

••• МІКРОБІОЛОГІЯ ••• MICROBIOLOGY •••

УДК: 579.6

**Электрофизические свойства микробных клеток при индукции
бактериофага****О.А.Караваяева, О.И.Гулий, С.А.Павлий, О.В.Игнатов***Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
РАН (Саратов, Россия)*

Изучены изменения электрооптических (ЭО) свойств клеточных суспензии *E. coli* B-878 и *E. coli* TG1 при их инфекции бактериофагом лямбда. При инфекции клеток *E. coli* B-878, находящихся в лизогенном состоянии, фагом лямбда не зафиксировано значительных изменений величины ЭО сигнала. Данные результаты могут быть обусловлены устойчивостью культур к фагу в результате лизогенизации. Проведены исследования изменений электрофизических свойств клеточных суспензий при индукции литического пути развития бактериофага лямбда вследствие воздействия температуры и ультрафиолетового облучения. Проведены контрольные эксперименты по изучению изменений ЭО параметров суспензии клеток *E. coli* TG1 при их инфекции фагом лямбда, при этом происходит изменение величины ЭО сигнала. Показано, что при индукции в клетках профага с помощью УФ облучения или температуры происходят изменения ЭО свойств суспензий после их инфекции специфическим фагом, что позволяет избежать ложноотрицательных результатов при детекции бактерий, в том числе и с помощью метода ЭО анализа бактериальных суспензий и специфических бактериофагов. Полученные данные свидетельствуют, что метод электроориентации клеток может быть использован для экспресс-анализа зараженности бактериальных клеток профагом.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, ориентационные спектры, лизогения, бактериофаг.

Electrophysical properties of bacterial cells during induction of bacteriophage
O.A.Karavaeva, O.I.Guliy, S.A.Pavliy, O.V.Ignatov

This work was done to study the changes occurring in the electrooptical properties of suspensions of *Escherichia coli* strains B-878 and TG1 during cell infection with bacteriophage λ . Incubation of lysogenic *E. coli* B-878 with phage λ does not change value of the electrooptical signal, possibly because of the cultures' phage resistance acquired through lysogenization. The orientational spectra of the *E. coli* B-878 suspensions changed the most under lytic pathway induction resulting from temperature and UV irradiation effect. Control experiments with phage-infected *E. coli* TG1 revealed changes in the electrooptical signal. This paper shows that prophage induction in bacterial cells by UV irradiation or temperature is accompanied by changes in the electrooptical properties of the suspensions incubated with a specific phage. This fact may help to avoid false-negative results in detection of bacteria, including that by electrooptical analysis of bacterial suspensions and specific phages. The data from this study also indicate that method of electroorientation cells may be used for rapid analysis of prophage infection of bacteria.

Key words: *Escherichia coli*, orientational spectrum, lysogenization, bacteriophage.

Введение

Лизогенные культуры представляют большой интерес в микробиологических производствах, вследствие концентрации больших масс микроорганизмов, находящихся в стадии интенсивного роста, поскольку создаются благоприятные условия для размножения соответствующих фагов, часто вызывающих лизис производственных культур. Поэтому вопрос определения в культуре микробных клеток присутствия профага и определения условий для его поддержания в клетке без их лизиса очень важен.

Ранее нами была показана возможность использования умеренного бактериофага M13K07 для детекции бактерий *E. coli* при помощи электрооптического (ЭО) анализа клеточных суспензий (Bunin et al., 2004). Мы считаем, что метод ЭО анализа клеточных суспензий также может быть использован для быстрого анализа зараженности бактериальных клеток профагом.

Целью данной работы являлось изучение изменений ЭО параметров микробных суспензий при индукции литического пути развития бактериофага.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* B-878 (W3350/λ hc I 857/λ-r) и *E. coli* TG1 (*F'*, *thi*, (*lac-proAB*), *hsdR4(del5)*, *lacZ(M15)*), полученные из коллекции Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов).

Микробные клетки *E. coli* B-878 и *E. coli* TG1 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 подготавливали и использовали для ЭО исследований.

Перед проведением анализа клетки отмывали трехкратно в дистиллированной воде центрифугированием при 2800 × g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве дистиллированной воды. Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при 110 × 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, как описано в работах (Bunin, Voloshin, 1996; Guliy et al., 2004).

Инфицирование микробных клеток проводили с использованием бактериофага лямбда. Культуру *E. coli* B-878 и *E. coli* TG1 высевали из отдельной колонии с чашки с агаризованной средой LB в 2 мл среды LB, как описано (Sambrook et al., 1989). Для инфицирования фагом берут 20 фагов на одну бактерию. После прибавления фагов культуру инкубировали 30 мин в термостате без покачивания для сорбции фаговых частиц на поверхности пилей, после чего клетки использовали для ЭО измерений.

Суспензию клеток подвергали воздействию температуры +30°C; +45°C в течение 30 мин и ультрафиолетового облучения. Обработку клеток УФ облучением проводили по методике (Методы общей бактериологии, 1983) с использованием лампы УФ облучения (0,1–0,4 J·m⁻²), в чашках Петри на расстоянии 30 см от лампы. Толщина слоя суспензии составила 2 мм. Длина волны 253,7 нм, время прогревания лампы 20 мин, время воздействия лампы – 30 мин. После облучения проводили контрольный высеv культуры клеток для определения титра жизнеспособных клеток по методике (Методы общей бактериологии, 1983).

Результаты

Лизогенное состояние микроорганизмов, при котором в их хромосоме находится один или несколько умеренных бактериофагов (профагов) и при этом не иницируется синтез фагового материала, а профаги репродуцируются вместе с хромосомами хозяина, передаваясь при каждом клеточном делении в дочерние клетки, широко распространено и является нормальным состоянием бактерий. При лизогении бактериофаг сохраняет способность выходить из генома клетки-хозяина, при этом наиболее изученным является бактериофаг лямбда. Бактериофаг лямбда (сем. Siphoviridae) – это бактериофаг с двухцепочечной геномной ДНК, размножающийся в клетках *Escherichia coli*. В зависимости от характера взаимодействия вируса и клетки-хозяина развитие фага лямбда может происходить по литическому или по лизогенному пути. В качестве объекта исследования использовали микробные клетки *E. coli* штамма B-878, находящиеся в лизогенном состоянии и имеющие в своем геноме гены бактериофага лямбда, и микробные клетки *E. coli* TG1, не имеющие в своем геноме генов бактериофага лямбда.

Первоначально проводились исследования изменений электрооптических параметров клеток *E. coli* штамма B-878 при их инфекции бактериофагом лямбда. Поскольку ранее нами было показано, что максимальные изменения величины ЭО сигнала суспензии клеток происходят при их инфицировании из расчета 20 фагов на бактерию (Bunin et al., 2004), в данной серии экспериментов были использованы те же условия. Было установлено, что после инфекции клеток данного штамма бактериофагом лямбда значительных изменений величины ЭО параметров суспензии клеток не происходит (рис. 1). Полученные данные могут быть объяснены устойчивостью клеток исследуемого штамма к бактериофагу, поскольку известно, что лизогенная клетка обладает специфическим иммунитетом к повторному инфицированию фагом лямбда (Адамс, 1961).

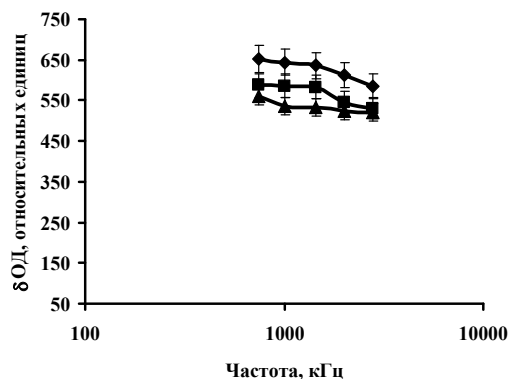


Рис. 1. Ориентационные спектры суспензии клеток *E. coli* В-878, измеренные после их инфекции бактериофагом лямбда

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

Лизогенными культурами являются такие культуры, которые обладают способностью продуцировать зрелые частицы фага без воздействия на них фагом извне. Под действием различных факторов – ультрафиолетовое, ионизирующее излучения, некоторые химические соединения, воздействие физическими факторами, а иногда спонтанно может происходить превращение профага в вегетативную форму, сопровождающееся размножением бактериофага, лизисом клетки и выходом бактериофагов (Гольдфарб, 1961). Нами проводились исследования по изучению изменений ЭО параметров суспензии клеток *E. coli* штамма В-878 при искусственной индукции выхода бактериофага лямбда из клеток. Для этого изучали влияние физических факторов (температурные условия) и воздействие УФ облучения на литический путь развития бактериофага лямбда с помощью метода ЭО анализа клеточных суспензий. Для этого лизогенную культуру клеток *E. coli* штамма В-878 облучали ультрафиолетом, после чего суспензия клеток подготавливалась для ЭО анализа и использовалась для ЭО измерений. Было показано (рис. 2), что в результате воздействия УФ облучения происходит значительное изменение величины ЭО сигнала. Это, вероятно, связано с тем, что под воздействием УФ облучения в бактериальных клетках происходила инактивация репрессора посредством инактивации гена *cI*, что приводило к лизису клеток и выходу бактериофага (Гольдфарб, 1961; Адамс, 1961). Изменения ЭО параметров клеточных суспензий, вероятно, обусловлены развитием бактериофага лямбда по литическому пути.

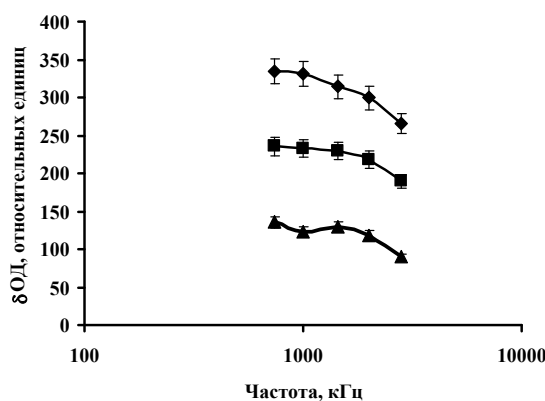


Рис. 2. Ориентационные спектры микробных клеток *E. coli* В-878 при воздействии ультрафиолетового облучения

Примечание: (1) – контроль – без воздействия УФ; (2) – после 30 мин воздействия УФ; (3) – после 30 мин воздействия УФ и инфекции фагом лямбда.

Термоиндукцию бактериофага лямбда проводили при воздействии температуры +45°C в течение 30 мин. В результате было показано (рис. 3), что при температуре +45°C наблюдается значительное изменение величины ЭО сигнала после инфицирования клеток бактериофагом.

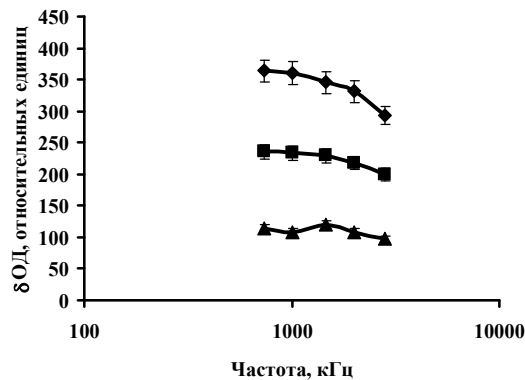


Рис. 3. Ориентационные спектры микробных клеток *E. coli* B-878 при воздействии температуры +45°C

Примечание: (1) – контроль – без воздействия +45°C; (2) – после 30 мин воздействия температуры +45°C; (3) – после 30 мин воздействия температуры +45°C и инфекции фагом лямбда.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, поскольку известно, что если профаг несет мутацию в гене *cI*, приводящую к тому, что синтезируемый репрессор оказывается чувствительным к температуре, то при повышении температуры развитие фага переключается на путь литического цикла. В результате клетки, лизогенные по такому фагу, при низкой температуре растут нормально, а при повышении температуры начинают лизироваться. Можно предположить, что воздействие температуры +45°C приводит к литическому пути развития бактериофага лямбда.

Одновременно проводились исследования по возможности инфицирования клеток штамма B-878 бактериофагом лямбда после предварительной индукции выхода фага лямбда. Для этого клетки, после ультрафиолетового и температурного воздействия, инфицировали бактериофагом лямбда из расчета 20 фагов на 1 бактерию. Затем суспензии клеток подготавливались для измерений ЭО параметров клеточных суспензий. В результате было показано, что после индукции развития бактериофага по литическому пути происходит значительное изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток, что связано с инфекцией клеток (рис. 2 и 3, линия 3).

На следующем этапе для подтверждения полученных были проведены исследования изменений величины ЭО параметров суспензии клеток *E. coli* штамма TG1, не имеющих в своем геноме генов фага лямбда, при их инфекции фагом лямбда. При этом было зафиксировано значительное изменение величины ЭО сигнала, т.е. клетки данного штамма являются чувствительными к инфекции фагом лямбда (рис. 4).

На следующем этапе проводились исследования по изучению изменений ЭО параметров суспензии клеток *E. coli* штамма TG1 при воздействии физических факторов (температура +45°C и УФ облучение). Было показано, что значительных изменений величины ЭО сигнала при воздействии УФ и температуры 45°C не наблюдалось.

Одновременно проводился контроль подсчета живых клеток исследуемых штаммов *E. coli* (B-878 и TG1) после воздействия УФ и температуры 45°C. Результаты представлены в табл. 1. Как видно из полученных данных, после инфицирования клеток *E. coli* штамма B-878 при температуре +30°C количество колоний фактически не изменяется, что подтверждает устойчивость штамма к повторному инфицированию бактериофагом лямбда. Однако при термоиндукции при температуре +45°C и обработке УФ и при последующем инфицировании клеток *E. coli* штамма B-878 наблюдается значительное сокращение количества колоний на 73% и 32% соответственно. Из полученных данных видно, что количество колоний клеток *E. coli* штамма TG1 после воздействия УФ и температуры +45°C снижается.

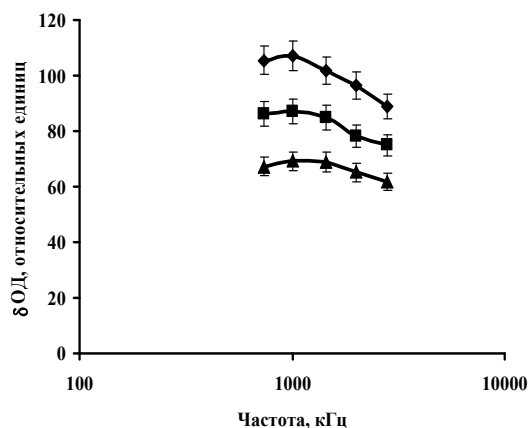


Рис. 4. Ориентационные спектры микробных клеток *E. coli* TG1, измеренные после их инфекции бактериофагом лямбда

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

В результате исследований было показано, что после инфекции клеток штамма B-878, находящихся в лизогенном состоянии, бактериофагом лямбда инфекция клеток не происходит и изменения величины ЭО сигнала суспензии клеток не зафиксированы. После обработки клеток B-878 УФ или температурой $+45^{\circ}\text{C}$ происходит значительное изменение величины ЭО сигнала, что объясняется развитием бактериофага лямбда по литическому пути. При последующем заражении фагом лямбда происходит значительное изменение ОС. Это свидетельствует о том, что клетки стали чувствительными к фагу лямбда после индукции развития фага по литическому пути. Проведены контрольные эксперименты по изучению изменений ЭО параметров суспензии клеток *E. coli* близкородственного штамма TG1 при их инфекции фагом лямбда. Полученные данные подтверждены стандартными микробиологическими методами. Таким образом, метод ЭО анализа клеточных суспензий предоставляет уникальные возможности для экспресс-анализа зараженности бактериальных клеток профагом.

Таблица 1.

Количество колоний клеток *E. coli* B-878 и *E. coli* TG1 после инфекции бактериофагом лямбда и воздействий температуры $+45^{\circ}\text{C}$ и ультрафиолетового облучения

	Температура				Ультрафиолетовое воздействие	
	$+30^{\circ}\text{C}$		$+45^{\circ}\text{C}$		30 мин воздействия – без добавления фагов	30 мин воздействия с добавлением фага
	контроль – без добавления фагов	опыт – с добавлением фага	30 мин воздействия – без добавления фагов	30 мин воздействия с добавлением фага		
<i>E. coli</i> B-878						
Кол-во колоний $\times 10^7$	152 100%	145 95,4%	43 28,3%	3 2%	82 54%	27 18%
<i>E. coli</i> TG1						
Кол-во колоний $\times 10^7$	32 100%	14 44%	24 75%	24 75%	22 69%	30 94%

Обсуждение

Лизогенные культуры представляют большой интерес в производствах, основанных на использовании продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, при производстве антибиотиков, витаминов, сыроделии и др. Вследствие концентрации на указанных производствах больших масс микроорганизмов, находящихся в стадии интенсивного роста, создаются благоприятные условия для размножения соответствующих фагов, часто вызывающих лизис производственных культур.

Проблема фаголизиса – одна из актуальнейших на таких производствах, как молочных, сыродельных и др. Поэтому очень важным является вопрос определения наличия в культуре профага, а также создание условий для его поддержания в клетке без их лизиса, поскольку лизис культуры может негативным образом сказаться на самом производстве. Мы считаем, что метод ЭО анализа имеет широкие возможности и может быть использован для быстрого определения наличия в клетке профага определенного вида, а также определения условий, при которых стимулируется его выход из клетки. С нашей точки зрения, данное направление имеет большие перспективы, поскольку одним из основных вопросов при разных микробиологических и биотехнологических процессах является предотвращение лизиса бактериальных культур. Поскольку используемый нами фаг в зависимости от условий может развиваться по литическому пути или находиться в клетке в симбиотическом отношении, метод ЭО анализа клеточных суспензий позволяет определять условия, при которых развитие бактериофага будет идти по литическому пути, для предотвращения лизиса бактериальных культур в микробиологических производствах.

Другой областью применения полученных результатов может являться их использование для таксономической дифференциации различного рода микроорганизмов с помощью бактериофагов. Поскольку большинство микроорганизмов являются лизогенными, а лизогенные культуры устойчивы к инфекции тем же фагом, который они содержат, то, создавая условия для развития фага по литическому пути, можно исключить получение ложноотрицательных результатов при детекции клеток с использованием бактериофагов.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ №09-02-12442-офи_м.

Список литературы

- Адамс М. Бактериофаги. – М., Изд-во иностр. лит., 1961. – 527с. /Adams M. Bakteriofagi. – М., Izd-vo inostr. lit., 1961. – 527s./
- Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – 297с. /Gol'dfarb D.M. Bakteriofagiya. – М.: Medgiz, 1961. – 297s./
- Методы общей бактериологии / Под ред. Ф.Герхарда. – М., Мир, 1983. – Т.1. – С. 458–464; Т.2. – С. 13–15. /Metody obshchey bakteriologii / Pod red. F.Gerharda. – М., Mir, 1983. – Т.1. – С. 458–464; Т.2. – С. 13–15/
- Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I. et al. Electro-optical analysis of the Escherichia coli–phage interaction // Anal. Biochem. – 2004. – Vol.328. – P. 181–186.
- 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.
- 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.Конновой / Presented by: S.A.Konnova

Рекомендовано до друку: Л.І.Воробйовою / Recommended for publishing by: L.I.Vorobyova

Подано до редакції / Received: 15.10.2010.