

Изменение электрофизических свойств клеток *Escherichia coli* при действии левомицетина и тетрациклина

О. И. ГУЛИЙ^{1,2,3}, В. Д. БУНИН⁴, О. С. ЛАРИОНОВА², Е. Г. ЖНИЧКОВА², А. Б. БАЛКО⁵, О. В. ИГНАТОВ¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

² Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

³ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАН, Саратов

⁴ EloSystem GbR, Берлин

⁵ Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

Change of Electrophysical Properties of *Escherichia coli* Cells Due to Levomycetin and Tetracycline Action

O. I. GULIY^{1,2,3}, V. D. BUNIN⁴, O. S. LARIONOVA², E. G. ZHNICHKOVA², A. B. BALKO⁵, O. V. IGNATOV¹

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov

² N. I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

³ Saratov Research Veterinary Institute, Russian Academy of Sciences, Saratov

⁴ EloSystem GbR, Berlin

⁵ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Исследовано влияние антибиотиков ингибиторов белкового синтеза хлорамфеникола и тетрациклина на электрофизические свойства клеток *Escherichia coli* K-12. Установлено, что существенные изменения в ориентационных спектрах (ОС) суспензий клеток, инкубированных с различными концентрациями хлорамфеникола, имели место только на первых пяти частотах ориентирующего электрического поля (10—1000 кГц). При инкубации клеток с хлорамфениколом (1,5 мкг/мл) и с тетрациклином (1,7 мкг/мл) изменений ОС клеточных суспензий не зарегистрировано. Показано, что значительное изменение величины электрооптического сигнала происходит при одновременной инкубации клеток K-12 с хлорамфениколом (1,5 мкг/мл) и тетрациклином (1,7 мкг/мл), что объясняется синергидным действием двух антибиотиков. Таким образом, с использованием результатов электрооптического анализа установлена возможность регистрации усиления антибактериального эффекта при совместном действии хлорамфеникола и тетрациклина. Проводились дополнительные контрольные эксперименты методом посева клеток на питательную среду LB с хлорамфениколом и тетрациклином. Полученные данные дают основания предположить достаточную эффективность электрофизических методов для изучения воздействия антибиотиков на микроорганизмы.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, электрооптические характеристики клеточных суспензий, хлорамфеникол, тетрациклин.

The effect of chloramphenicol and tetracycline, as inhibitors of protein synthesis, on electrophysical properties of *Escherichia coli* K-12 cells was investigated. Significant changes in the orientation spectra (OS) of the cell suspensions incubated with various concentrations of chloramphenicol were observed only at the first five frequencies of the electric field (10-1000 kHz). When the cells were exposed to chloramphenicol (1.5 mcg/ml) or tetracycline (1.7 mcg/ml), no changes in the OS were recorded. Significant changes in the electrooptic signal were observed, when the K-12 cells were simultaneously incubated with chloramphenicol (1.5 mcg/ml) and tetracycline (1.7 mcg/ml), that could be due to the synergistic action of the antibiotics. Therefore, the electrooptic analysis provided registration of higher antibacterial effect with the simultaneous use of chloramphenicol and tetracycline. Additional control experiments with the cell culture on the LB nutrient medium containing chloramphenicol and tetracycline were performed. The results suggested that the use of electrophysical methods for investigation of antibiotics effect on microorganisms was rather efficient.

Key words: *Escherichia coli*, cell suspensions electrooptic characteristics, chloramphenicol, tetracycline.

Введение

В результате действия антибиотиков на микробные клетки происходит ускорение или замедление определённой реакции обмена или изменение проницаемости мембран по отношению к специфичным ионам или молекулам, что в свою очередь приводит к изменению электрофизичес-

ких свойств микробных клеток. Последние отражаются в изменениях электрооптических (ЭО) характеристик клеточных суспензий, регистрируемых в экспериментах с использованием ориентации клеток в электрическом поле.

Хлорамфеникол — антибиотик широкого спектра действия, является ингибитором белкового синтеза. Основной механизм антибиотического действия хлорамфеникола связан с нарушением белкового синтеза на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК на рибосомы.

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13. ИБФРМ РАН

Считается, что он инактивирует ферментативную систему, катализирующую образование пептидной связи в рибосомной системе белкового синтеза [1–2]. Имеются данные об усилении антибактериального эффекта хлорамфеникола при применении с другими антибиотиками, например, с тетрациклином [1]. Тетрациклин — антибиотик широкого спектра действия. Механизм его действия обусловлен ингибированием связывания аминоацил-тРНК с А местом рибосомы на 30S рибосомной субъединице [1–3].

Можно предположить, что нарушения биохимических процессов в микробных клетках в результате действия антибиотических ингибиторов белкового синтеза должны приводить к изменению электрофизических свойств микробных клеток.

Целью данной работы является оценка изменений электрофизических свойств микробных клеток *Escherichia coli* при сочетанном применении хлорамфеникола и тетрациклина.

Материал и методы

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* K-12, полученные из коллекции Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов).

E. coli K-12 выращивали на жидкой питательной среде 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.

Подготовка клеток к анализу. Перед проведением анализа клетки отмывали трёхкратным центрифугированием при 2800×g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве дистиллированной воды (электропроводность 1,8 мкS/см). Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при 110×g в течение 1 мин и использовали суспензию, оставшуюся в надосадочной жидкости. Затем доводили оптическую плотность подготовленной суспензии OD₆₇₀ для каждого вида использованных микроорганизмов до 0.4–0.42.

Измерение ориентационных спектров клеток. Измерения 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 [4]. Использовали дискретный набор частот ориентирующего электрического поля: 10, 52, 104, 502, 1000, 5020, и 10000 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. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток. Есть основания допустить, что общий вид ОС при подобранных экспериментальных условиях (длина волны света, амплитуда напряжённости ориентирующего электрического поля и др.) определяется, главным образом, частотной зависимостью анизотропии поляризуемости клеток [5–7].

Результаты исследования

Известно, что сочетание нескольких лекарственных препаратов оказывается более эффективным, нежели использование каждого из них по-

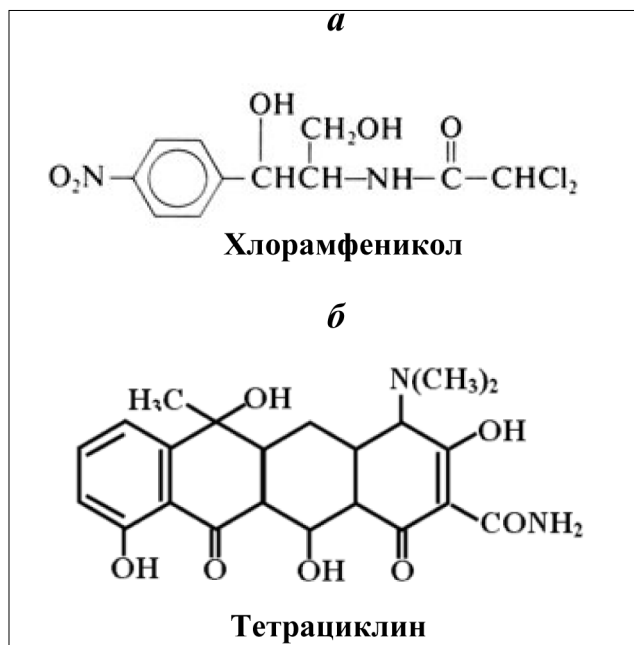


Рис. 1. Структурные формулы хлорамфеникола (а) и тетрациклина (б).

рознь. Для предупреждения возникновения устойчивых форм микроорганизмов часто применяют одновременно два и более антибиотика. Одновременное использование двух или нескольких антибиотиков рекомендуют в том случае, когда хорошо известны их свойства и вызываемый каждым из них эффект. Синергизм при воздействии двух веществ на микробную клетку может быть обусловлен: 1) влиянием одного из антибиотиков на транспорт в клетку другого; 2) освобождением одним антибиотиком внутриклеточного акцептора для другого; 3) торможением одним антибиотиком образования фермента, разрушающего второй антибиотик [8, 9].

Нами проводились эксперименты по регистрации изменений электрофизических (ЭФ) свойств клеток при одновременном действии хлорамфеникола и тетрациклина. Поскольку данные антибиотики активны в отношении большого числа грамотрицательных палочек, в качестве модели использовались микробные клетки *E. coli*. При использовании ряда антибиотиков большое значение имеет определение оптимальных доз препаратов с учётом их синергидного действия. Оптимальными являются такие дозы антибиотиков, при которых концентрация антибиотиков в 2–3 раза превышает величину его минимальной подавляющей концентрации (МПК) в отношении возбудителя.

Хлорамфеникол — антибиотик широкого спектра действия, является ингибитором белкового синтеза. Структурная формула представлена на рис. 1, а. Антибиотик действует на белковый синтез микробной клетки, связываясь с 50S-

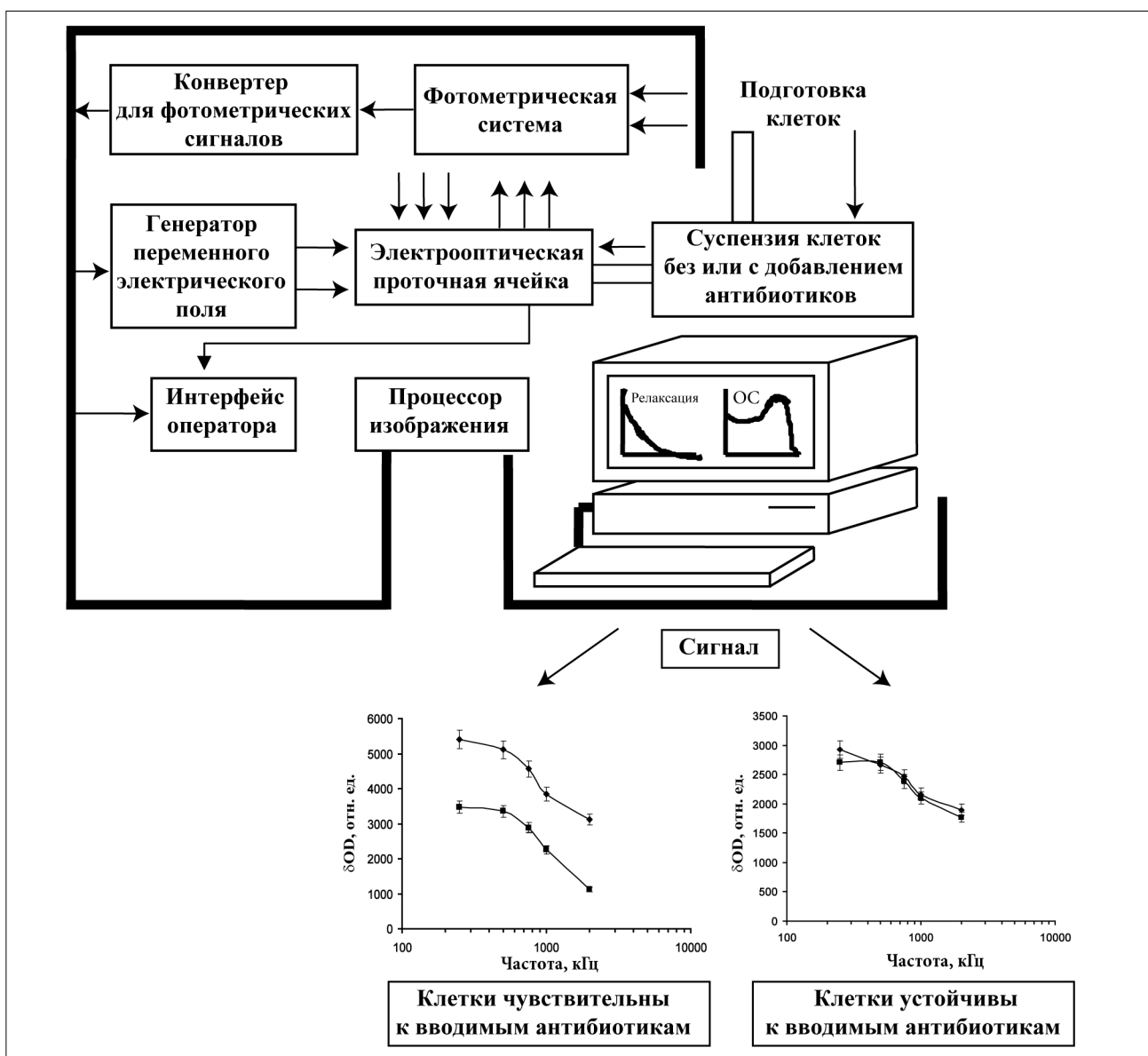


Рис. 2. Общая схема прибора (электрооптический анализатор ELUS) и измерений.

субъединицей рибосом. Действие это является обратимым: при прекращении контакта клетки с антибиотиком белковый синтез восстанавливается, что объясняет бактериостатический эффект антибиотика [1].

Поскольку МПК хлорамфеникола в отношении клеток *E.coli* находится в пределе 0,5–2,0 мкг/мл, нами изучалась динамика изменений электрофизических свойств микробных клеток *E.coli* модельного штамма К-12 при воздействии хлорамфеникола в концентрации 1,5 мкг/мл. Общая схема прибора и измерений представлена на рис. 2. В ходе эксперимента в суспензию клеток *E.coli* штамма К-12 добавляли хлорамфеникол до конечной концентрации 1,5 мкг/мл и регистрировали изменения ЭФ свойств клеток после 5, 15, 30, 60 и 150 мин воздействия антибиотика. В результате проведенных исследований

было показано (рис. 3, а), что значительных изменений величины ЭО сигнала суспензии клеток не зафиксировано.

В качестве контроля полученных результатов проводился посев клеток на питательную среду LB с хлорамфениколом (1,5 мкг/мл). Затем культура инкубировалась при постоянной температуре 30°C в течение суток, показано, что на среде соответствующего состава наблюдался рост культуры: хлорамфеникол в данной концентрации не оказывает воздействие на клетки изучаемого штамма.

На следующем этапе работы изучались изменения величины ЭО сигнала клеток *E.coli* при действии тетрациклина. Тетрациклин — антибиотик широкого спектра действия. Структурная формула представлена на рис. 1, б. Механизм действия тетрациклина обусловлен

ингибированием связывания аминокил-тРНК с А местом рибосомы на 30S рибосомной субъединице [2–3]. Тетрациклин обладает близкой активностью в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных палочек (особенно в отношении клеток *E.coli*). В низких концентрациях он характеризуется бактериостатическим действием. Предварительно нами проводились эксперименты по оценке изменений ЭО характеристик микробных клеток К-12 при инкубации с разными концентрациями тетрациклина. Минимальная подавляющая концентрация для большинства штаммов *E.coli* колеблется в пределах 1–25 мкг/мл, поэтому в наших экспериментах изучалась динамика изменений ЭО параметров клеток К-12 при действии тетрациклина в концентрации 1,7 мкг/мл. Для этого к суспензии клеток добавлялся тетрациклин в конечной концентрации 1,7 мкг/мл, затем суспензия клеток инкубировалась при 30°C разное время (5, 15, 30, 60 и 150 мин), подготавливалась для анализа и использовалась для регистрации ЭО параметров клеточной суспензии. В результате проведённых исследований было показано (рис. 3, б), что при действии используемой концентрации тетрациклина во всём используемом временном диапазоне значительных изменений ЭО параметров клеточной суспензии К-12 не происходит. Полученные результаты могут быть объяснены ограничением проникновения антибиотика внутрь клетки. Несмотря на то что тетрациклин относится к антибиотикам широкого спектра действия, внешняя мембрана грамотрицательных бактерий может до известной степени ограничивать их проникновение в клетку [3].

В качестве контроля проводился посев клеток на питательную среду LB с тетрациклином (1,7 мкг/мл). Затем культура инкубировалась при постоянной температуре 30°C в течение суток, при этом наблюдался рост культуры.

Согласно литературным источникам, антибактериальный эффект хлорамфеникола удаётся повысить при сочетании с тетрациклином. Поэтому на следующем этапе изучалось изменение ЭО параметров клеточной суспензии штамма К-12 при одновременном действии хлорамфеникола и тетрациклина. Для этого к суспензии клеток одновременно добавляли хлорамфеникол в концентрации 1,5 мкг/мл

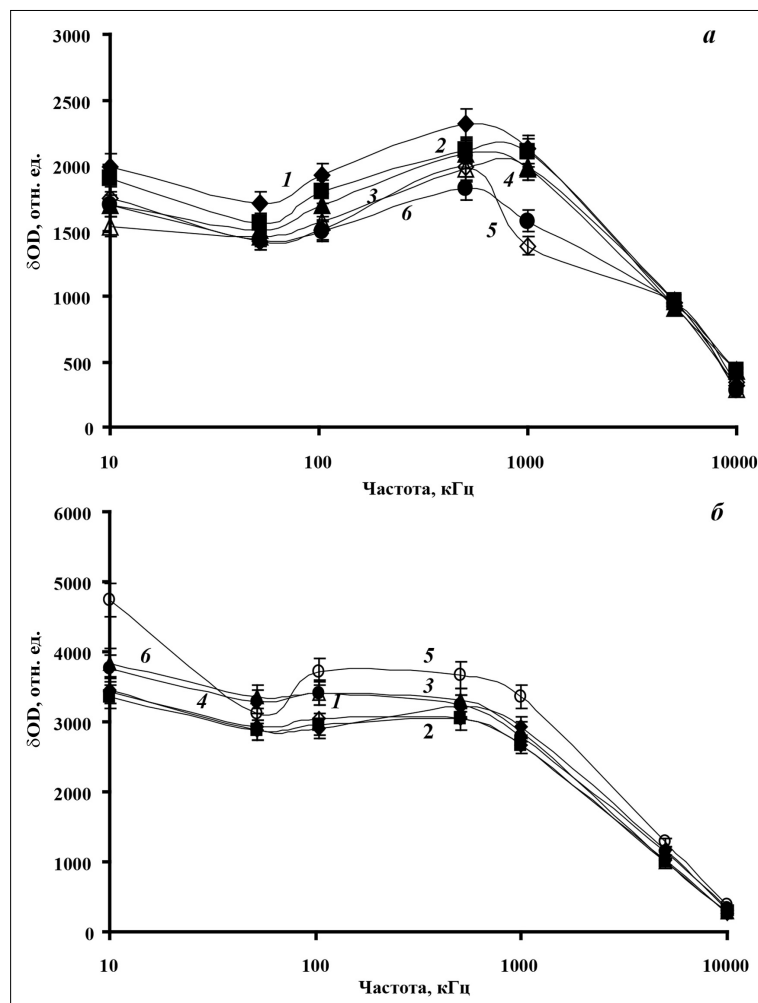


Рис. 3. Динамика изменения ориентационных спектров (ОС) клеток *E.coli* К-12, инкубированных с хлорамфениколом (а) 1,5 мкг/мл, и тетрациклином (б) 1,7 мкг/мл.

(1) – контроль суспензия клеток без добавления антибиотиков; (2) – 5 мин; (3) – 15 мин; (4) – 30 мин; (5) – 60 мин; (6) – 150 мин.

(при которой значительных изменений ЭО сигнала не происходило — см. рис. 3, а) и тетрациклин в концентрации 1,7 мкг/мл, при которой также не зафиксировано изменений величины ЭО сигнала суспензии клеток (см. рис. 3, б). Изменения ОС регистрировались через 5, 15, 30, 60 и 150 мин инкубации при 30°C. В результате проведённых исследований (рис. 4) было показано незначительное уменьшение величины ЭО сигнала через 5 мин инкубации, что, вероятно, соответствует адсорбции антибиотиков на поверхности клеток. Через 15 мин инкубации наблюдается значительное увеличение величины ЭО сигнала, а максимальное увеличение сигнала происходит через 30 мин инкубации с двумя антибиотиками. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала суспензии клеток при частоте электрического поля 52 кГц.

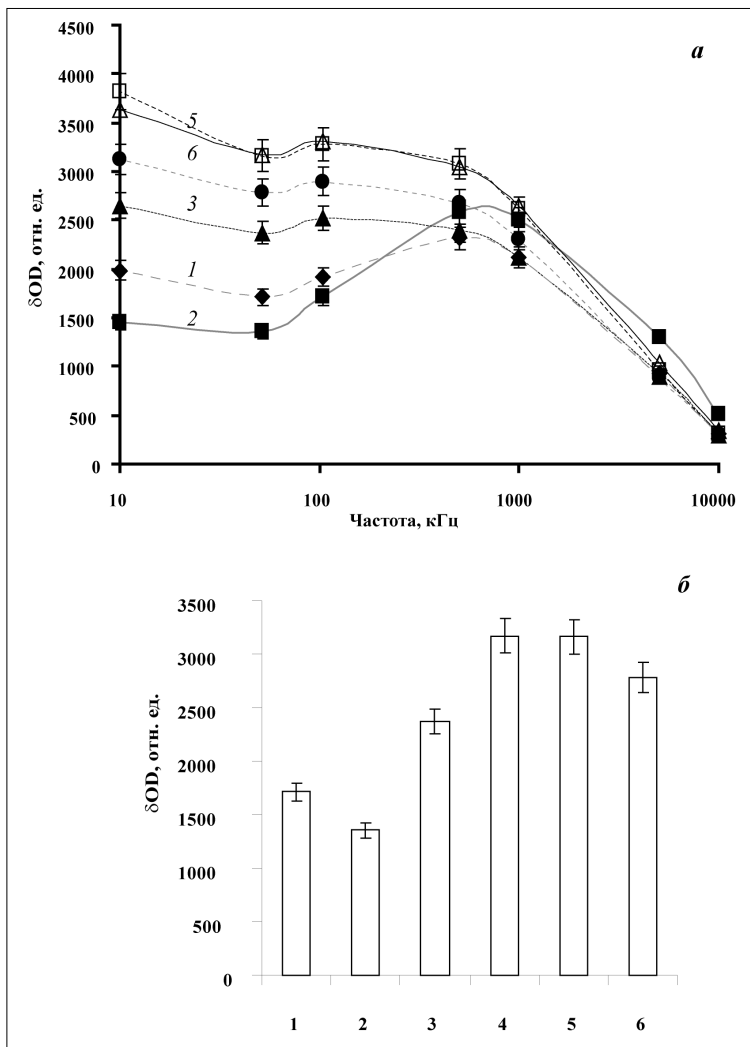


Рис. 4. Динамика изменения ОС (а) и изменение значений электрооптического (ЭО) сигнала (б) при частоте ориентирующего поля 52 кГц клеток *E.coli* К-12, инкубированных с хлорамфениколом (1,5 мкг/мл) и тетрациклином (1,7 мкг/мл).

(1) – контроль суспензия клеток без добавления антибиотиков; (2) – 5 мин; (3) – 15 мин; (4) – 30 мин; (5) – 60 мин; (6) – 150 мин.

Для контроля полученных результатов проводился посев клеток на питательную среду LB, содержащую левомецетин (1,5 мкг/мл) и тетрациклин (1,7 мкг/мл). Затем клетки инкубировались при постоянной температуре 30°C в течение су-

ток. Рост культуры на среде данного состава не наблюдался.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что при одновременной инкубации суспензии клеток *E.coli* К-12 с антибиотиками ингибиторами белкового синтеза хлорамфениколом и тетрациклином существенно изменяются их электрофизические свойства, в то время как значительного изменения ЭО параметров клеток при действии низких концентраций отдельно взятых изучаемых препаратов не выявлено. Полученные результаты изменения величины ЭО сигнала при одновременной инкубации клеток *E.coli* К-12 с хлорамфениколом и тетрациклином могут быть объяснены синергидным действием использованных антибиотиков, поскольку известно, что при совместном применении ряда антибиотиков происходит усиление антимикробного эффекта по сравнению с действием отдельно взятых препаратов. Синергизм при воздействии хлорамфеникола и тетрациклина на одну и ту же микробную клетку может быть обусловлен влиянием одного из антибиотиков на транспорт в клетку другого. Заметим, что тетрациклин в концентрации 1,7 мкг/мл и хлорамфеникол в концентрации 1,5 мкг/мл практически не оказывали влияние на величину ЭО сигнала клеток.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования метода ЭО анализа клеточных суспензий для изучения синергидного воздействия антибиотиков на бактериальные клетки и определения их чувствительности к антибиотикам. В том числе показана эффективность электрофизических методов анализа микробных клеток для регистрации синергидного антимикробного эффекта антибиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бриан Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам. М.: Медицина, 1984; 124–135. / Brian L.E. Bakterial'naja rezistentnost' i chuvstvitel'nost' k himiopreparatam. M.: Medicina, 1984; 124–135. [in Russian]
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 1986; 528. / Egorov N.S. Osnovy uchenija ob antibiotikah. M.: Nauka, 1986; 528. [in Russian]
3. Сазыкин Ю.О., Навашин П.С. Антибиотики и оболочка бактериальной клетки. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Серия Биотехнология. М.: 1991; 31: 128–149. / Sazykin Ju.O., Navashin P.S. Antibiotiki i obolochka bakterial'noj kletki. Itogi nauki i tehniki. VINI-TI. Serija Biotehnologija. M.: 1991; 31: 128–149. [in Russian]
4. Ignatov O.V, Guliy O.I., Shchyogolev S.Yu., Bunin V.D., Ignatov V.V. Effect of *p*-nitrophenol metabolites on microbial-cell electro-optical characteristics. FEMS Microbiol Lett 2002; 214: 81–86.
5. Мирошников А., Фомченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. М.: Наука, 1986; 109–143. / Miroshnikov A., Fomchenkov V.M., Ivanov A.Ju. Jelektrofizicheskiy analiz i razdelenie kletok. M.: Nauka, 1986; 109–143. [in Russian]
6. Bunin V.D., Voloshin A.G. Determination of cell structures, electrophysical parameters, and cell population heterogeneity. J Colloid Interface Sci 1996; 180: 122–126.
7. Bunin V.D., Voloshin A.G., Bunin, Z.F., Shmelev V.A. Electrophysical monitoring of culture process of recombinant *Escherichia coli* strains. Biotechnol Bioengineer 1996; 51: 720–724.
8. Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981; 1: 347–358. / Marshall Je. Biofizicheskaja himija. M.: Mir, 1981; 1: 347–358.
9. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. М.: Медицина, 1982; 183–197; 237–242. / Navashin S.M., Fomina I.P. Racional'naja antibiotikoterapija. M.: Medicina, 1982; 183–197; 237–242. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гулий Ольга Ивановна — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова; ведущий научный сотрудник Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института Российской академии наук, Саратов. E-mail: guliy_olga@mail.ru.

Бунин Виктор Дмитриевич — д.т.н., научный руководитель фирмы EloSystem GbR, Берлин, Германия

Ларионова Ольга Сергеевна — д.б.н., заведующий кафедрой микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Жничкова Елена Григорьевна — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Игнатов Олег Владимирович — д.б.н., заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук Саратов

Балко Александр Богданович — к.б.н., научный сотрудник отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина