

... БІОХІМІЯ ...

УДК: 579.6

Исследование электрофизических свойств клеток *Escherichia coli* XL-1 при действии ингибиторов клеточного метаболизма в процессе фаговой инфекции

О.И.Гулий, В.В.Игнатов, О.В.Игнатов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов, Россия)

Изучены изменения электрофизических (ЭФ) свойств микробных клеток *Escherichia coli* XL-1 при действии ингибиторов клеточного метаболизма в процессе фаговой инфекции бактериофагом M13K07. ЭФ свойства оценивали по ориентационным спектрам (ОС) клеточных суспензий – зависимостям изменений оптической плотности, обусловленных электроориентацией клеток, от частоты ориентирующего поля в интервале 470, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц. Показано, что ОС клеточных суспензий при их инфицировании фагом после предварительной обработки клеток ингибиторами практически не изменяются, что, вероятно, связано с угнетением биохимических процессов в клетке при воздействии ингибиторов. Без предварительной обработки клеток ингибиторами фиксируются значительные изменения величины электрооптического (ЭО) сигнала после их инфекции бактериофагом. Проведено сравнение результатов ЭО анализа с данными определения жизнеспособности клеток с помощью традиционного метода посева на плотные среды. Таким образом, метод ЭО анализа предоставляет уникальные возможности для определения жизнеспособности бактерий при действии ингибиторов клеточного метаболизма в процессе фаговой инфекции.

Ключевые слова: *Escherichia coli* XL-1, ориентационные спектры, ингибиторы, бактериофаг, жизнеспособность.

Study of the electrophysical properties of *Escherichia coli* XL-1 cells at inhibition of cellular metabolism during phage infections

O.I.Guliy, O.V.Ignatov, V.V.Ignatov

Changes occurring in the electrophysical characteristics of *Escherichia coli* XL-1 during its interaction with phage M13K07 were studied under exposure of the bacterium to inhibitors of cellular metabolism. The electrophysical characteristics were assessed from cell-suspension orientation spectra, that is, from the dependencies of optical-density changes induced by electro-orientation of bacterial cells on orienting-field frequencies (470, 1000, 1450, 2000, and 2800 kHz). Pretreatment of *E. coli* XL-1 with the inhibitors resulted in virtually no changes in the orientation spectra of suspensions of phage-infected cells. These results differ from the results of inhibitor-free experiments run on the same cells and phage, and it is possibly associated with the inhibitor-induced suppression of cellular biochemical processes. Electro-optic data were compared and found to correlate with data obtained from the determination of viability by traditional plating onto solid medium LB. The electro-optic method for analyzing cell suspensions was found to permit the assessment of cell viability at inhibition of cellular metabolism during phage infections.

Key words: *Escherichia coli* XL-1, orientation spectrum, inhibitors, bacteriophage, viability.

Введение

Ингибиторы ферментов находят широкое применение для получения информации о субстратной специфичности, природе функциональных групп активного центра и механизме каталитической активности ферментов. Примером плодотворного применения ингибиторов для изучения ферментативных систем является исследование дыхательной цепи и сопряженного фосфорилирования, изучение обмена веществ, различного рода метаболических шунтов и др. (Готтшалк, 1985; Узбб, 1966). Ранее нами были изучены изменения электрооптических (ЭО) характеристик бактериальных суспензий при действии ингибиторов метаболической активности на микробные клетки (Guliy et al., 2004) и было установлено, что ЭО метод анализа клеточных суспензий позволяет оценивать влияние ингибиторов на микробный метаболизм. Основной идеей данной работы являлось изучение воздействия ингибиторов при инфекции микробных клеток бактериофагами с целью определения жизнеспособности бактерий с помощью ЭО анализа клеточных суспензий. Жизнеспособность микроорганизмов определяется, прежде всего, способностью клеток к делению. Бактериофаги, как и все вирусы, ведут паразитический образ жизни, их хозяевами являются бактериальные клетки (Адамс, 1961; Лабинская, 1978). Поскольку размножение бактериофага возможно только в живых клетках (Адамс, 1961), регистрируя изменения

ЭО свойств микробных клеток при их инфицировании фагом, можно сделать вывод о том, что в исследуемой суспензии находятся живые клетки. Ингибирование биохимических процессов в микробных клетках приведет к невозможности деления клеток и, соответственно, инфекции их фагом (Гольдфарб, 1961). Мы предположили, что изменения ЭО параметров клеточных суспензий, обработанных ингибиторами, при их инфекции бактериофагами будут отличаться от ЭО свойств клеток, которые не подвергались такому воздействию ингибиторами.

Целью данной работы являлось изучение изменений ЭО параметров клеточных суспензий при действии ингибиторов клеточного метаболизма на процесс инфекции клеток бактериофагом с целью определения жизнеспособности бактерий.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* XL-1, полученные из коллекции Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов).

E. coli XL-1 выращивали на жидкой питательной среде LB следующего состава (г/л): NaCl – 10; дрожжевой экстракт – 5; пептон – 5. Культивирование проводили в аэробных условиях на круговой качалке (160 об/мин) при постоянной температуре 30°C в течение суток. Выращенные клетки использовали для ЭО исследований.

Перед проведением анализа клетки отмывали трехкратным в деионизованной воде центрифугированием при 2800 x g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве деионизованной воды. Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при 110 x g в течение 1 мин и использовали суспензию, оставшуюся в надосадочной жидкости.

Измерения ориентационных спектров проводились на электрооптическом анализаторе ELUS, разработанном в Государственном научном центре прикладной микробиологии (Оболensk, Моск. обл.) при длине волны света 670 нм (относительно вакуума) по методике (Bunin, Voloshin, 1996). Использовали дискретный набор частот ориентирующего электрического поля: 470, 1000, 1450, 2000, и 2800 кГц.

Ориентационный спектр (ОС) представлялся в виде частотной зависимости разности значений оптической плотности суспензий δOD , измеренных при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля (Bunin, Voloshin, 1996; Guliy et al., 2004).

Инфицирование микробных клеток проводили с использованием нитчатого фага M13K07 семейства Inoviridae. M13K07 – коммерческий препарат фирмы Stratagene (Швеция), имеющий устойчивость к канамицину, был сконструирован на основе дикого типа фага M13 (Hoogenboom et al., 1991; Sambrook et al., 1989).

Для инфицирования бактериофагом культуру клеток *E. coli* XL-1 высевали из отдельной колонии из чашки с агаризованной средой LB, содержащей 12,5 мкг/мл тетрациклина, в 2 мл жидкой среды LB, инкубировали ночь при постоянной аэрации и 37°C, затем 1/10 часть ночной культуры пересевали в свежую среду того же состава и растили до экспоненциальной фазы роста при 37°C и аэрации (Hoogenboom et al., 1991). По достижении ранней логарифмической фазы роста ($OD_{600}=0,5-0,6$, что соответствует 7×10^8 клеток/мл) аэрацию прекращали на 30–40 минут для восстановления F-пилей и инкубировали суспензию в термостате при 37°C. Концентрация микроорганизмов подсчитывалась стандартным методом с использованием световой микроскопии. Для инфицирования фагом берут 20 фагов на одну бактерию. После прибавления фагов культуру инкубировали в течение разного времени (1, 10, 30, 60 и 90 мин) при 37°C в термостате без покачивания для сорбции фаговых частиц на поверхности пилей. После инкубации клетки использовали для ЭО измерений.

Для подсчета количества колоний, образующихся из отдельных жизнеспособных клеток, использовали стандартный метод посева на поверхность плотной среды, содержащей (г/л): NaCl, 10; дрожжевой экстракт (FLUKA, Швейцария), 5; пептон (FLUKA, Швейцария), 5. Для этого суспензию клеток, подготовленную для ЭО анализа, обрабатывали ингибиторами, затем инкубировали 30 минут при 37°C. После этого 0,1 мл разбавленной культуры клеток вносили пипеткой на поверхность затвердевшего и подсушенного агара в чашке Петри и распределяли по поверхности с помощью стеклянного шпателя. Затем чашки инкубировали в термостате в течение 24 часов при постоянной температуре 30°C и проводили подсчет выросших колоний при хорошем освещении. В качестве контроля использовали данные подсчета выросших колоний при посеве клеток без обработки их ингибиторами (Методы общей бактериологии, 1983).

Результаты

Одним из важных вопросов при разработке новых методов индикации клеток является определение их жизнеспособности. Фагу присущи резко выраженные паразитические свойства, обуславливающие возможность существования и размножения его только в культурах соответствующего вида микроорганизмов. Размножение бактериофага возможно только в живых

клетках, находящихся в стадии деления (Адамс, 1961; Лабинская, 1978). Ингибирование биохимических процессов в микробных клетках приведет к невозможности процесса деления клеток и, соответственно, заражения их фагом. В нашей работе использовались классические ингибиторы биосинтеза белка клеток.

Первоначально для анализа взаимодействия фагов с клеточной поверхностью нами были использованы фаг М13К07 и клетки *E. coli* штамма XL-1. При исследовании изменений ЭО параметров клеток *E. coli* штамма XL-1 при их инфицировании фагом М13К07 было показано, что максимальные изменения ОС происходит при инфицировании клеток фагом из расчета 20 фагов на 1 бактерию. Изучение динамики изменений ОС клеточной суспензии штамма XL-1 при их инфицировании фагом показало, что уменьшение величины ЭО сигнала происходит уже через 5 мин, при этом максимальное уменьшение величины ЭО сигнала происходит через 30 мин от начала инкубации (рис. 1). В последующих экспериментах для регистрации инфицирования клеток в суспензию вносили 20 фагов на 1 бактерию, суспензию инкубировали с фагом в течение 5 и 30 мин.

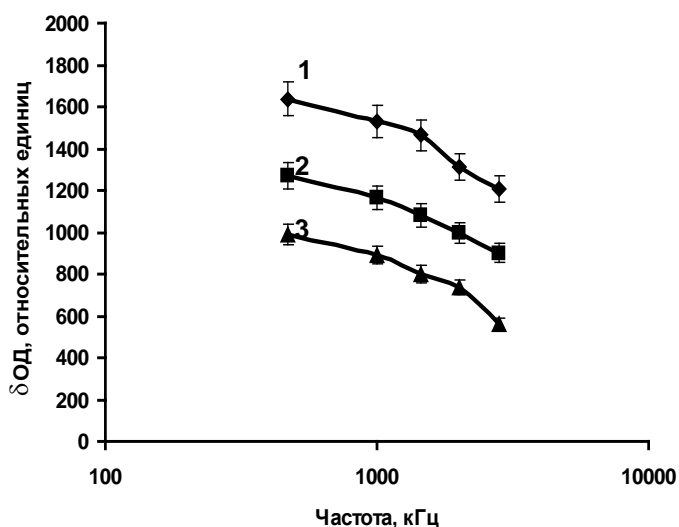


Рис. 1. Ориентационные спектры суспензии клеток *E. coli* XL-1, инкубированных после их инфекции фагом М13К07

Примечание: (1) – контроль – без фагов; (2) – после 5 мин; (3) – после 30 мин.

Ингибирование обменных процессов в микробной клетке может нарушить процесс инфицирования фагом (Гольдфарб, 1961). Регистрируя изменения ЭО свойств микробных клеток после воздействия ингибиторов и инфицирования фагом, можно предположить, что в исследуемой суспензии находятся живые клетки. Для оценки влияния ингибиторов на процесс взаимодействия фагов с микробной клеткой и регистрации соответствующих изменений ЭО свойств клеток *E. coli* XL-1 использовались ингибиторы азид натрия и карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (КЦХФ). Данные вещества использовались в качестве ингибиторов при изучении дыхания и фосфорилирования при переносе электронов (Готтшалк, 1985; Узбб, 1966). Механизм действия азид натрия и КЦХФ связан с ингибированием переноса водорода и электронов при окислении глюкозы до CO_2 и воды в клетках *E. coli*. Нами изучалось изменение ЭО свойств микробных клеток *E. coli* при взаимодействии с фагом после их обработки как азидом натрия, так и КЦХФ. Для этого клетки, выращенные на полноценной питательной среде, отмывали и вносили в дистиллированную воду. В полученную суспензию добавляли ингибиторы в концентрациях 10 мМ и инкубировали 30 минут при 37°C. После этого суспензию отмывали от ингибиторов и добавляли фаг из расчета 20 фагов на 1 бактерию. Затем суспензия клеток инкубировалась также при 37°C в течение 5 и 30 мин и использовалась для ЭО измерений. Из данных, представленных на рис. 2 А, Б, видно, что при добавлении к клеткам вышеупомянутых соединений происходит значительное уменьшение уровня ЭО сигнала по сравнению с контролем и экспериментом с добавлением фаговых единиц без ингибиторов. При добавлении фагов заметных изменений ОС клеток не происходит, что, вероятно, связано с угнетением процесса инфицирования фагом микробных клеток в результате воздействия ингибиторов.

На следующем этапе для подтверждения полученных результатов использовались ингибиторы хлорамфеникол и канамицин. Данные вещества являются ингибиторами биосинтеза белка в клетке

(Сазыкин, Навашин, 1991). Хлорамфеникол действует на белковый синтез микробной клетки, связываясь с 50S-субъединицей рибосом (Сазыкин, Навашин, 1991). Основной механизм действия канамицина связан с нарушением белкового синтеза на стадии переноса аминокислот от аминокил-тРНК на рибосомы (Сазыкин, Навашин, 1991; Лабинская, 1978). Канамицин обладает бактерицидным типом действия, не вызывая лизис клеток (Сазыкин, Навашин, 1991). Нами изучалось изменение ЭО свойств микробных клеток *E. coli* при взаимодействии с фагом после их обработки как хлорамфениколом, так и канамицином. Для этого клетки, выращенные на полноценной питательной среде, отмывали и вносили в дистиллированную воду. В полученную суспензию добавляли хлорамфеникол в концентрации 35 мкг/мл. Для оценки влияния канамицина в суспензию добавляли антибиотик до конечной концентрации 10 мкг/мл. Условия эксперимента были аналогичны эксперименту с использованием азида натрия и КХЦФ. Из данных, представленных на рис. 3, видно, что при добавлении к клеткам хлорамфеникола (А) и канамицина (Б) происходит значительное уменьшение уровня ЭО сигнала по сравнению с контролем (без обработки антибиотиком) и экспериментом с добавлением фага без ингибитора. При последующем добавлении фагов заметных изменений ОС клеток не происходит, что, вероятно, связано с угнетением биохимических процессов, происходящих в микробных клетках.

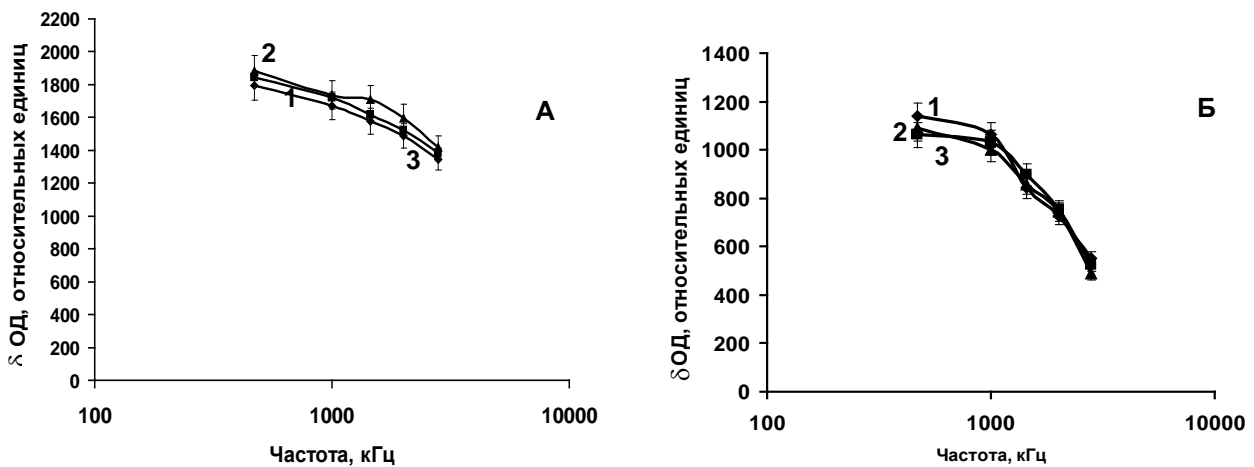


Рис. 2. Ориентационные спектры суспензии клеток *E. coli* XL-1, обработанных ингибиторами: А) азидом натрия (10мМ); Б) КХЦФ (10мМ) с добавлением фага М13К07

Примечание: (1) – контроль – без фагов; (2) – после 5 мин; (3) – после 30 мин.

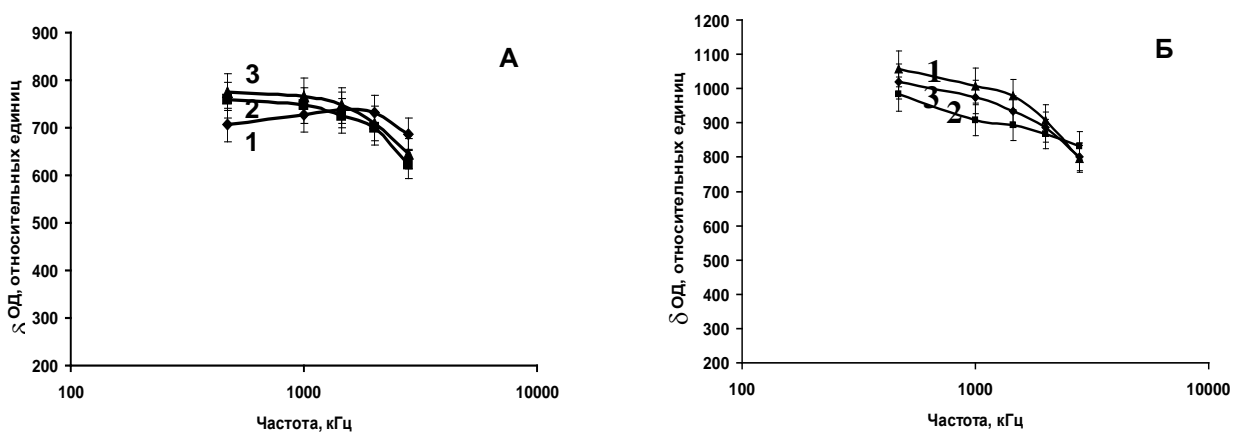


Рис. 3. Ориентационные спектры клеток *E. coli* XL-1, обработанных ингибиторами: А) канамицином (10 мкг/мл) и Б) хлорамфениколом (35 мкг/мл), с добавлением фага М13К07

Примечание: (1) – контроль – без фагов; (2) – после 5 мин; (3) – после 30 мин.

В качестве контроля жизнеспособности клеток использовался стандартный метод подсчета колоний клеток без и после их обработки ингибиторами (табл. 1). В результате проведенных исследований было показано, что после обработки клеток азидом натрия, КХЦФ, хлорамфениколом и канамицином количество жизнеспособных колоний значительно сократилось.

Таблица 1.

Количество колоний клеток *E. coli* XL-1 после их обработки ингибиторами

	Контроль, клетки без обработки ингибиторами	Клетки после обработки ингибиторами:			
		Азид натрия	КЦХФ	Канамицин	Хлорамфеникол
Количество колоний $\times 10^2$	144	12	18	16	22
	100%	8,3%	12,5%	11,1%	15,3%

Обсуждение

В результате исследований было показано, после обработки клеток XL-1 азидом натрия, КХЦФ, хлорамфениколом и канамицином происходит значительное изменение величины ЭО сигнала, что объясняется ингибированием биохимических процессов клеток на разных стадиях и возможной последующей их гибелью. При последующем заражении фагом значительных изменений ОС не происходит. Это свидетельствует о том, что фаг не инфицирует нежизнеспособные клетки. Таким образом, ЭО анализ предоставляет уникальные возможности для определения жизнеспособности бактерий. С нашей точки зрения, данное направление имеет большие перспективы, поскольку одним из основных вопросов при разных микробиологических и биотехнологических процессах является определение жизнеспособности используемых культур.

Существующие стандартные методы контроля жизнеспособности клеток можно разделить на три различные группы: 1) культуральные методы; 2) методы, основанные на контроле проницаемости клеточных мембран; 3) определение ферментативной метаболической активности. Точность любого метода определения жизнеспособности клеток ограничена ошибками выборки и техническими ошибками. В последнее время для определения жизнеспособности микробных клеток используют электрофизические методы анализа клеточных суспензий (Брезгунов и др., 1985; Волошин и др., 1996; Фомченков и др., 1990; Huang et al., 1992). Эти подходы характеризуются применением исключительно электрофизического анализа клеточных суспензий при действии ряда факторов, таких как термическая обработка клеток, воздействие додецилсульфатом натрия и др. В нашей работе была предпринята попытка внесения дополнительного элемента в процедуру анализа жизнеспособности клеток с помощью ЭФ анализа клеточных суспензий. Электрофизические свойства микробных клеток при взаимодействии с фагом являются тем маркером, который позволяет судить о жизнеспособности клеток. Ингибирование биохимических процессов в микробных клетках приводит к невозможности процесса деления клеток и, соответственно, заражения их фагом. Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что ЭО метод анализа предоставляет уникальные возможности для определения жизнеспособности бактерий при их индикации.

Работа была частично поддержана грантом Президента РФ для молодых докторов наук МД-57.2008.4 и государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-3171.2008.4.

Список литературы

- Адамс М. Бактериофаги. – М.: Изд-во иностр. лит., 1961. – 527с.
 Брезгунов В.Н., Швец Н.В., Бунин В.Д. и др. Определение электрооптическим методом числа неповрежденных бактериальных клеток после экстремальных воздействий // Микробиология. – 1985. – Т.54, №4. – С. 616–620.
 Волошин А.Г., Лапыш М.Е., Игнатов С.Г., Бунин В.Д. Применение электрооптического метода для контроля биопрепаратов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т.32, №6. – С. 669–670.
 Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – 297с.
 Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. – М.: Мир, 1985. – С.40.
 Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 394с.
 Методы общей бактериологии / Под ред. Ф.Герхарда. – М.: Мир, 1983. – Т.1. – С. 458–464.
 Сазыкин Ю.О., Навашин П.С. Антибиотики и оболочка бактериальной клетки // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Серия Биотехнология. – М., 1991. – Т.31. – С. 128–149.
 Узбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. – М.: Мир, 1966. – 862с.

Фомченков В.М., Иванов А.Ю., Мирошников А.И., Чугунов В.А. Электрофизический анализ повреждения внешней мембраны клеток *Escherichia coli* // Микробиология. – 1990. – Т.59, №1. – С. 19–25.

Bunin V.D., Voloshin A.G. Determination of cell structures, electrophysical parameters, and cell population heterogeneity // J. Colloid Interface Sci. – 1996. – Vol.180. – P. 122–126.

Guliy O.I., Ignatov O.V., Shchyogolev S.Yu. et al. Effect of inhibitors on electro-optical characteristics of *Escherichia coli* K-12 cells during glucose metabolism // Current studies of biotechnology. Food. – 2004. – Vol.III. – P. 139–145.

Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson K.S. et al. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (FAB) heavy and light chains // Nucleic Acids Research. – 1991. – Vol.19, №15. – P. 4133–4137.

Huang Y., Holzel R., Pethig R., Wang X.B. Differences in the AC electrodynamic of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies // Phys. Med. Biol. – 1992. – Vol.37, №7. – P. 499–1517.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Second ed. – N.Y.: Cold Spring Lab. Press, 1989. – 1659p.

Представлено: С.А.Конновою

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським

© О.І.Гулій, В.В.Ігнатів, О.В.Ігнатів, 2009