

Received: 2011.07.19
Accepted: 2011.11.09
Published: 2011.11.22

Osmoregulacja – ważny parametr rozwoju bakterii

Osmoregulation – an important parameter of bacterial growth

Marta Sochocka, Janusz Boratyński

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Warunki środowiskowe, takie jak temperatura, pH, promieniowanie czy ciśnienie osmotyczne stanowią ważne czynniki limitujące wzrost i rozmnażanie się bakterii. Prawidłowa struktura i metabolizm komórki bakteryjnej utrzymywane są dzięki stabilnej gospodarce wodno-elektrolitowej, regulowanej w procesie osmozy. Gwałtowne przemiany wywołane szokiem osmotycznym (dehydratacja, rehydratacja) prowadzą m.in. do modyfikacji fosfolipidowej struktury błony komórkowej, a nawet śmierci komórki. Zjawiska zakłócające proces osmozy, stanowiące jednak naturalny element życia komórki, mogą się pojawić na przykład w układach koloidowych. Biologiczna identyfikacja ciśnienia osmotycznego powiązana jest ze wzrostem lub spadkiem siły osmotycznej środowiska bytowania organizmów. Komórki poddane stresowi osmotycznemu, takiemu jak wzrost ciśnienia osmotycznego, inicjują mechanizmy aktywnego radzenia sobie z niekorzystnymi skutkami jego działania. Procesy osmoregulacyjne mają na celu utrzymanie turgoru komórki, a tym samym zapewnienie warunków do prawidłowego rozwoju bakterii. Osmoregulacja, polegająca na utrzymaniu równowagi wodno-elektrolitowej komórki, dotyczy m.in. gromadzenia swoistych substancji osmoregulacyjnych, tzw. osmolitów. Osmolity są małymi, rozpuszczalnymi cząsteczkami organicznymi, wpływającymi korzystnie na stabilizację błon i białka komórkowe, nie zakłócając jednocześnie centralnego metabolizmu komórki. Magazynowanie substancji osmoregulacyjnych odbywa się w wyniku syntezy lub przez pobranie z otoczenia za pomocą specjalnych systemów transportowych, aktywowanych przez bodźce mechaniczne. Wiedza o wpływie ciśnienia osmotycznego na mikroorganizmy oraz o regulacji jego działania pozwala m.in. na odpowiednie wykorzystanie bakterii w różnych gałęziach przemysłu biotechnologicznego.

Słowa kluczowe:

ciśnienie osmotyczne • osmoza • substancje osmoregulacyjne • rozwój bakterii

Summary

Environmental conditions such as temperature, pH, radiation and osmotic pressure are important factors limiting the growth and multiplication of bacteria. Regular structure and metabolism of bacterial cells are maintained through a stable arrangement of the water-electrolyte system, regulated by osmosis. The rapid changes caused by osmotic shock (dehydration, rehydration) might lead to modifications of the phospholipid structure of the cell membrane and even cell death. Advances disturbing the osmosis, which are a natural part of living cells, may appear for example in colloid systems. The biological identification of the osmotic pressure is connected with an increase or decrease in the environmental osmotic strength of microorganisms' habitat. Cells exposed to osmotic stress, such as an increase in osmotic pressure, initiate mechanisms of active coping with the adverse consequences of its effects. Osmoregulatory processes are designed to maintain cell turgor, hence ensuring proper conditions for bacterial growth. Osmoregulation, which consists of maintaining fluid and electrolyte balance of cells, raising concerns accumulation of specific compatible solutes (osmolytes). Osmolytes are small, soluble organic molecules



with a positive influence on membrane stabilization and proteins, without disrupting cellular functions. Storage of compatible solutes takes place by synthesis or by downregulation from the medium by means of special transport systems, activated by mechanical stimuli. Knowledge of the impact of osmotic pressure on microbial cells and the regulation of its activity led to the appropriate use of bacteria in various branches of the biotechnology industry.

Key words: osmotic pressure • osmosis • compatible solutes • bacterial growth

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=966604>

Word count: 4413

Tables: 1

Figures: 3

References: 66

Adres autorki: dr Marta Sochocka, Laboratorium Chemii Biomedycznej, Laboratorium Wirusologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: mars@iitd.pan.wroc.pl

WPROWADZENIE

Dynamika i tempo wzrostu mikroorganizmów zależą przede wszystkim od ich budowy i fizjologii oraz warunków środowiskowych. Czynniki fizykochemiczne limitujące rozwój mikroorganizmów to przede wszystkim: temperatura, obecność lub brak w otoczeniu wody, pH, zawartość i rodzaj substancji odżywczych, promieniowanie oraz ciśnienie. Istotne znaczenie ma zarówno rodzaj jak i natężenie działania danego czynnika zewnętrznego, a także organizm, na który działa. Każdy gatunek bakterii ma własne zakresy tolerancji dla danego czynnika, można zatem wyznaczyć optymalne warunki pozwalające na najlepszy wzrost. Bakterie są naturalnie przystosowane do tolerowania dosyć dużych zmian wszystkich wyżej wymienionych czynników. Należy jednak pamiętać, że wzrost niektórych grup często ograniczony jest do wąskiego zakresu zmian danego parametru. Reakcje bakterii na działanie danego czynnika fizykochemicznego są także indywidualnie różnicowane. To, co dla jednych gatunków bywa bójcze, dla innych może się okazać wyjątkowo korzystne. Zakresy zmian działania danego czynnika są dla bakterii limitujące, a ich przekroczenie może doprowadzić nawet do ich zabicia. Nie jest także możliwe określenie, który czynnik jest dla komórki najważniejszy, gdyż bardzo często efekty oddziaływań są wypadkową działania wielu nakładających się czynników jednocześnie.

PARAMETRY FIZYKOCHEMICZNE ŚRODOWISKA

W komórce bakteryjnej woda stanowi naturalne środowisko, w którym przebiega większość niezbędnych do życia procesów metabolicznych i biosyntetycznych. Układ wodny gwarantuje utrzymanie prawidłowej struktury komórki, zachowanie parametrów biochemicznych oraz właściwości białek i kwasów nukleinowych. Transport wody odbywa się zgodnie z gradientem stężeń, za pośrednictwem osmozy, czyli samorzutnego przechodzenia cząsteczek rozpuszczalnika przez półprzepuszczalną błonę, w tym wypadku błonę komórkową, pod wpływem zmian zewnętrznej osmolalności [7].

W układzie modelowym mogą występować zjawiska zakłócające proces osmozy. Ze względu na indywidualny charakter zaburzeń nawet najbardziej idealna membrana będzie charakteryzowała się różną przenikalnością związków niskocząsteczkowych [25]. Na powierzchni membrany może się wytworzyć potencjał polaryzujący środowisko na granicy faz membrana/roztwór lub bezpośrednio w przekroju membrany. Polaryzacja membrany zaburza przepływ naładowanych cząsteczek. Pojęcie idealnej membrany nie znajduje odzwierciedlenia w rzeczywistości. Nawet „inertne chemicznie” membrany otrzymane na bazie celulozy nie są obojętne względem otoczenia. Celuloza, z której wykonana jest membrana, jest acetylowana, sieciowana chemicznie, może zawierać śladową zawartość reszt fosforanowych itp. Obecność często niezidentyfikowanych zanieczyszczeń powoduje adsorpcję cząsteczek na membranie. W przypadku koloidów polaryzacja membrany może spowodować wystąpienie dodatkowej półprzepuszczalnej warstwy wytworzonej przez adsorbowane makrocząsteczki. W uzupełnieniu należy wspomnieć o możliwościach zatykania porów lub o ich deformacji. W przyrodzie procesy membranowe są naturalnym elementem życia komórki [19,66].

Procesowi osmozy w naturalny sposób towarzyszy zjawisko ciśnienia osmotycznego, które zależy od stężenia i rodzaju substancji oraz temperatury. **Ciśnienie osmotyczne** jest jednym z fizycznych parametrów środowiska limitującym wzrost i rozmnażanie się bakterii [10,37]. Zjawisko ciśnienia osmotycznego dobrze ilustruje zachowanie się dwóch roztworów oddzielonych od siebie półprzepuszczalną membraną zawierających różne stężenia lub rodzaje rozpuszczonej substancji. Do naszych rozważań przyjmujemy, że membrana będzie idealnie selektywna, to znaczy w pełni przepuszczalna dla rozpuszczalnika i nieprzepuszczalna dla substancji rozpuszczonej. Prawa termodynamiki narzucają roztworom dążenie do wyrównania stężeń. W idealnym układzie cząsteczki rozpuszczalnika będą dyfundowały przez membranę rozcieńczając roztwór o wyższym stężeniu. W wyniku tego procesu dojdzie do zmian objętości poszczególnych podukładów, a w przypadku układu zamkniętego wytworzy się różnica ciśnień. W chwili ustalenia równowagi, osiągnięta zostanie maksymalna różnica

ciśnienie, którą można nazwać ciśnieniem osmotycznym roztworu danej substancji.

Dla roztworów rozcieńczonych ciśnienie osmotyczne wyraża się wzorem van't Hoffa:

$$\Pi = cRT$$

(gdy fazą odniesienia jest czysty rozpuszczalnik)

lub

$$\Pi = (c_1 - c_2)RT$$

(gdy fazą odniesienia jest roztwór o stężeniu c_2)

c – stężenie molowe substancji rozpuszczonej [mol/dm³],

R – stała gazowa [8,314 J/mol×K],

T – temperatura [K].

Oznacza to, że ciśnienie osmotyczne jest wprost proporcjonalne do stężenia roztworu oraz do temperatury bezwzględnej [64]. W praktyce mamy do czynienia z membranami, które trudno nazwać selektywnymi. Na przykład pory dializacyjnej błony celulozowej pozwalają na dyfuzję relatywnie dużych cząstek. Błony biologiczne oprócz funkcji zamykania w określonej objętości organelli komórkowych zawierają wiele systemów aktywnego, błonowego transportu od jonów do makrocząstek. W przeciwieństwie do membran idealnych przepływy składników będą ulegały fluktuacjom. W przypadku organizmów żywych oraz wirusów, wartość ciśnienia osmotycznego będzie zależała od środowiska, etapu rozwoju komórki, stanu metabolicznego itd. Znajomość podstawowych praw rządzących osmozą i ciśnieniem osmotycznym może być pomocna w interpretacji wyników doświadczeń biologicznych. Parametry te są istotne w transporcie komórkowym, jak i w fizykochemii tkanek lub całych organów [1]. Istotne znaczenie w układzie biologicznym mają roztwory koloidalne. Chociaż stężenie molarne koloidu ze względu na dużą masę cząsteczkową jest niewielkie, to jednak właściwości fizykochemiczne makrocząstek tworzących koloid mogą podlegać fluktuacjom w wyniku zmian na granicy faz ciecz/ciecz. Zmieniać się może hydratacja, potencjał zeta, oddziaływania między cząsteczkami itp. Wartości ciśnienia osmotycznego koloidów (colloid osmotic pressure, oncotic pressure) pozwalają oszacować wzory empiryczne. Na przykład ciśnienie osmotyczne albuminy $\Pi = 2,8c + 0,18c^2 + 0,012c^3$, osocza $\Pi = 2,1c + 0,16c^2 + 0,009c^3$, globulin $\Pi = 1,6c + 0,15c^2 + 0,006c^3$ (stężenie białka c [g/100 ml], Π [mmHg]) [40].

W analizie ciśnienie osmotyczne wyznacza się przez pomiar zmiany temperatur zamarzania lub wrzenia roztworu i rozpuszczalnika. Inny sposób oznaczania wykorzystuje pomiar wydzielonego ciepła krystalizacji. W tym celu próbkę schładza się do temperatury poniżej temperatury zamarzania. Po zainicjowaniu krystalizacji dochodzi do wydzielania ciepła, którego miernikiem jest wzrastająca do wartości maksymalnej temperatura. Wydzielona energia powoduje nagrzewanie próbki, której wielkość jest skorelowana z osmolalnością roztworu. Ciśnienie osmotyczne roztworów niedegradujących błon lipidowych (np. niezawierających detergentów) można wyznaczać poprzez pomiar zmian pojemności komórek, w tym erytrocytów, w środowiskach hiper- i hipotonicznych [23]. Tradycyjna metoda pomiaru ciśnienia osmotycznego wykorzystuje

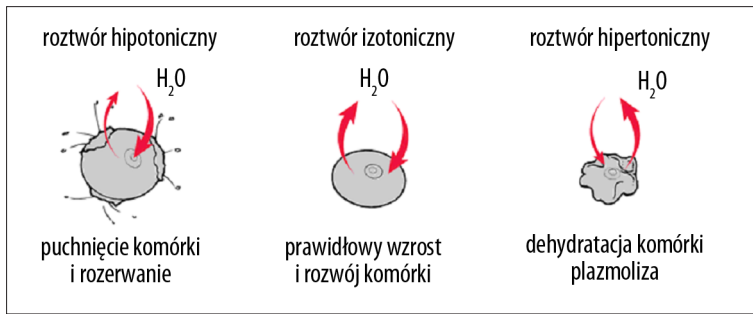
osmometry membranowe bezpośrednio mierzące zmiany ciśnienia roztworów przedzielonych membraną. W metodzie hydrostatycznej aparat złożony jest z dwóch zbiorników oddzielonych membraną. Po wypełnieniu zbiorników rozpuszczalnikiem i roztworem po ustalonym czasie wystąpi różnica ciśnień. Na innej zasadzie działa osmometr parowy. Do oznaczenia ciśnienia osmotycznego wykorzystuje się pomiar efektu cieplnego kondensacji par rozpuszczalnika w kropli badanego roztworu i rozpuszczalnika. Kondensacja par w kropli roztworu jest większa, stąd wyższy wzrost temperatury, który jest skorelowany z ciśnieniem osmotycznym badanego roztworu. Zjawisko ciśnienia osmotycznego może być wykorzystywane do wyznaczania masy molowej makrocząstek. Szczegółowy opis doświadczenia znajduje się w opracowaniu Krzywińskiego i Sieradzana [31].

Osmolalność, opisująca ciśnienie osmotyczne, to liczba moli substancji aktywnych znajdujących się w litrze rozpuszczalnika. Pojęcie **osmolalności** natomiast odnosi się do ilości moli substancji przypadających na kilogram rozpuszczalnika. Osmolalność wyrażana jest w osmolach. Jej wartość zależna jest od liczby osmotycznie aktywnych cząstek oraz ich kształtu, ładunku i wielkości. Ze względu na specyfikę ciśnienia osmotycznego osmol [osm] nie jest jednostką układu SI. Jednostką ciśnienia osmotycznego jest pascal [Pa]. Wartość osmola skorelowana jest ze stężeniem. Ekwiwalentną wartością ciśnienia osmotycznego 1 osm będzie charakteryzował się roztwór zawierający jednomolowe stężenie jonów lub substancji rozpuszczonej [14]. Zakładając całkowitą dysocjację 1 M roztwór NaCl będzie charakteryzowany przez ciśnienie osmotyczne równe 2 osmole/L a CaCl₂ 3 osmole/L (dysocjuje na trzy jony). Precyzyjna definicja mówi o korelacji stężenia osmotycznie czynnych cząstek rozpuszczonych w 22,4 L roztworu w temperaturze 0°C przy ciśnieniu zewnętrznym 1013,25 hPa. Praktycznie 1 osmole odpowiada takie stężenie rozpuszczanej substancji, które powoduje obniżenie temperatury krzepnięcia roztworu o 1,86°C.

Błona komórkowa ma stosunkowo dużą przepuszczalność dla wody. Wynika to z jej szybkiego transbłonowego transportu w odpowiedzi na zmiany osmotyczne środowiska oraz zmiany w strukturze komórki i koncentracji składników komórkowych. Akwaporyny, które mogą pośredniczyć w przyspieszonym transporcie wody zidentyfikowano w komórkach niektórych mikroorganizmów [3,6,24]. Jednak drobnoustroje nie mają możliwości aktywnego pompowania wody do i na zewnątrz komórki [24]. Zdolność mikroorganizmów do dostosowywania się do zmian zewnętrznej osmolalności, związanej głównie ze stężeniem NaCl, jest niezmiernie ważna dla ich wzrostu i przeżycia, stąd w toku ewolucji wykształciły się u nich liczne mechanizmy pozwalające im na szybką adaptację do zmieniających się warunków osmotycznych środowiska (ryc.1). Wzrost zewnętrznej osmolalności, ciśnienia osmotycznego, powoduje gwałtowny wypływ wody zgodnie z gradientem stężeń, skutkującą dehydratacją składników cytoplazmy i plazmolizą. Odwrotna sytuacja prowadzi do nadmiernego pobierania wody ze środowiska, co może spowodować jej rozerwanie [10].

W wielu sytuacjach trudny jest bezpośredni pomiar ciśnienia osmotycznego, ponieważ wartość ta ma znaczenie





Ryc. 1. Wpływ warunków osmotycznych na wzrost i funkcjonowanie komórki (wg [43] zmodyfikowany)

tylko w kontekście rozpatrywania dwóch roztworów oddzielonych półprzepuszczalną membraną. Większe znaczenie w opisywaniu osmotycznych właściwości roztworu ma pojęcie **potencjału osmotycznego** (π), które zależy od aktywności rozpuszczalnika i wyrażane jest wzorem:

$$\pi = (RT/V_w) \ln a_w,$$

gdzie

R – stała gazowa [8,314 J/mol×K],

T – temperatura [K],

V_w – objętość molowa wody [m³/mol-1],

a_w – aktywność wody.

Wzrost temperatury o 1K powoduje wzrost ciśnienia o 1/273. Zgodnie z definicją aktywność czystego rozpuszczalnika jest równa 1 (czysta chemicznie woda), więc potencjał osmotyczny każdego czystego rozpuszczalnika wynosi 0. Ogólnie dodanie substancji rozpuszczonej obniża aktywność rozpuszczalnika do wartości <1, więc potencjał osmotyczny roztworu jest zwykle ujemny. W mikrobiologii wartość aktywności wody (a_w) stosuje się w celu dokładniejszego określenia zapotrzebowania drobnoustrojów na wodę. Minimalna aktywność wody pozwalająca na wzrost i rozwój komórki jest różna dla różnych grup drobnoustrojów np. dla bakterii Gram-ujemnych wynosi 0,95, dla drożdży 0,88, natomiast dla halofilnych bakterii i glonów 0,75 [45]. Użyteczność potencjału osmotycznego polega na tym, iż wskazuje on, że gdy roztwór jest oddzielony od cząsteczek rozpuszczalnika przez membranę, która jest bardziej przepuszczalna dla rozpuszczalnika niż substancji rozpuszczonej, to cząsteczki rozpuszczalnika migrują z regionu o wyższym do regionu o niższym potencjale osmotycznym. Biologiczna definicja ciśnienia osmotycznego oznacza wzrost lub spadek siły osmotycznej środowiska działającej na dany organizm [61]. Aktywny proces radzenia sobie organizmów ze stresem osmotycznym jest rozumiany jako **osmoregulacja** [10,65].

Ze zjawiskiem osmoregulacji wiąże się także pojęcie **ciśnienia turgorowego**, które wywierane jest na warstwę peptydoglikanu budującego ściany bakterii, wynikające z różnicy potencjału osmotycznego między wnętrzem a otoczeniem komórki. Wpływ na ciśnienie turgorowe mają substancje osmoaktywne, magazynowane w cytoplazmie. Żywe komórki mają dodatnie ciśnienie turgorowe, które zapewnia im prawidłowe funkcjonowanie i rozwój. Dostarcza ono m.in. podstawowej siły mechanicznej niezbędnej do rozwoju wielowarstwowej ściany komórkowej. Turgor wpływa zatem na morfogenezę komórki bakteryjnej. Jeśli komórka ma przyjąć dowolny kształt, poza sferycznym, musi zostać poddana procesom rozciągania

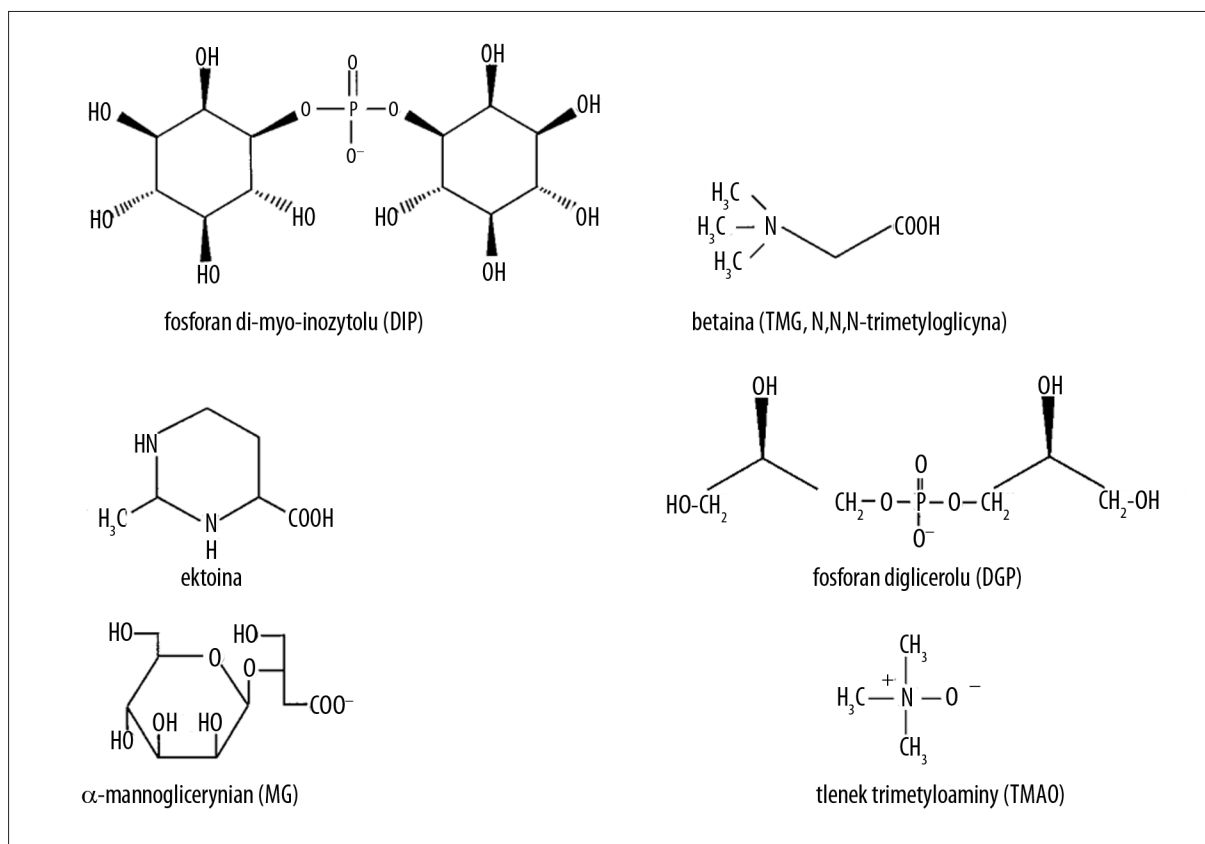
ściany lub jej rozszerzania przez wstawianie nowych fragmentów budulcowych ściany. Rozbudowa musi postępować w taki sposób, aby ściana pozostała integralną strukturą, chroniącą komórkę przed pękaniem pod wpływem jakichkolwiek czynników mechanicznych [21]. Wartość ciśnienia turgorowego zależy od rodzaju bakterii, literatura podaje wartości 3-10 bar dla bakterii Gram-ujemnych i 20 bar dla bakterii Gram-dodatnich. Komórki utrzymują ponadto nieco wyższe ciśnienie turgorowe w stosunku do otoczenia poprzez akumulację substancji osmoaktywnych [27].

PRZYSTOSOWANIA MIKROORGANIZMÓW DO ZMIAN WARUNKÓW OSMOTYCZNYCH ŚRODOWISKA

Aby utrzymać ustaloną zawartość wody w komórce (turgor) i uniknąć niekorzystnych następstw zwiększającej się osmolarności środowiska organizmy muszą zachować w cytoplazmie odpowiednie stężenia cząsteczek osmoregulacyjnych (**compatible solutes – cząsteczki osmoregulacyjne, osmolity**) oraz jonów nieorganicznych, głównie K⁺ i Cl⁻, w stosunku do otaczającego medium. Wybrane przykłady substancji osmoregulacyjnych zidentyfikowanych w komórkach *Procarvota* przedstawiono na ryc. 2.

Jedną z możliwości utrzymania homeostazy komórki to pobieranie jonów z otoczenia, określana jako strategia typu „salt-in”. Sposób ten jest charakterystyczny dla wysoce wyspecjalizowanych mikroorganizmów, zdolnych do życia niemal w nasyconych solankach, takich jak halofilne *Archea* (*Halobacteriaceae*), ale także niektóre aerobowe i anaerobowe halofilne *Bacteria* (np. *Salinibacter ruber*), polegający na ograniczeniu wzrostu w warunkach niskich stężeń soli w środowisku. U tych organizmów całkowita zawartość soli w komórce odpowiada w przybliżeniu stężeniom pozakomórkowym. Cytoplazmatyczna zawartość jonów chloru jest zwykle podobna do obecnej w podłożu, jonów sodu czasem bywa niższa, natomiast jony potasu mogą występować nawet w większych stężeniach w porównaniu do środowiska zewnętrznego komórki. Strategię tę wykorzystuje niewielka liczba mikroorganizmów ograniczona do rzadkich nisz ekologicznych [11,41].

Drugą z możliwości to strategia typu „salt-out”, którą stosuje większość komórek/organizmów. Polega ona na tym, że komórka utrzymuje raczej stałe, niskie stężenie jonów nieorganicznych w cytoplazmie [20,22]. Niski potencjał osmotyczny wody w obecności wysokich stężeń pozakomórkowych soli jest osiągnięty dzięki gromadzeniu cząsteczek osmoregulacyjnych, określanymi jako małe, rozpuszczalne cząsteczki organiczne, które nie ingerują w centralny metabolizm komórki, nawet jeśli są gromadzone w dużych stężeniach [12]. Przy wysokim stężeniu w cytoplazmie jonów

Ryc. 2. Budowa chemiczna wybranych substancji osmoregulacyjnych występujących u *Procarvota* (wg [48,52])

Na^+/Cl^- strategia „salt-out” jest dla bakterii niekorzystna, ponieważ aktywność metaboliczna jest hamowana przez duże stężenia soli, co prowadzi do licznych zmian w funkcjonowaniu komórki. Z tego względu niezwykle ważna jest zawartość jonów Na^+/Cl^- oraz rola jonów K^+ magazynowanych w cytoplazmie i wymienianych z Na^+ , które w dużych ilościach są dla komórki toksyczne. Dla optymalnych warunków wzrostu bakterie starają się utrzymać na stałym poziomie stosunek Na^+/K^+ w cytoplazmie [59]. Wyniki badań Shabali [58] pokazują także, iż w przypadku braku osmotitów w środowisku, bakterie, takie jak *Escherichia coli*, przestawiają się na intensywne pobieranie jonów K^+ w celu zachowania równowagi osmotycznej w warunkach hiperosmotycznych. Autorka sugeruje, że rola substancji osmoregulacyjnych w dostosowywaniu się bakterii do warunków zewnętrznej osmotyczności jest pośrednia i ograniczona do sprawnej regulacji działania licznych kanałów jonowych i transporterów. Warto również zauważyć, iż do wzrostu niektórych bakterii obecność jonów chloru jest niezbędna w warunkach hiperosmotycznych, spowodowanych wysokim stężeniem jonów Na^+ . Jony Cl^- pełnią ważną rolę w utrzymywaniu homeostazy Na^+ przez wywoływanie ich wypływu z komórki i/lub udział w procesie transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego [22]. Strategia typu „salt-out”, wykorzystywana m.in. przez cyjanobakterie zamieszkujące słodko i słonowodne siedliska, została dokładnie opisana przez Hagemanna [20] w artykule dotyczącym molekularnego podłoża przystosowywania się cyjanobakterii do różnych warunków zasolenia. Warto również zauważyć, iż wykorzystywany przez te organizmy system „salt-out” przypomina ten występujący u heterotroficznych bakterii, takich jak *E. coli* czy *Bacillus subtilis*.

W przeciwieństwie do nich jednak fotoautotroficzne cyjanobakterie preferują syntezę *de novo* niż pobieranie substancji osmoregulacyjnych z otoczenia, co jest związane z ich naturalnym środowiskiem życia, ubogim w rozpuszczalne związki organiczne.

Zawartość osmotitów w komórce regulowana jest przez ciśnienie osmotyczne. Badania wykazały także zasadniczą różnicę w podatności na plazmolizę między bakteriami Gram-dodatnimi (mniej podatne) i Gram-ujemnymi. Ma to związek zarówno z odmienną budową komórki jak i ciśnieniem turgorowym, które u bakterii Gram-dodatnich jest wyższe. W sytuacji stresu osmotycznego bowiem bakterie Gram-ujemne gromadzą w komórce duże ilości glutamianu potasu, podczas gdy Gram-dodatnie gromadzą prolinę. Przy braku stresu osmotycznego bakterie Gram-dodatnie mają zatem duże zasoby aminokwasów, z przewagą glutamianu. Ponadto większe jest u nich stężenie jonów K^+ , co skutkuje utrzymaniem wyższego turgoru komórkowego [49,60].

SUBSTANCJE OSMOREGULACYJNE

Substancje osmoregulacyjne odpowiadają za utrzymanie właściwego turgoru komórki oraz regulację ciśnienia osmotycznego. Należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie substancje osmoaktywne mogą wykazywać właściwości osmoregulacyjne. Wśród licznej grupy różnych substancji organicznych do osmotitów zaliczamy m.in. aminokwasy, krótkie peptydy, cukry czy alkohole wielowodorotlenowe (tab. 1). Wszystkie charakteryzują się kilkoma wspólnymi cechami:



1. Są to małe, amfoteryczne lub obojętne cząsteczki organiczne, dobrze rozpuszczalne w wodzie, tolerowane przez komórki nawet w dużych stężeniach molarnych.
2. Mają niską molekularną masę cząsteczkową.
3. Nie wpływają negatywnie na metabolizm.
4. Stabilizują struktury białek i błon komórkowych, nie obniżają jednak aktywności enzymów.
5. Mogą być syntetyzowane *de novo* lub pobierane przez komórki ze środowiska.
6. Zwykle są to produkty końcowe reakcji metabolicznych, które dodatkowo mają właściwości osmoochronne w stosunku do składników cytoplazmy.
7. Ciśnienie osmotyczne wymusza w sposób selektywny ich kontrolowane przenikanie przez błonę komórkową.

W zależności od rodzaju drobnoustroju różny jest typ osmolitów, mechanizm ich pobierania ze środowiska oraz wpływ na wzrost i rozwój komórki. Bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne różnią się między sobą preferencjami co do rodzaju gromadzonych substancji osmoregulacyjnych. W warunkach stresu osmotycznego bakterie Gram-ujemne magazynują głównie glutaminian oraz jony potasu, natomiast Gram-dodatnie akumulują aminokwasy, zwłaszcza prolinę. Brak warunków stresu osmotycznego wskazuje na inne preferencje mikroorganizmów. W komórkach bakterii Gram-dodatnich przeważają wtedy jony K^+ oraz kwas glutaminowy, ponieważ utrzymują one wyższe ciśnienie turgorowe. W przypadku proliny i betainy na uwagę zasługuje to, iż komórki bakterii Gram-dodatnich syntetyzują te substancje, podczas gdy Gram-ujemne pobierają ze środowiska zewnętrznego. Jest to związane z różnym oddziaływaniem tej substancji na rozwój drobnoustrojów. Betaina stymuluje wzrost pałeczek jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae* w warunkach stresu osmotycznego wywołanego obecnością KCl i NaCl, a także sacharozę. Z kolei stymulacja wzrostu bakterii probiotycznych z grupy *Lactobacillus* i *Lactococcus* obserwowana jest tylko w obecności zwiększonych stężeń soli [16,33]. Niektóre klasy substancji osmoregulacyjnych są mniej lub bardziej ograniczone do specjalnych grup mikroorganizmów. W komórkach *Archea* gromadzone są m.in.: α -glutaminian, β -glutaminian czy N-acetylo- β -lizyna [39]. Termofile i ekstermofile, zaliczane do *Archea*, magazynują charakterystyczne osmolity (DIP, DGP, MG), które nie odgrywają żadnej roli u organizmów mezofilnych. Może to sugerować ich silny związek z przystosowaniem się do życia w warunkach wysokiej temperatury. Mechanizmy transportu i gromadzenia substancji osmoregulacyjnych u ekstermofilów opisują Pflüger i Müller [48]. Niezwykle interesujące wydają się również badania Goha i wsp. [17], dotyczące nowo poznanych substancji osmoregulacyjnych sinic pochodzących ze stromatolitów występujących w Australii. Gatunki, takie jak *Gleotheca* sp. czy *Cyanothece* sp. magazynują w swoich komórkach tlenek trimetylaminy (trimethylamine-N-oxide, TMAO), niezidentyfikowany dotąd jako osmolit u innych mikroorganizmów. Ponadto u *Plectonema* sp. i *Symplocia* sp. opisano także nieznanne dotychczas oligosacharydy, które być może pełnią jednocześnie funkcje termoochronne.

OSMODETEKCJA I OSMOSYGNALIZACJA

Zmiany ciśnienia osmotycznego środowiska powodują natychmiastową reakcję komórki bakteryjnej, która przede wszystkim stara się utrzymać turgor i objętość, takie jak

dla normalnych fizjologicznie warunków życia. Jest to możliwe dzięki wykształceniu licznych mechanizmów osmoadaptacyjnych, polegających na odbieraniu, rejestrowaniu i przetwarzaniu informacji o zmianach ciśnienia osmotycznego środowiska.

Zmieniające się ciśnienie osmotyczne środowiska może, jeśli wzrasta, prowadzić do gromadzenia osmolitów przez bakterie (stres hiperosmotyczny). Spadek ciśnienia osmotycznego, czyli warunki stresu hiposmotycznego, powoduje natomiast wyrzut syntetyzowanych wewnątrzkomórkowo substancji osmoregulacyjnych na zewnątrz komórki. Bakterie mogą zatem zarówno pobierać, jak i pozbywać się osmolitów w warunkach narażenia na działanie stresu osmotycznego.

Komórki bakterii Gram-ujemnych otoczone są błoną komórkową, cienką warstwą peptydoglikanu (mureiny) oraz błoną zewnętrzną, w której zakotwiczone są cząsteczki lipopolisacharydu (LPS). Gram-dodatnie bakterie mają grubszą warstwę mureiny, pozbawione są jednak LPS. Transport osmolitów odbywa się za pośrednictwem swoistych białek błonowych reagujących na zmieniające się warunki zasolenia środowiska. Zarówno *Bacteria* jak i *Archea*, w wyniku ewolucji, wykształciły specjalistyczne systemy pobierania substancji osmoregulacyjnych z otoczenia. Cząsteczki te są uwalniane do środowiska przez różne mikroorganizmy z butwiejących szczątków roślin i zwierząt oraz produktów wydalania ssaków. Mechanizmy pobierania tych substancji bardzo często są zupełnie inne od systemów pobierania substancji odżywczych. Transportery osmolitów ewoluowały w kierunku wysokiego powinowactwa do pobieranego składnika i sprawności fizjologicznej. Efektywnie funkcjonują w warunkach wysokiej osmolalności środowiska oraz dużej siły jonowej, które najczęściej blokują pobieranie składników odżywczych. Mechanizmy pobierania substancji osmoregulacyjnych są kontrolowane na poziomie genetycznym oraz enzymatycznym (aktywacja białek transbłonowych) [27,50]. Pod pojęciem **osmosensora** należy rozumieć białko, które reaguje na zmiany potencjału osmotycznego środowiska, struktury czy składu komórki, a następnie generuje sygnały wewnątrzkomórkowe i aktywację odpowiedzi osmoregulacyjnej. System osmoregulacyjny pobierania i wydalania osmolitów *Eubacteria* obejmuje: **transportery**, **kinazy histydynowe** będące składnikami dwóch transkrypcyjnych systemów regulacyjnych oraz **kanały** uaktywniane przez bodźce mechaniczne (mechanosensitive channel – Msc) [32].

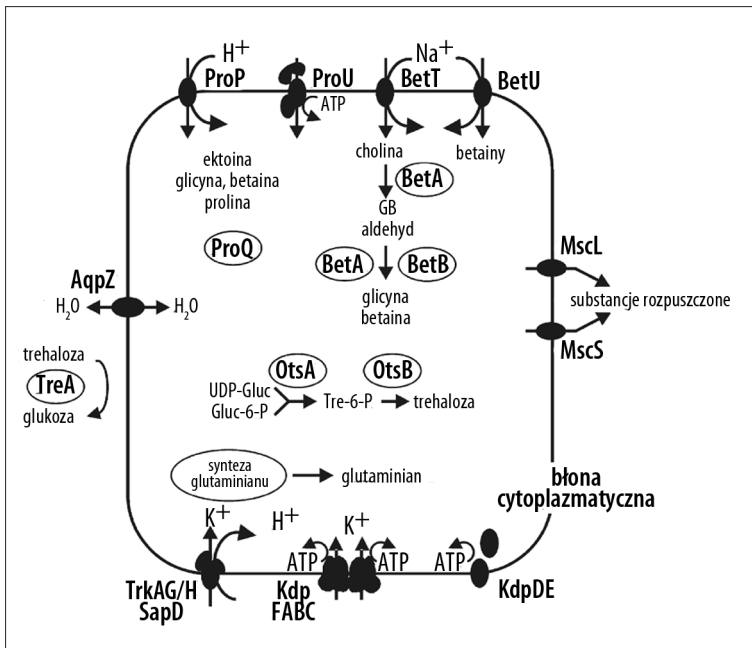
Główne transportery odpowiedzialne za pobieranie substancji osmoregulacyjnych, takie jak: BetP u *Corynebacterium glutamicum* [38,44], ProP, ProU, BetT u *E. coli* czy *Yersinia enterocolitica* [2] oraz OpuA, OpuC, OpuD (Osmoprotectant uptake) u *B. subtilis* czy *E. coli* (ryc. 3), reagują na zmiany ciśnienia osmotycznego i aktywują odpowiedź osmoochronną bez udziału innych białek [26,30].

Równowaga między aktywnymi i nieaktywnymi konformacjami transporterów zależy od własności jonów wewnątrzkomórkowych działających na ich cytoplazmatyczne domeny C-końcowe. Jednak właściwy przejaw działania bodźca i charakter odpowiedzi jest różny dla różnych transporterów. Transbłonowe kinazy histydynowe reagują na zmiany ciśnienia osmotycznego poprzez oddziaływanie na czynniki

Tabela 1. Substancje osmoregulacyjne wykorzystywane przez bakterie

Substancja osmoregulacyjna	Obecność u mikroorganizmów	Rola w regulacji ciśnienia osmotycznego	Piśmiennictwo
K ⁺	powszechne u wszystkich bakterii	jedne z głównych osmolitów występujących w cytoplazmie bakterii, utrzymują prawidłowy turgor komórki poprzez ciągłą, częściową aktywację mechanizmów przepływu potasu komórka sprawnie reaguje na zmiany ciśnienia osmotycznego, K ⁺ mogą także wpływać na syntezę innych substancji osmoregulacyjnych	[10,11], [20,27], [28,29]
Glutamina i glutaminiany	bakterie Gram-ujemne; bakterie słabo lub niehalofilne	ważne substancje osmoregulacyjne, w warunkach hiperosmolarnych ich stężenie w komórce może wzrastać kilkakrotnie, utrzymują równowagę elektrolityczną cytoplazmy; stężenie glutaminy u bakterii Gram-dodatnich jest 8–10 większe niż u Gram-ujemnych; u wielu bakterii w warunkach stresu osmotycznego aktywacja syntezy glutaminy odbywa się na skutek gromadzenia się w cytoplazmie dużych ilości K ⁺	[10,11,50]
Sacharoza i trehaloza	bakterie heterotroficzne, słabo lub niehalofilne	syntetyzowane przez komórkę, trehaloza może stanowić do 20% wszystkich osmolitów w środowisku otaczającym komórkę, mają wszechstronne działanie w adaptacji komórki do różnych warunków stresu komórkowego, takich jak: zmieniające się ciśnienie osmotyczne, wysychanie, niska i wysoka temperatura, stabilizują błony komórkowe i ciśnienie osmotyczne	[10,20,27,50,51]
Betaina (TMG, N,N,N-trimetyloglicyna)	bakterie chemotroficzne, głównie umiarkowanie i ekstremalnie halofilne oraz bakterie halotolerancyjne	jeden z najważniejszych osmolitów pobierany przez komórki z otoczenia (z wyjątkiem cyjanobakterii, które syntetyzują ją <i>de novo</i>), może być przez bakterie otrzymywana w reakcji oksydacji choline, egzogenna betaina u niektórych bakterii może redukować zahamowanie wzrostu spowodowane hiperosmolarnością lub stymulować oddychanie komórkowe (bakterie halofilne) w środowisku o zwiększonym stężeniu NaCl	[10,11,20,27,29,50]
Prolina	powszechna u wszystkich bakterii, bakterie słabo lub niehalofilne	otrzymywana przez bakterie w wyniku syntezy komórkowej lub pobierana z otoczenia, wytwarzanie proliny zależne jest od wcześniejszego stężenia jonów potasu, które inicjują sygnał do wzmożonej syntezy tego osmolitu	[10,20,22,50]
Ektoina	aerobowe chemoheterotroficzne <i>Eubacteria</i> , umiarkowanie i ekstremalnie halofilne i halotolerancyjne bakterie	zapewniają znacznie skuteczniejszą ochronę enzymom komórkowym niż inne osmolity na działanie różnych czynników stresu komórkowego; w warunkach zahamowanego wzrostu bakterii, przez ciśnienie osmotyczne czy temperaturę, dodanie ektoiny znosi ten efekt, obserwuje się zatem silne działanie protekcyjne w stosunku do białek	[11,63]
Hydroxyektoina	halofilne i halotolerancyjne bakterie Gram-dodatnie		
Cholina	powszechna u bakterii, takich jak <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>Vibrio costicola</i>	w warunkach stresu osmotycznego może być prekursorem syntezy betainy, proces ten wymaga dwóch etapów utleniania dlatego cholina nie może być wykorzystywana jako osmoprotektant w warunkach beztlenowych	[10,29]
Glukozyglicerol (GG)	bakterie termofilne, cyjanobakterie, hipertermofilne <i>Archea</i>	syntetyzowany i gromadzony w warunkach stresu osmotycznego, ale także ograniczonej ilości azotu, kiedy gwałtownie spada stężenie osmolitów aminokwasowych – glutaminy i glutaminyanu	[13,20]





Ryc. 3. System osmoregulacyjny *Escherichia coli* (wg [53] zmodyfikowany). Transport wody odbywa się z udziałem błonowych akwaporyn (AqpZ). W procesie akumulacji jonów K^+ pośredniczą natomiast transportery, takie jak TrkA(G/H)SapD oraz KdpFABC. Kontrola transkrypcji genów *kdpFABC* odbywa się z udziałem dwuelementowego układu KdpDE. Transportery ProP, ProU, BetT oraz BetU umożliwiają akumulację osmolitów organicznych. Synteza betainy katalizowana jest przez enzymy BetA i BetB, natomiast synteza trehalozy przez enzymy OtsA i OtsB. Wpływ substancji osmoregulacyjnych odbywa się za pośrednictwem kanałów uaktywnianych przez bodźce mechaniczne MscL i MscS

transkrypcyjne, które aktywują geny kodujące motywy K^+ ATP-azy jednego z transporterów jonów potasu. Główne osmosensory mogą reagować na zmiany aktywności wody tak samo jak chemosensory reagują na zmiany aktywności ligandów. Jednak zmiana ciśnienia osmotycznego wywołuje zmiany właściwości komórkowych. W ten sposób pośredni osmosensor może wykrywać zmiany ciśnienia osmotycznego aktywując zmiany w objętości komórki, turgorze komórkowym, odkształceniu błony komórkowej lub zmiany w stężeniu konkretnych substancji osmoregulacyjnych, sile jonowej oraz gromadzeniu się cząsteczek w cytoplazmie [65]. Obecna wiedza na temat osmosensory dotyczy przede wszystkim rozpoznawania sygnałów z otoczenia, co jest powszechne także dla innych sytuacji stresu komórkowego. Ograniczona jest natomiast wiedza na temat promotorów genów, genów i kodowanych przez nie białek rzeczywiście zaangażowanych w regulację stężenia soli w komórce.

Oprócz pobierania substancji osmoregulacyjnych z otoczenia mikroorganizmy mogą, za pośrednictwem endogennej syntezy, magazynować osmolity w dużych ilościach jeszcze przed wystąpieniem warunków stresu osmotycznego. Jest to reakcja przypominająca „robienie zapasów”, jednak może się okazać wyjątkowo niekorzystna dla komórki, jeśli ciśnienie osmotyczne środowiska zamiast wzrastać, znacznie spadać. W takiej sytuacji obserwowany jest bardzo szybki wpływ substancji osmoregulacyjnych kanałami Msc. Białka te odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji ciśnienia turgoru, które ma zasadnicze znaczenie dla podziału i wzrostu komórek bakteryjnych. Obecnie uważa się, iż cząsteczki te pojawiły się bardzo wcześnie w toku ewolucji, odgrywając główną rolę w strategii przetrwania mikroorganizmów, dając początek podobnym kanałom w komórkach *Prokaryota* i *Eucaryota* [35]. Najbardziej znanymi i najlepiej opisanymi kanałami typu Msc są białka MscL, MscS i MscM występujące u *E. coli* [4]. Kanały aktywowane są pod wpływem odkształceń w strukturze błony komórkowej wynikających ze zwiększenia objętości komórki, która pobiera duże ilości wody.

Otwarcie kanałów wywołuje wpływ substancji osmoregulacyjnych. Proces ten może być inicjowany działaniem bodźców mechanicznych lub zależny od systemu transportu opartego na przenośnikach [55].

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE CZĄSTECZEK OSMOREGULACYJNYCH

Neotrofilne, halofilne oraz haloalkalofilne bakterie są producentami zarówno alkalicznych enzymów jak i organicznych cząsteczek osmoregulacyjnych. Swoisty charakter tych związków czyni je niezwykle cennymi narzędziami w wielu dziedzinach nauki i przemysłu, takich jak biotechnologia, kosmetologia, medycyna, farmacja czy agrokultura [11,15]. Bakterie te do osiągnięcia równowagi osmotycznej w środowiskach o dużym zasoleniu syntetyzują znaczne ilości osmolitów, takich jak: ektoina, betaina czy hydroksyektoina. Poddając komórki działaniu szoku hiperosmotycznego na skalę przemysłową można wywołać u nich szybkie uwalnianie dużych ilości substancji osmoregulacyjnych [15].

Wykorzystanie cząsteczek osmoregulacyjnych w biotechnologii związane jest głównie z ich zastosowaniem w nowoczesnych systemach buforujących do ochrony aktywności komercyjnie stosowanych enzymów. Jako przykład można wymienić działanie **ektoiny** oraz **hydroksyektoiny** [42]. Obie substancje stabilizują kwasy nukleinowe oraz liczne labilne enzymy *in vitro*, co znacznie wydłuża ich czas działania. Ponadto chronią enzymy przed działaniem wysokiej i niskiej temperatury, wysychaniem, a także wpływem wolnych rodników tlenowych i promieniowaniem. Te ostatnie mają ogromne znaczenie w kosmetologii, wykazano bowiem ochronne działanie ektoiny na komórki ludzkiej skóry poddane szkodliwemu działaniu promieniowania ultrafioletowego. Ochronne działanie ektoiny i hydroksyektoiny w stosunku do enzymów zauważono także w procesach fermentacyjnych, zwłaszcza u bakterii kwasu mlekowego [34]. Znakomitymi stabilizatorami enzymów, m.in. dehydrogenazy mleczanowej czy białek z grupy reduktaz, są również ujemnie naładowane cząsteczki

glukoglicerolu i glukoglicerynianu szeroko rozpowszechnione i pozyskiwane z bakterii (hiper)termofilnych [56].

Ogromne znaczenie ektoiny w medycynie przypisuje się jej właściwościom przeciwzapalnym oraz przeciwwirusowym. Największymi producentami ektoiny oraz hydroksyektoiny są α - oraz γ -*Proteobacteria* i *Actinobacteridae*, np. *Halomonas elongata* czy *Chromohalobacter selexigens* [47,57]. Ponadto wykazano, że ektoina chroni błony komórkowe przed uszkodzeniami spowodowanymi działaniem surfaktantów. Jak się okazuje miejscowe zastosowanie emulsji wodnych z dodatkiem ektoiny zmniejsza narażenie skóry na wysychanie, co świadczy o jej nawilżających właściwościach. Ze względu na wyjątkową aktywność wiązania wody ektoina może być szczególnie przydatna w zapobieganiu utracie wody w suchej i atopowej skórze, w odzyskaniu zdrowego wyglądu skóry i zapobieganiu jej starzenia się [18].

Organiczne cząsteczki osmoregulacyjne, takie jak **betaina** znane są ze swoich właściwości kriochronnych. Z tego względu znalazły zastosowanie jako stabilizatory w procesie zamrażania i długoterminowego przechowywania komórek mikroorganizmów. Ich działanie może być skuteczniejsze niż powszechnie stosowanych albuminy czy mieszanki trehalozy i dekstranu [9]. Betaina stosowana jest także w terapii kompleksowej chorób układu krwionośnego, a także schorzeń o podłożu neurologicznym i psychicznym. Obniża prawdopodobieństwo wystąpienia ataku serca, zatoru, udaru czy chorób obwodowych naczyń krwionośnych [62].

Ciekawym zagadnieniem wydaje się zastosowanie cząsteczek osmoregulacyjnych w rolnictwie. Okazało się, iż efekt działania osmolitów nie jest swoisty gatunkowo, co pozwala na swobodne wprowadzenie systemu osmoregulacyjnego do komórek roślin. Próby takie zostały już podjęte w stosunku do genów ektoiny i betainy, którymi transformowano rośliny niehalofilne, zwiększając w ten sposób ich odporność na stres osmotyczny środowiska czy wpływ niskiej temperatury [8,46,54].

WPLYW CIŚNIENIA OSMOTYCZNEGO NA PRZEŻYwalNOŚĆ I STRUKTURĘ KOMÓRKOWE BAKTERII

Błony biologiczne są bardziej przepuszczalne dla wody niż dla większości substancji rozpuszczonych, dlatego stężenie tych substancji w otoczeniu ma ogromny wpływ na komórki żywe. W komórkach poddawanych działaniu stresu osmotycznego mogą się uaktywniać dwa mechanizmy reakcji. Pierwszy dotyczy pasywnego wypływu wody z komórki, powodującego spadek ciśnienia osmotycznego i w efekcie śmierć komórki. Dochodzi bowiem do zmniejszenia objętości komórki spowodowanej redukcją objętości cytoplazmy. Drugi mechanizm, uruchamiany gdy spadek potencjału wody nie jest zbyt duży, polega na aktywacji systemu osmoregulacyjnego komórki. Następuje szybka synteza osmolitów, zmianie ulega przepuszczalność błony komórkowej, co prowadzi do poboru wody z otoczenia. Na przykład u *E. coli* jest to kontrolowane gromadzenie jonów K^+ , a następnie akumulacja organicznych cząsteczek proliny i/lub betainy. Ta biologiczna odpowiedź pozwala komórce na przywrócenie objętości, jeśli nie doszło do uszkodzenia błony komórkowej. Uszkodzenia takie

stanowią bowiem główny skutek działania stresu osmotycznego, ale również innych czynników środowiskowych, takich jak temperatura czy ciśnienie osmotyczne. Komórki *E. coli* poddawane działaniu stresu osmotycznego, wywołanego stężeniem glicerolu, wykazywały zmiany żywotności w zależności od wielkości ciśnienia osmotycznego i temperatury. Zwiększające się ciśnienie osmotyczne z 26 do ponad 133 MPa powodowało spadek żywotności komórek z ponad 80 do 10%. Najlepiej tolerowane zmiany ciśnienia osmotycznego mieściły się w zakresie 1,38–35 MPa. Kombinacja działania ciśnienia osmotycznego i temperatury (4, 10, 30 i 37°C) miała zróżnicowany wpływ na komórki. W przedziale 1,38–35 MPa temperatura wpływała na przeżywalność komórek mikroorganizmów, wyższe wartości ciśnienia (>35 MPa) i temperatury drastycznie ograniczały jednak ich wzrost. Ciekawe są również obserwacje, z których wynika, że przy bardzo wysokich wartościach ciśnienia osmotycznego (82–133 MPa) i niskiej temperaturze (4–10°C) żywotność bakterii jest utrzymywana na poziomie ponad 10%, spada natomiast wraz ze wzrostem temperatury [37].

Do prawidłowego funkcjonowania komórki oraz ochrony przed śmiercią mikroorganizmy utrzymują równowagę między dehydratacją a rehydratacją, ponieważ żywotność bakterii jest znacznie lepsza, kiedy procesy te przebiegają stopniowo i powoli. Gwałtowne zmiany wywołane szokiem osmotycznym mogą prowadzić m.in. do zmian w strukturze fosfolipidowej błony komórkowej [5]. W strukturze błony komórkowej większości bakterii występują amfoteryczne i anionowe fosfolipidy, takie jak fosfatydyloetanolamina i fosfatydyloglicerol oraz difosfatydyloglicerol (kardiolipina). Poddanie bakterii działaniu stresu osmotycznego, wywołanego działaniem różnych stężeń soli, powoduje zmiany w proporcji między dwoma rodzajami fosfolipidów błonowych. Następuje gwałtowny wzrost zawartości cząsteczek anionowych i jednoczesny spadek fosfolipidów amfoterycznych. U *E. coli* stres osmotyczny wywołany działaniem elektrolitów i nieelektrolitów, powoduje wzrost zawartości kardiolipiny a spadek fosfatydyloetanolaminy. Zmiana zawartości frakcji fosfolipidowej błony ma także bezpośredni wpływ na aktywność i funkcjonowanie transporterów błonowych np. ProP [53]. Badania Mille i wsp. [37] wykazały, iż komórki *E. coli* pod wpływem wysokiego ciśnienia osmotycznego 26–40 MPa wykazują drastyczny spadek objętości komórki na skutek mechanicznych uszkodzeń błony komórkowej i deformacji kurczącej się komórki. Zmiany na powierzchni komórki, takie jak pęcherzykowatość błony, były nieodwracalne, kiedy dehydratacja a następnie rehydratacja przebiegały gwałtownie.

Czynniki środowiska życia bakterii, takie jak temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne, wyczerpanie składników odżywczych oraz obecność cząsteczek toksycznych bądź hamujących wzrost (np. antybiotyki), mogą mieć niekorzystny wpływ na rozwój komórki. Może się to przejawiać w zahamowaniu wzrostu lub nawet śmierci komórki. Badania grupy McMahona [36] wykazały, iż stres osmotyczny (>4,5% zasolenia) oraz niskie pH (<5) prowadzą do wzrostu antybiotykooporności patogenów pokarmowych, takich jak *E. coli*, *Salmonella enterica* czy *S. aureus*. Redukcja działania czynnika stresowego pozwalała na utrzymanie braku wrażliwości na antybiotyki, co sugeruje, że działanie subletalnych



warunków stresowych indukuje stabilny wzrost lekooporności. W praktyce może to oznaczać, że zastosowanie subletalnych (ograniczających wzrost), bardziej niż letalnych (bójczych) warunków konserwujących, może prowadzić do rozwoju lekooporności wśród znanych patogenów żywnościowych.

PODSUMOWANIE

Wzrost i rozmnażanie się bakterii w warunkach zmiennej ciśnienia osmotycznego środowiska zależne są od działania wielu czynników. Jednym z najważniejszych mechanizmów osmoregulacyjnych, pozwalających na adaptację

do nowych warunków zewnętrznych, jest gromadzenie swoistych substancji osmoregulacyjnych, tzw. osmolitów. Obecnie opisanych jest wiele mechanizmów osmoregulacyjnych oraz białek zaangażowanych w aktywny transport osmolitów do komórki. Znajomość wpływu czynników środowiskowych, zwłaszcza ciśnienia osmotycznego, na bakterie pozwala na ich odpowiednie wykorzystanie, m.in. w przemyśle biotechnologicznym czy spożywcym. Dzięki sprawniej regulacji działania danego parametru można dokładnie kierować szybkością podziałów komórkowych, decydować o zabicu komórki, ale także kontrolować przebieg wielu różnych reakcji enzymatycznych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raft M., Roberts K., Walter P.: Molecular biology of the cell. Garland Science, 4th Edition, 2002
- [2] Annamalai T., Venkitanarayanan K.: Role of proP and proU in betaine uptake by *Yersinia enterocolitica* under cold and osmotic stress conditions. Appl. Environ. Microbiol., 2009; 75: 1471–1477
- [3] Bonhivers M., Carbrey J.M., Gould S.J., Agre P.: Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. J. Biol. Chem., 1998; 273: 27565–27572
- [4] Booth I.R., Louis P.: Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Microbiol., 1999; 2: 166–169
- [5] Brown G.R., Sutcliffe I.C., Bendell D., Cummings S.P.: The modification of the membrane of *Oceanomonas baumannii* when subjected to both osmotic and organic solvent stress. FEMS Microbiol. Lett., 2000; 189: 149–154
- [6] Calamita G., Bishai W.R., Preston G.M., Guggino W.B., Agre P.: Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 1995; 270: 29063–29066
- [7] Cath T.Y., Childress A.E., Elimelech M.: Forward osmosis: principles, applications, and recent developments. J. Membrane Sci., 2006; 281: 70–87
- [8] Chen T.H., Murata N.: Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. Trends Plant. Sci., 2008; 13: 499–505
- [9] Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D.: Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. J. Microbiol. Methods, 2004; 58: 31–38
- [10] Csonka L.N.: Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev., 1989; 53: 121–147
- [11] Detkova E.N., Boltianskaia I.V.: Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: role of osmoregulators and their possible practical application. Mikrobiologija, 2007; 76: 581–593
- [12] Empadinhas N., da Costa M.S.: Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. Int. Microbiol., 2008; 11: 151–161
- [13] Empadinhas N., da Costa M.S.: Diversity, biological roles and biosynthetic pathways for sugar-glycerate containing compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. Environ. Microbiol., 2011; 13: 2056–2077
- [14] Erstad B.L.: Osmolality and osmolarity: narrowing the terminology gap. Pharmacotherapy, 2003; 23: 1085–1086
- [15] Fallet C., Rohe P., Franco-Lara E.: Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress. Biotechnol. Bioeng., 2010; 107: 124–133
- [16] Glaasker E., Tjan F.S., Ter Steeg P.F., Konings W.N., Poolman B.: Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. J. Bacteriol., 1998; 180: 4718–4723
- [17] Goh F., Barrow K.D., Burns B.P., Neilan B.A.: Identification and regulation of novel compatible solutes from hypersaline stromatolite-associated cyanobacteria. Arch. Microbiol., 2010; 192: 1031–1038
- [18] Graf R., Anzali S., Buenger J., Pfluecker F., Driller H.: The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. Clin. Dermatol., 2008; 26: 326–333
- [19] Groysman N., Orynbayeva Z., Katz M., Kolusheva S., Khanin M., Danilenko M., Jelinek R.: Membrane processes and biophysical characterization of living cells decorated with chromatic polydiacetylene vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 2008; 1778: 1335–1343
- [20] Hagemann M.: Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. FEMS Microbiol. Rev., 2011; 35: 87–123
- [21] Harold F.M.: Bacterial morphogenesis: learning how cells make cells. Curr. Opin. Microbiol., 2007; 10: 591–595
- [22] Heermann R., Jung K.: Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms. Curr. Opin. Microbiol., 2004; 7: 168–174
- [23] Heubusch P., Jung C.Y., Green F.A.: The osmotic response of human erythrocytes and the membrane cytoskeleton. J. Cell Physiol., 1985; 122: 266–272
- [24] Hohmann I., Bill R.M., Kayingo I., Prior B.A.: Microbial MIP channels. Trends Microbiol., 2000; 8: 33–38
- [25] Janáček K., Sigler K.: Osmosis: membranes impermeable and permeable for solutes, mechanism of osmosis across porous membranes. Physiol. Res., 2000; 49: 191–195
- [26] Kempf B., Bremer E.: Stress response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: uptake and synthesis of osmoprotectants. J. Biosci., 1998; 23: 447–455
- [27] Kempf B., Bremer E.: Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch. Microbiol., 1998; 170: 319–330
- [28] Khmelena V.N., Sakharovskii V.G., Reshetnikov A.S., Trotsenko I.A.: Synthesis of osmoprotectors by halophilic and alkaliphilic methanotrophs. Mikrobiologija, 2000; 69: 465–470
- [29] Kiema R.P.: Uptake of choline and its conversion to glycine betaine by bacteria in estuarine waters. Appl. Environ. Microbiol., 1998; 64: 1045–1051
- [30] Krämer R.: Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. Chem. Rec., 2010; 10: 217–229
- [31] Krzyżmiński K., Sieradzan A.: Wyznaczenie masy molowej makromolekuł metodą osmometryczną. www.chem.ug.edu.pl/kchfz/assets/.../OSMOZainstrukcja02-2011.doc (09.11.2011)
- [32] Kung C., Martinac B., Sukharev S.: Mechanosensitive channels in microbes. Annu. Rev. Microbiol., 2010; 64: 313–329
- [33] Kwon Y.D., Kim S., Lee S.Y., Kim P.: Long-term continuous adaptation of *Escherichia coli* to high succinate stress and transcriptome analysis of the tolerant strain. J. Biosci. Bioeng., 2011; 111: 26–30
- [34] Margesin R., Schinner F.: Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles, 2001; 5: 73–83
- [35] Martinac B., Kloda A.: Evolutionary origins of mechanosensitive ion channels. Prog. Biophys. Mol. Biol., 2003; 82: 11–24
- [36] McMahon M.A., Xu J., Moore J.E., Blair I.S., McDowell D.A.: Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. Appl. Environ. Microbiol., 2007; 73: 211–217
- [37] Mille Y., Beney L., Gervais P.: Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. Biochim. Biophys. Acta, 2002; 1567: 41–48
- [38] Morbach S., Krämer R.: Structure and function of the betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*: strategies to sense osmotic and chill stress. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2005; 10: 143–153
- [39] Müller V., Spanheimer R., Santos H.: Stress response by solute accumulation in Archaea. Curr. Opin. Microbiol., 2005; 8: 729–736
- [40] Nitta S., Ohnuki T., Ohkuda K., Nakada T., Staub N.C., Tohoku J.: The corrected protein equation to estimate plasma Colloidi osmotic pressure and its development on a nomogram. Tohoku J. Exp. Med., 1981; 135: 43–49
- [41] Oren A.: Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Systems, 2008; 4: 2

- [42] Oren A.: Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.*, 2010; 31: 825–834
- [43] O'Toole M.T.: *Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health*, wyd. 7, Saunders 2003
- [44] Özcan N., Ejsing C.S., Shevchenko A., Lipski A., Morbach S., Krämer R.: Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 7485–7496
- [45] Pałacha Z.: Aktywność wody – ważny parametr żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2008; 62: 22–26
- [46] Park E.J., Jeknić Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., Chen T.H.: Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *Plant J.*, 2004; 40: 474–487
- [47] Pastor J.M., Salvador M., Argandoña M., Bernal V., Reina-Bueno M., Csonka L.N., Iborra J.L., Vargas C., Nieto J.J., Cánovas M.: Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol. Adv.*, 2010; 28: 782–801
- [48] Pflüger K., Müller V.: Transport of compatible solutes in extremophiles. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2004; 36: 17–24
- [49] Poolman B., Glaasker E.: Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.*, 1998; 29: 397–407
- [50] Powalowski S., Gulewicz P., Grajek W.: Wpływ ciśnienia osmotycznego na stan fizjologiczny komórek bakteryjnych. *Postępy Biol. Kom.*, 2002; 29: 435–448
- [51] Purvis J.E., Yomano L.P., Ingram L.O.: Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 3761–3769
- [52] Roberts M.F.: Osmoadaptation and osmoregulation in Archaea: update 2004. *Frontiers in Bioscience* 9, 1999–2019, September 1, 2004. <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1366/fulltext.asp?bframe=tables.htm&doi=yes> (09.11.2011)
- [53] Romantsov T., Guan Z., Wood J.M.: Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1788: 2092–2100
- [54] Rontein D., Basset G., Hanson A.D.: Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.*, 2002; 4: 49–56
- [55] Ruffert S., Lambert C., Peter H., Wendisch V.F., Krämer R.: Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur. J. Biochem.*, 1997; 247: 572–580
- [56] Sawangwan T., Goeld C., Nidetzky B.: Glucosylglycerol and glucosylglycerate as enzyme stabilizers. *Biotechnol. J.*, 2010; 5: 187–191
- [57] Schwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Rampp M., Schuster S.C., Klenk H.P., Pfeiffer F., Oesterhelt D., Kunte H.J.: A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environ. Microbiol.*, 2011; 13: 1973–1994
- [58] Shabala L.: Organic vs inorganic: What makes the major contribution to osmotic adjustment in bacteria? *Commun. Integr. Biol.*, 2009; 2: 74–75
- [59] Shabala L., Bowman J., Brown J., Ross T., McMeekin T., Shabala S.: Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotic. *Environ. Microbiol.*, 2009; 11: 137–148
- [60] Sleator R.D., Hill C.: Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2002; 26: 49–71
- [61] Strange K.: Cellular volume homeostasis. *Adv. Physiol. Educ.*, 2004; 28: 155–159
- [62] Ueland P.M.: Choline and betaine in health and disease. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2011; 34: 3–15
- [63] Vargas C., Argandoña M., Reina-Bueno M., Rodríguez-Moya J., Fernández-Aunión C., Nieto J.J.: Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems*, 2008; 4: 14
- [64] Voet D., Voet J.G., Pratt C.W.: *Fundamentals of Biochemistry*. New York: Wiley, 2001
- [65] Wood J.M.: Bacterial osmosensing transporters. *Methods Enzymol.*, 2007; 428: 77–107
- [66] Yeagle L.P.: Cell membrane features, 2009. <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001261.html> (09.11.2011)

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

