



© Н.С. Карамова,
П.В. Зеленихин, В.Д. Киселев,
А.А. Липатникова,
О.Н. Ильинская

ФГАОУ ВО «Казанский (При-
волжский) федеральный универ-
ситет», Казань

В настоящей работе было исследо-
вано влияние высокого гидростати-
ческого давления (ВГД) на вы-
живаемость и уровень мутагенеза
Salmonella typhimurium. Устано-
влено, что значительное снижение
выживаемости бактерий происхо-
дит при воздействии ВГД 200 МПа
и выше. При этом показатель жиз-
неспособности бактерий по числу
колониобразующих единиц (КОЕ)
был до шести порядков ниже
такового по данным цитофлуо-
риметрического анализа. Вероят-
но, этот факт связан с переходом
части популяции бактерий в не-
культивируемое, но жизнеспособ-
ное состояние (НС). ВГД 50 МПа
вызывало увеличение числа коло-
ний His⁺-ревертантов в 1,9 раза
у штамма *S. typhimurium* TA98,
что свидетельствует о возможности
индукции генных мутаций в данных
условиях. Обсуждаются механизмы
снижения жизнеспособности и ге-
нетических изменений в клетках
бактерий в условиях ВГД.

✿ **Ключевые слова:** высокое
гидростатическое давление;
жизнеспособность; некультивируемое
состояние; мутагенез; мутации;
Salmonella typhimurium; проточная
цитометрия; тест Эймса.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОГО ГИДРОСТАТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И УРОВЕНЬ МУТАГЕНЕЗА *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы являются самыми древними обитателями Земли, ко-
торые в процессе длительной эволюции адаптировались к жизни на раз-
личных субстратах в постоянно изменяющихся условиях внешней среды
(Wächtershäuser, 2006; Zeng et al., 2009). Основными физико-химическими
факторами, оказывающими определяющее влияние на жизнь микроorganiz-
мов, являются pH, температура, гидростатическое давление, электромагнит-
ные излучения.

Гидростатическое давление — один из ключевых физических параметров
биосферы, величина которого может варьировать от 0,1 МПа на уровне моря
(атмосферное давление) до 110 МПа в бездне Челленджера — самой глу-
бинной точке океана, расположенной на 11 км ниже уровня моря в Мариан-
ской впадине (Aertsen et al., 2009; Mota et al., 2013).

Многие микроорганизмы хорошо растут и размножаются в условиях
обычного атмосферного давления, прекращая рост при воздействии гид-
ростатического давления выше 50 МПа (Mota et al., 2013). В то же время
для микроорганизмов-пьезофилов, обитающих в глубинной биосфере (глу-
бины Мирового океана, подводные гидротермальные источники, нефтяные
скважины), оптимальным для роста является гидростатическое давление
40–60 МПа (Jannasch, Taylor, 1984; Meersman, McMillan, 2014; Oger,
Jebbar, 2010). Активный рост облигатных пьезофилов, например *Moritella*
yayanosii, происходит при давлении 80 МПа.

Начиная с 1990-х г. ВГД в пределах 200–800 МПа используется для
консервирования пищевых продуктов. Считается, что такой способ обра-
ботки позволяет не только уничтожать патогенные микроорганизмы, но и,
в отличие от температурной обработки, лучше сохранять вкусовые и пита-
тельные свойства продуктов (High-pressure microbiology, 2008; Aertsen et al.,
2009). Вместе с тем показано, что разные виды микроорганизмов и даже раз-
ные штаммы одного вида могут отличаться по чувствительности к действию
ВГД (Alpas et al., 1999). Более того, в нескольких работах были представле-
ны данные о выделении пьезорезистентных мутантов мезофильных бактерий:
Escherichia coli (Hauben et al., 1997; Gao et al., 2001) и *Listeria monocytogenes*
(Karatzas and Bennik, 2002), сохраняющих жизнеспособность при летальных
для мезофильных микроорганизмов значениях давления (до 800 МПа). Со-
гласно данным Ванлинта с соавторами (Vanlint et al., 2011), выделенные ими
пьезорезистентные мутанты *Escherichia coli* сохраняют жизнеспособность
даже при давлении 1,2–2 ГПа. В работе Хаубен с соавторами (Hauben et
al., 1997) баротолерантные штаммы *E. coli* были изолированы после много-
кратного воздействия ВГД. Согласно мнению авторов, пьезорезистентные
клетки *E. coli* не присутствовали изначально в популяции данных бактерий,
а высокий уровень баротолерантности у выделенных штаммов является ре-
зультатом накопления множественных мутаций (Hauben et al., 1997). В не-
которых случаях пьезорезистентные штаммы мезофильных микроорганизмов

Поступила в редакцию 15.04.2015
Принята к публикации 07.12.2015

проявляют новые уникальные свойства, связанные с изменением метаболизма, что открывает возможности их использования в различных процессах, связанных с применением высокого давления, а также для микробного биосинтеза новых продуктов, в том числе для нужд фармакологии и биомедицины (Aertsen et al., 2009; Mota et al., 2013).

Вместе с тем следует подчеркнуть, что до настоящего времени остаются малоизученными генетические изменения, происходящие в клетках при действии ВГД. Детальное исследование возможных генетических эффектов и генетического контроля адаптивных реакций в условиях ВГД актуально не только в связи с перспективностью применения ВГД в производстве (для консервирования пищевых продуктов и в микробной биотехнологии), но и для понимания последствий такого воздействия на биологические системы в целом и механизмов адаптации, обеспечивающих выживание и рост в экстремальных условиях.

Целью настоящей работы явилась оценка влияния высокого гидростатического давления на жизнеспособность бактерий *Salmonella typhimurium* и возможности индукции генных мутаций в клетках бактерий в условиях ВГД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе использованы штаммы *S. typhimurium* TA100 и TA98, полученные из коллекции микроорганизмов кафедры генетики МГУ. Генотипы штаммов представлены в таблице 1.

18-часовую культуру каждого бактериального штамма в среде LB разбавляли свежим бульоном LB и подращивали 2,5 ч при 37 °С до достижения экспоненциальной фазы роста ($1-2 \times 10^9$ кл/мл). Клетки осаждали центрифугированием. Осадок дважды отмывали и ресуспендировали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0). Суспензию клеток переливали в стерильные тefлоновые цилиндры и подвергали действию ВГД.

Обработка бактерий ВГД

Эксперименты проводили при комнатной температуре (23–24 °С). Суспензию микроорганизмов в тefлоновом цилиндре (диаметр 14 мм, высота 20 мм) закрывали тefлоновой крышкой и помещали в стальной цилиндр (внешний диаметр 80 мм, внутренний диаметр 14,14 мм).

Таблица 1

Генотипы тестерных штаммов *Salmonella typhimurium*

Штамм	Генотип
TA98	<i>hisD3052, rfa, AuvrB, bio-</i> , pKm 101
TA100	<i>hisG46, rfa, AuvrB, bio-</i> , pKm 101

Высокое давление создавали методом мультипликации 50:1 в баростате, используя метод «пiston-цилиндр» при диаметре большого цилиндра 100 мм, малого пистона — 14,14 мм (High-pressure techniques in chemistry and physics, 1997). Усиление давления определяется отношением площадей этих цилиндров: $P(\text{низ}) \times (100 \times 100) / (14,14 \times 14,14) = 50 \times P(\text{низ})$. Низкое давление в первом цилиндре создавали гидравлическим насосом плунжерного типа (до 20 МПа). Высокое давление в тefлоновом цилиндре рассчитывали из соотношения: $P(\text{выс}) = P(\text{низ}) \times 50$. То есть для 800 МПа создавали давление в первой камере, равное 16 МПа. После выбранного интервала времени эксперимента, давление сбрасывали и тefлоновый цилиндр извлекали из баростата. Суспензию клеток бактерий подвергали действию ВГД 50, 100, 200, 300, 500, 800 МПа в течение 15 минут.

Оценка жизнеспособности бактерий по числу КОЕ

Суспензию клеток *S. typhimurium* TA100 соответствующего разведения (100 мкл) после воздействия высокого гидростатического давления высевали на поверхность чашек Петри с LB-агаром, чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. В контрольном варианте высевали суспензию бактерий, не подвергавшихся действию высокого давления. После 24 ч инкубации подсчитывали число колоний бактерий (колониеобразующих единиц — КОЕ), выросших в чашках Петри с LB-агаром. Жизнеспособность бактерий оценивали по критерию «выживаемость»:

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{\text{Число КОЕ после воздействия давления}}{\text{Число КОЕ в контроле}} \cdot 100.$$

Цитофлуориметрический анализ жизнеспособности бактерий

Долю жизнеспособных клеток в популяции микроорганизмов непосредственно после воздействия высокого давления и в контрольном варианте (суспензия клеток, не подвергавшихся воздействию ВГД) определяли с помощью окраски флуоресцентным красителем йодидом пропидия (PI). PI не способен проникать в клетку, если цитоплазматическая мембрана сохраняет свою целостность. У мертвых клеток из-за нарушения целостности мембраны PI проникает в цитозоль и связывается с ДНК. В результате интенсивность флуоресценции возрастает в 20–30 раз. Эта особенность позволяет с помощью PI цитометрически различать живые и мертвые клетки микроорганизмов.

К суспензии клеток микроорганизмов добавляли PI в конечной концентрации 10 мкг/мл, выдерживали в темноте при 37 °С 2 мин. Далее осуществляли анализ проницаемости мембран клеток на проточном цитофлу-

ориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Оценку количества живых и мертвых клеток в образцах проводили по гистограмме (флуоресценция PI против числа событий).

Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса)

Для оценки влияния ВГД на уровень мутагенеза бактерий использовали тестерные штаммы *S. typhimurium* TA100 и TA98. Эксперименты проводили согласно методу Эймса (Mortelmans, Zeiger, 2000) в варианте без метаболической активации S9 фракцией печени животных. Тестерные штаммы являются ауксотрофами по гистидину за счет точечной мутации в гистидиновом опероне. При действии мутагенных факторов тестерные штаммы ревертируют к прототрофности путем замены пар оснований (штамм TA100) или сдвига рамки считывания (штамм TA98). Суспензии тестерных бактерий (2×10^9 кл/мл) подвергали действию разных доз ВГД. Негативный контроль представлял собой суспензию тестерных бактерий, не подвергавшихся действию высокого давления. В качестве положительного контроля в экспериментах использовали известные мутагены: азид натрия (2 мкг/чашку) для тестерного штамма TA100 и 2-нитрофлуорен (2 мкг/чашку) для штамма TA98.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета программ приложения Microsoft Excel 2003. Рассчитывали среднее арифметическое группы данных и стандартное отклонение. Анализ соответствия нормальности распределения группы данных проводили при помощи критерия Шапиро–Уилка.

Расчет достоверности различий между группами данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Анализ цитометрических данных приведен для 100 000 событий. Приведенные в работе данные об оценке КОЕ и мутагенности представляют собой среднее арифметическое значение трех независимых экспериментов (три повторности на каждый образец в эксперименте) $\pm \sigma$ (среднеквадратичное отклонение). Различие между группами данных считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ВГД на жизнеспособность *S. typhimurium* TA100

Результаты оценки жизнеспособности клеток *S. typhimurium* TA100 по числу КОЕ представлены в таблице 2. Процент выживаемости клеток уменьшался обратно пропорционально возрастанию давления. При воздействии давления 50 МПа, 100 МПа значительного угнетения способности бактерий к колониеобразованию не наблюдали (выживаемость составила 92 и 89 % соответственно). Начиная с давления 200 МПа число КОЕ заметно снижалось. После воздействия на бактерии давления 800 МПа в течение 15 мин на питательной среде не обнаружено ни одной колонии. Таким образом, такое давление полностью подавляло способность бактерий к образованию колоний.

Оценка жизнеспособности *S. typhimurium* TA100 методом проточной цитометрии также свидетельствует об угнетающем действии повышенного давления на жизнедеятельность данных бактерий (рис. 1).

Известно, что в соответствии с принципом Ле-Шателье повышение давления приводит к уменьшению объема биологической системы, что в свою очередь вы-

Таблица 2

Выживаемость клеток *Salmonella typhimurium* TA100 при действии высокого гидростатического давления (ВГД)

Образцы	Число КОЕ/чашка [#]	Выживаемость, %
Контроль	$(110,4 \pm 9,2) \times 10^7$	92,0
ВГД, 50 МПа	$(101,3 \pm 8,7) \times 10^7^*$	
Контроль	$(72,0 \pm 6,4) \times 10^7$	89,0
ВГД, 100 МПа	$(64,0 \pm 2,3) \times 10^7^*$	
Контроль	$(382,3 \pm 32,6) \times 10^7$	3,5
ВГД, 200 МПа	$(132,3 \pm 2,3) \times 10^6^*$	
Контроль	$(168,7 \pm 11,8) \times 10^7$	$6,5 \times 10^{-6}$
ВГД, 300 МПа	$110,3 \pm 9,7^*$	
Контроль	$(490,3 \pm 39,6) \times 10^7$	$0,3 \times 10^{-6}$
ВГД, 500 МПа	$13,7 \pm 0,9^*$	
Контроль	$(220,7 \pm 19,7) \times 10^7$	0
ВГД, 800 МПа	0	

[#] — данные представляют собой среднее арифметическое значение трех независимых экспериментов (три повторности на каждый образец в эксперименте) $\pm \sigma$ (среднеквадратичное отклонение); * — статистически достоверно отличается от контроля, $p \leq 0,05$, t-критерий Стьюдента

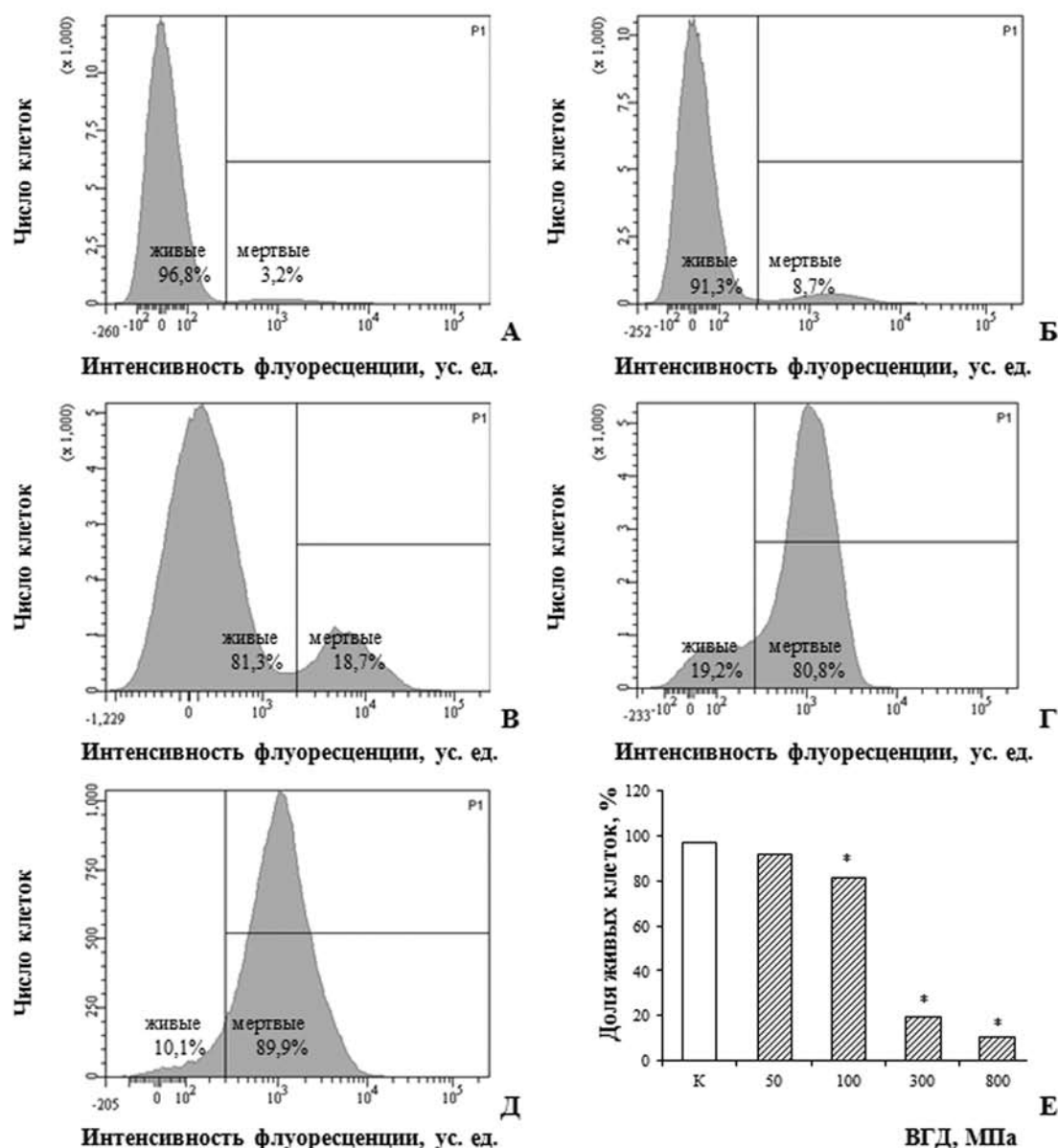


Рис. 1. Влияние высокого гидростатического давления (ВГД) на жизнеспособность клеток *Salmonella typhimurium* TA100 (данные проточной цитометрии). А — контроль (клетки, не подвергавшиеся действию ВГД); Б — 50 МПа; В — 100 МПа; Г — 300 МПа; Д — 800 МПа; Е — суммарное представление жизнеспособности бактерий, доля живых клеток в популяции, %; К — контроль; * — статистически достоверно отличается от контроля, $p \leq 0,05$

зывает различные структурные изменения биомолекул и нарушение равновесия химических реакций (Meersman, McMillan, 2014; Oger, Jebbar, 2010).

Согласно данным, представленным в литературе, высокое давление в первую очередь влияет на целостность и функционирование мембран и является ингибитором ключевых ферментов клетки. Воздействие давления около 200 МПа вызывает негативные изменения в биологических мембранах и, как следствие, резкое снижение жизнеспособности большинства микроорганизмов (High-pressure microbiology, 2008; Meersman, McMillan, 2014). Результаты, полученные в настоящей работе для

S. typhimurium TA100, подтверждают факт значительного снижения выживаемости клеток при действии ВГД 200 МПа и выше, ранее обнаруженный для других видов бактерий (табл. 2, рис. 1).

Некоторые эффекты давления на биомолекулы и биологические системы, изученные в условиях *in vitro*, могут быть объяснены на основе термодинамических принципов денатурации белков и фазовых переходов в мембранах (High-pressure microbiology, 2008). При повышении давления липидный бислой мембран теряет текучесть, становится непроницаемым для жизненно необходимых молекул воды и ряда других

веществ. Для выживания в таких условиях в клеточных мембранах увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот (Oger, Jebbar, 2010). Показано, что после воздействия давления в 200 МПа в течение 30 мин у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* наблюдается повышение содержания ненасыщенных жирных кислот за счет усиленной экспрессии гена *ole1* (Fernandes et al., 2004). У облигатно пьезофильных штаммов *Shewanella* sp. DB21MT-2 и *Moritella* sp. DB21MT-5, выделенных из бездны Челленджера, липиды мембран примерно на 70 % состояли из ненасыщенных жирных кислот (Kato et al., 1998; Nogi et al., 1998). ВГД вызывает нарушение белок-липидных взаимодействий, необходимых для целостности биологических мембран и их нормального функционирования (Winter, Jeworrek, 2009). К числу важнейших причин гибели клеток при повышении давления относятся нарушение структуры и функций белков, а также диссоциация рибосом. Стабилизация молекулы ДНК в условиях высокого давления значительно усложняет структурные перестройки молекулы, необходимые для протекания жизненно важных процессов репликации, транскрипции и трансляции (High-pressure microbiology, 2008). Окислительный стресс, индуцируемый высоким давлением в бактериях, также рассматривается как одна из возможных причин снижения их жизнеспособности в данных условиях (Aertsen et al., 2005).

Сравнительный анализ результатов, полученных в нашей работе с использованием двух методов, показывает, что согласно данным цитофлуориметрического анализа процент жизнеспособных клеток, сохранившихся в популяции тестерных бактерий в условиях ВГД, гораздо выше, чем при оценке способности бактерий к образованию колоний. Так, после воздействия ВГД 300 МПа выживаемость клеток *S. typhimurium* TA100, рассчитанная по числу КОЕ, составляет миллионные доли процента, в то время как по данным цитофлуориметрического анализа в популяции живыми регистрируются 19,2 % клеток (табл. 2, рис. 1).

Данный факт можно объяснить тем, что при повышении давления большая часть клеток популяции переходит в некультивируемое состояние (НС), сохраняя при этом жизнеспособность. Бактериальные клетки, находящиеся в таком состоянии, проявляют метаболическую активность, но не способны подвергаться непрерывному делению, необходимому для определения роста в питательной среде (Юдин, 2007; Colwell, 2000). Индукторами НС бактерий могут быть различные стрессовые факторы окружающей среды: недостаток питательных веществ, температурные изменения, недостаток влаги, излучения и др. (Голод и др., 2009; Кряжевских и др., 2012). Возможность перехода в НС при действии ВГД было показано для *Listeria monocytogenes* (Ritz et al., 2001).

Оценка возможности индукции генных мутаций у бактерий при воздействии ВГД

Несомненный интерес для понимания механизмов адаптации к жизни в условиях высокого давления у пьезофилов, а также у обнаруженных в ряде исследований пьезотолерантных штаммов некоторых мезофильных микроорганизмов (Hauben et al., 1997; Karatzas, Bennik, 2002; Vanlint et al., 2011) представляет изучение генетических изменений, индуцируемых при воздействии ВГД. На сегодняшний день имеется лишь незначительное число исследований в данной области (Aertsen et al., 2004; Gross, 1965; Rosin, Zimmerman, 1977).

В настоящей работе была исследована возможность индукции генных мутаций у *S. typhimurium* в условиях ВГД. Так как согласно полученным нами результатам ВГД выше 200 МПа оказывает негативное влияние на бактерии, вызывая как их гибель, так и потерю способности к колониеобразованию, в тесте Эймса мы использовали только три дозы ВГД: 50 МПа, 100 МПа и 200 МПа. Как видно из результатов, представленных в таблице 3, после воздействия давления от 50 до 200 МПа в течение 15 мин не наблюдалось существенного увеличения числа колоний ревертантов штамма *S. typhimurium* TA100. В то же время ВГД 50 МПа

Таблица 3

Мутагенный эффект высокого гидростатического давления (ВГД) на штамме *Salmonella typhimurium* TA100

Варианты	Количество His ⁺ -ревертантов/чашку [#]
Контроль	103,6 ± 9,7
ВГД, 50 МПа	115,3 ± 10,2*
Контроль	83,6 ± 9,3
ВГД, 100 МПа	79,3 ± 8,1
Контроль	97,0 ± 9,2
ВГД, 200 МПа	91,6 ± 8,7
Контроль	95,4 ± 10,2
Азид натрия (2 мкг/чашку)	782,3 ± 63,4*

[#] — данные представляют собой среднее арифметическое значение трех независимых экспериментов (три повторности на каждый образец в эксперименте) ± σ (среднеквадратичное отклонение); * — статистически достоверно отличается от контроля, p ≤ 0,05, t-критерий Стьюдента

Таблица 4

Мутагенный эффект высокого гидростатического давления (ВГД) на штамме *Salmonella typhimurium* TA98

Варианты	Количество His ⁺ -ревертантов/чашку [#]
Контроль	33,7 ± 5,8
ВГД, 50 МПа	62,3 ± 9,2*
Контроль	42,6 ± 7,8
ВГД, 100 МПа	50,7 ± 9,2
Контроль	57,0 ± 8,8
ВГД, 200 МПа	56,4 ± 6,3
Контроль	64,3 ± 5,8
2-нитрофлуорен (2 мкг/чашку)	597,7 ± 42,4*

[#] — данные представляют собой среднее арифметическое значение трех независимых экспериментов (три повторности на каждый образец в эксперименте) ± σ (среднеквадратичное отклонение); * — статистически достоверно отличается от контроля, p ≤ 0,05, t-критерий Стьюдента

Таблица 5

Зависимость количества спонтанных ревертантов штаммов *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100 от плотности инокулята в тесте Эймса

Плотность инокулята, кл/мл	Количество His ⁺ -ревертантов/чашку*	
	TA98	TA100
1 – 2 × 10 ⁹	57,3 ± 8,2	112,4 ± 10,6
1 – 2 × 10 ⁸	54,6 ± 9,4	104,6 ± 14,2
1 – 2 × 10 ⁷	50,8 ± 6,8	98,7 ± 12,3
1 – 2 × 10 ⁶	12,2 ± 1,9	18,7 ± 0,8
1 – 2 × 10 ⁵	1,5 ± 0,07	2,8 ± 0,2

* — данные представляют собой среднее арифметическое значение трех независимых экспериментов (три повторности на каждый образец в эксперименте) ± σ (среднеквадратичное отклонение)

вызывало повышение числа колоний His⁺-ревертантов у штамма TA98 в 1,9 раза (табл. 4), что свидетельствует о возможности индукции генных мутаций в клетках бактерий при повышении давления. При дальнейшем увеличении давления также происходил рост His⁺-ревертантов, при этом их количество было сопоставимо со спонтанным фоном мутирования. Следует отметить, что даже при действии ВГД 200 МПа, снижающем выживаемость тестерных бактерий до 3,5 % (по числу КОЕ), мы не наблюдали уменьшения количества His⁺-ревертантов ниже спонтанного фона мутирования для обоих тестерных штаммов. По всей вероятности, количество ревертантов *S. typhimurium* не уменьшается прямо пропорционально снижению выживаемости бактерий. Данное предположение подтверждается результатами, представленными в таблице 5. При оценке зависимости уровня спонтанного мутагенеза от плотности высеваемой культуры тестерных штаммов *S. typhimurium* было установлено, что количество спонтанных ревертантов у штаммов TA98 и TA100 остается практически постоянным при разведении исходной суспензии бактерий плотностью 1 – 2 × 10⁹ кл/мл до 1 – 2 × 10⁷ кл/мл. Подобные результаты для штамма *S. typhimurium* TA98 ранее были получены Жук (Жук, 2010).

Вопрос о возможности индукции повреждений ДНК и мутаций при повышении давления остается малоизученным. В работе Росина и Зиммермана было обнаружено повышение частоты цитоплазматических мутантов у *S. cerevisiae* в условиях ВГД (Rosin, Zimmerman, 1977). Возникновение большого числа мутантов *Euglena gracilis* с измененными каротиноидами и лишенных хлорофилла при действии давления от 500 до 1000 атмосфер показано Гросс (Gross, 1965).

Аэрстен с соавт. (Aertsen et al., 2004) сообщили об индукции высоким давлением SOS ответа в клетках *E. coli*. SOS-ответ, как правило, индуцируется в клетках бактерий при действии ДНК-повреждающих факторов. Однако авторы вышеназванной работы предполагают, что высокое давление первоначально вызывает денатурацию ферментных белков репликативного комплекса. Сигналом для индукции SOS-ответа является одноцепочечная ДНК, образующаяся из-за нарушения процесса репликации ДНК. Из всех функций, объединяемых в SOS-ответ клетки, особого внимания заслуживает SOS-мутагенез — результат «ошибочной» SOS-репарации ДНК. Повышенный уровень мутагенеза и рекомбинации ДНК, как и все другие SOS-функции, направлен на повышение генетической изменчивости в популяции как шанс

адаптации и выживания в стрессовых условиях (Radman, 2001). Таким образом, SOS-мутagenез можно рассматривать как один из возможных путей индукции адаптивных мутаций у микроорганизмов в условиях ВГД.

Дальнейшие исследования, направленные на изучение клеточной пьезофизиологии и генетических механизмов регуляции адаптации к жизни в условиях высокого давления, откроют новые перспективы биоинженерии пьезотолерантных микроорганизмов для применения в биотехнологии, а также внесут вклад в направления медико-биологических исследований, связанных с изучением состояний повышенного давления.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голод Н. А., Лойко Н. Г., Мулюкин А. Л. и др. (2009) Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям. Микробиология. Т. 78 (3): С. 317–335.
2. Жук А. С. (2010) Экспериментальная модель оценки последствий воздействия стрессорных факторов окружающей среды: Магистерская диссертация. Санкт-Петербург.
3. Кряжевских Н. А., Демкина Е. В., Манучарова Н. А. и др. (2012) Реактивация покоящихся и некультивируемых форм бактерий из древних почв и мерзлых подпочвенных отложений. Микробиология. Т. 81 (4): С. 474–485.
4. Юдин И. П. (2007) Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности. Annals of Mechnikov Institute. № 3: С. 8–16.
5. Aertsen A., De Spiegeleer P., Vanoirbeek K. et al. (2005) Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. V. 71 (5): P. 2226–2231.
6. Aertsen A., Houdt R., Vanoirbeek K., et al. (2004) An SOS Response Induced by High Pressure in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. V. 186 (18): P. 6133–6141.
7. Aertsen A., Meersman F., Hendrickx M. E. et al. (2009) Biotechnology under high pressure: applications and implications. Trends in Biotechnology. V. 27 (7): P. 434–441.
8. Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F. et al. (1999) Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens. Appl. Environ. Microbiol. V. 65: P. 4248–4251.
9. Colwell R. R. (2000) Bacterial death revisited. In: Grimes D. J. editor. Nonculturable microorganisms in the environment. Washington, D. C.: ASM Press; p. 325–342.
10. Fernandes P. M., Domitrovic T., Kao C. M. et al. (2004) Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. FEBS Lett. V. 556 (1–3): P. 153–160.
11. Gao X., Li J., and Ruan K. C. (2001) Barotolerant *Escherichia coli* induced by high hydrostatic pressure. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). V. 33: P. 77–81.
12. Gross J. A. (1965) Pressure-induced color mutation of *Euglena gracilis*. Science. V. 147 (3659): P. 741–742.
13. Hauben K. J., Bartlett D. H., Soontjens C. C. et al. (1997) *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. V. 63 (3): P. 945–950.
14. High-pressure microbiology (2008) Editors Michiels Ch., Bartlett D. H., Aertsen A. Washington: ASM Press.
15. High-pressure techniques in chemistry and physics. A practical approach (1997) Editors Holzapfel W. B., Isaacs N. S. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.
16. Jannasch H. W., Taylor C. D. (1984) Deep-sea microbiology. Annu. Rev. Microbiol. V. 38: P. 487–514.
17. Karatzas K. A., Bennik M. H. (2002) Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. V. 68: P. 3183–3189.
18. Kato C., Li L., Nogi Y. et al. (1998) Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. Appl. Environ. Microbiol. V. 64 (4): P. 1510–1513.
19. Meersman F., McMillan P. F. (2014) High hydrostatic pressure: a probing tool and a necessary parameter in biophysical chemistry. Chem. Commun. V. 50: P. 766–775.
20. Mortelmans K., Zeiger E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutat. Res. V. 455 (1–2): P. 29–60.
21. Mota M. J., Lopes R. L., Delgadillo I. et al. (2013) Microorganisms under high pressure — Adaptation, growth and biotechnological potential. Biotechnol. Adv. V. 31 (8): P. 1426–1434.
22. Nogi Y., Kato C., Horikoshi K. (1998) Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. Arch. Microbiol. V. 170 (5): P. 331–338.
23. Oger Ph. J., Jebbar M. (2010) The many ways of coping with pressure. Res. Microbiol. V. 161 (10): P. 799–809.
24. Radman M. (2001) Fidelity and infidelity. Nature. V. 413 (15): P. 413–415.
25. Ritz M., Tholozan J. L., Fedeeighi M. et al. (2001) Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. V. 67 (5): P. 2240–2247.
26. Rosin M. P., Zimmerman A. M. (1977) The induction of cytoplasmic petite mutants of *Saccharomyces*

- cerevisiae* by hydrostatic pressure. J. Cell Sci. V. 26: P. 373–385.
27. Vanlint D., Mitchell R., Bailey E. et al. (2011) Rapid acquisition of gigapascal-high-pressure resistance by *Escherichia coli*. mBio. V. 2 (1): P. 00130–10.
 28. Wächtershäuser G. (2006) From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. Phil. Tran. R. Soc. B. V. 361: P. 1787–1808.
 29. Winter R., Jeworrek C. (2009) Effect of pressure on membranes. Soft Matter. V. 5 (17): P. 3157–73.
 30. Zeng X., Birrien J. L., Fouquet Y. et al. (2009) *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. The ISME journal. V. 3 (7): P. 873–876.
 2. Aertsen A., Houdt R., Vanoirbeek K. et al. (2004) An SOS Response Induced by High Pressure in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. V. 186 (18): P. 6133–6141.
 3. Aertsen A., Meersman F., Hendrickx M. E. et al. (2009) Biotechnology under high pressure: applications and implications. Trends in Biotechnology. V. 27 (7): P. 434–441.
 4. Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F. et al. (1999) Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens. Appl. Environ. Microbiol. V. 65: P. 4248–4251.
 5. Colwell R. R. (2000) Bacterial death revisited. In: Grimes D. J. editor. Nonculturable microorganisms in the environment. Washington, D. C.: ASM Press; p. 325–342.
 6. Fernandes P. M., Domitrovic T., Kao C. M. et al. (2004) Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. FEBS Lett. V. 556 (1–3): P. 153–160.
 7. Gao X., Li J., and Ruan K. C. (2001) Barotolerant *Escherichia coli* induced by high hydrostatic pressure. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). V. 33: P. 77–81.
 8. Golod N. A., Loyko N. G., Mulyukin A. L. et al. (2009) Adaptatsiya molochnokisllykh bakterii k neblagopriyatnym dlya rosta usloviyam [Adaptation of lactic acid bacteria to the adverse growth conditions]. Microbiology. V. 78 (3): P. 317–335.
 9. Gross J. A. (1965) Pressure-induced color mutation of *Euglena gracilis*. Science. V. 147 (3659): P. 741–742.
 10. Hauben K. J., Bartlett D. H., Soontjens C. C. et al. (1997) *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. V. 63 (3): P. 945–950.
 11. High-pressure microbiology (2008) Editors Michiels Ch., Bartlett D. H., Aertsen A. Washington: ASM Press.
 12. High-pressure techniques in chemistry and physics. A practical approach (1997) Editors Holzapfel W. B., Isaacs N. S. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.
 13. Jannasch H. W., Taylor C. D. (1984) Deep-sea microbiology. Annu. Rev. Microbiol. V. 38: P. 487–514.
 14. Karatzas K. A., Bennik M. H. (2002) Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. Appl. Environ. Microbiol. V. 68: P. 3183–3189.
 15. Kato C., Li L., Nogi Y. et al. (1998) Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. Appl. Environ. Microbiol. V. 64 (4): P. 1510–1513.
 16. Kryazhevskiy N. A., Demkina E. V., Manucharova N. A. et al. (2012) Reaktivatsiya pokoyaschihsya i nekul'tiviruemykh form bakterii iz drevnikh pochv i mierzlykh podpochvennykh otlozhenii [Reactivation of resting

HIGH HYDROSTATIC PRESSURE INFLUENCE ON VIABILITY AND MUTAGENESIS OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Karamova N. S., Zelenikhin P. V., Kiselev V. D., Lipatnikova A. A., Ilinskaya O. N.

✿ **SUMMARY:** Background: pressure is a well-known physical environmental parameter. Nevertheless, the basic principles of microbial survival under high hydrostatic pressure (HHP), especially genetic response to pressure, are still poorly understood. The purpose of this study was to investigate the influence of HHP ranging from 50 to 800 MPa on viability and mutagenesis of *Salmonella typhimurium*. Materials and methods. The standard plate count method (counting the total number of colony forming units (CFUs) on the plate) and the propidium iodide (PI) flow cytometric assay were used to determine the bacterial viability after HHP treatment. Ability of HHP to induce gene mutations was examined by the Ames assay employing *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98. Results. The results obtained showed that survival of *S. typhimurium* cells considerably decreased when bacteria were exposed to a pressure of 200 MPa and above. Herewith, the survival index calculated according to the total number of CFUs was up to six orders of magnitude lower than that obtained by the flow cytometric analysis under the same HHP. This fact can be explained by the entrance of the some part of bacterial population into the viable but nonculturable (VBNC) state. The pressure of 50 MPa was found to cause a 1.9-fold increase in the number of His⁺ revertants of *S. typhimurium* TA98 in Ames test. Conclusion. Our results demonstrate that HHP of 200 MPa and above significantly inhibits the viability of *S. typhimurium* cells as well as triggers the induction of VBNC state. The results of Ames test suggest that HHP of 50 MPa can induce gene mutations in bacterial cells. The possible mechanisms of HHP effects on cells viability as well as genetic response of bacteria under HHP are discussed.

✿ **KEYWORDS:** high hydrostatic pressure; *Salmonella typhimurium*; viability, viable but nonculturable state, mutagenesis, Ames assay.

REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Aertsen A., De Spiegeleer P., Vanoirbeek K. et al. (2005) Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. V. 71 (5): P. 2226–2231.

- and nonculturable forms of bacteria from ancient soils and frozen subsoil deposits]. *Microbiology*. V. 81 (4): P. 474–485.
17. Meersman F., McMillan P.F. (2014) High hydrostatic pressure: a probing tool and a necessary parameter in biophysical chemistry. *Chem. Commun.* V. 50: P. 766–775.
18. Mortelmans K., Zeiger E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* V. 455 (1–2): P. 29–60.
19. Mota M.J., Lopes R.L., Delgadillo I. et al. (2013) Microorganisms under high pressure — adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnol. Adv.* V. 31 (8): P. 1426–1434.
20. Nogi Y., Kato, C., Horikoshi K. (1998) Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch. Microbiol.* V. 170 (5): P. 331–338.
21. Oger Ph. J., Jebbar M. (2010) The many ways of coping with pressure. *Res. Microbiol.* V. 161 (10): P. 799–809.
22. Radman M. (2001) Fidelity and infidelity. *Nature*. V. 413 (15): P. 413–415.
23. Ritz M., Tholozan J. L., Fedeeighi M. et al. (2001) Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 67 (5): P. 2240–2247.
24. Rosin M. P., Zimmerman A. M. (1977) The induction of cytoplasmic petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by hydrostatic pressure. *J. Cell Sci.* V. 26: P. 373–385.
25. Vanlint D., Mitchell R., Bailey E. et al. (2011) Rapid acquisition of gigapascal-high-pressure resistance by *Escherichia coli*. *mBio*. V. 2 (1): P. 00130–10.
26. Wächtershäuser G. (2006) From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Phil. Tran. R. Soc. B.* V. 361: P. 1787–1808.
27. Winter R., Jeworrek C. (2009) Effect of pressure on membranes. *Soft Matter*. V. 5 (17): P. 3157–73.
28. Yudin I. P. (2007) Sovremennye podhody k ocenke zhiznesposobnosti bakterii s akcentom na fenomene nekulturablelosti [Modern approaches to bacteria viability assessment with an emphasis on phenomenon of viable but nonculturable state]. *Annals of Mechnikov Institute*. V. 3: P. 8–16.
29. Zeng X., Birrien J. L., Fouquet Y. et al. (2009) *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *The ISME journal*. V. 3 (7): P. 873–876.
30. Zhuk A. S. (2010) Eksperimentalnaya model ocenki posledstviy vozdeystviya stressornykh faktorov okruzhayushey sredy [Experimental model for evaluating effects of environmental stressors]: Master's dissertation. Saint Petersburg.

✳ Информация об авторах

Карамова Назира Сунагатовна — к. б. н., доцент. Кафедра микробиологии, институт фундаментальной медицины и биологии. ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18. E-mail: nskaramova@mail.ru.

Зеленихин Павел Валерьевич — к. б. н., доцент. Кафедра микробиологии, институт фундаментальной медицины и биологии. ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18. E-mail: pasha_mic@mail.ru.

Киселев Владимир Дмитриевич — д. х. н., профессор. Кафедра физической химии, химический институт им. А. М. Бутлерова. ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18. E-mail: vkiselev.ksu@gmail.com.

Липатникова Анастасия Александровна — студентка. Кафедра микробиологии, институт фундаментальной медицины и биологии. ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18. E-mail: stu92@mail.ru.

Ильинская Ольга Николаевна — д. б. н., заведующая кафедрой микробиологии, профессор. Кафедра микробиологии, институт фундаментальной медицины и биологии. ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18. E-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru.

Karamova Nazira Sunagatovna — Associated Professor, PhD. Department of Microbiology, Institute of Fundamental Medicine and Biology. Kazan (Volga region) Federal University. 420008, Kazan, Kremlevskaya St., 18, Russia. E-mail: nskaramova@mail.ru.

Zelenikhin Pavel Valer'evich — Associated Professor, PhD. Department of Microbiology, Institute of Fundamental Medicine and Biology. Kazan (Volga region) Federal University. 420008, Kazan, Kremlevskaya St., 18, Russia. E-mail: pasha_mic@mail.ru.

Kiselev Vladimir Dmitrievich — Professor, Doctor of Chemical Sciences. Department of Physical Chemistry, Alexander Butlerov Institute of Chemistry. Kazan (Volga region) Federal University. 420008, Kazan, Kremlevskaya St., 18, Russia. E-mail: vkiselev.ksu@gmail.com.

Lipatnikova Anastasiya Alexandrovna — Student. Department of Microbiology, Institute of Fundamental Medicine and Biology. Kazan (Volga region) Federal University. 420008, Kazan, Kremlevskaya St., 18, Russia. E-mail: stu92@mail.ru.

Ilinskaya Olga Nikolaevna — Head of Department, Professor, Doctor of Biological Sciences. Department of Microbiology, Institute of Fundamental Medicine and Biology. Kazan (Volga region) Federal University. 420008, Kazan, Kremlevskaya St., 18, Russia. E-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru.