Type 3 Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals a Role in Biofilm Formation. *Journal of bacteriology.* 2008, 3: 1054-1063.

**Zhurlov O.S., Gritsenko V.A., Brudastov Yu.A. INFLUENCE OF CULTIVATION TEMPERATURE ON PHYSIOLOGICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL FEATURES OF ESCHERICHIA COLI K12**

The analysis of influence of cultivation temperature on the dynamics of reproductive capacity and physical-chemical features (hydrophobicity, z-potential) of *Escherichia coli* K12 in periodic cultures is presented in this article. Chronological conjugacy changes of these features are observed at the optimal temperature of 37 °C of *Escherichia*. Adaptation of *E.coli* to the sub- and supraoptimal temperature (27 °C and 42 °C) is accompanied with a marked modification of the analyzed characteristics and desynchronization of their dynamics.

Key words: *Escherichia coli* K12, periodical cultivation, hydrophobicity, z-potential.

Сведения об авторах:

Журлов О.С. кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного симбиоза Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (г. Оренбург);

Гриценко В.А. доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточного симбиоза Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (г. Оренбург); 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, ИКВС УрО РАН, тел.: (3532)770512, факс: (3532)774463, e-mail: jurlov1968@mail.ru

Брудастов Ю.А. доктор медицинских наук, главный врач МЧС Оренбургского государственного университета 460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: brudastov@mail.ru