

Метод электрооптического анализа для регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки

О. И. ГУЛИЙ^{1,2,3}, В. Д. БУНИН⁴, 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

Electrooptical Assay for Record of Antibiotic Action on Microbial Cells

O. I. GULIY^{1,2,3}, V. D. BUNIN⁴, 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

Одним из наиболее востребованных направлений в микробиологии является разработка быстрых и чувствительных методов определения устойчивости микробных клеток к антибактериальным препаратам. В работе рассмотрено решение этой проблемы при помощи метода электрооптического анализа, основанного на изменении электрофизических свойств суспендированных бактериальных клеток при воздействии на них антибиотиков с разным механизмом действия. Продемонстрирована возможность определения чувствительности микробных клеток к антибактериальным препаратам и определения их антибактериальной активности. Представленные результаты демонстрируют перспективность использования метода электрооптического анализа для решения вопросов антибиотикочувствительности микробных клеток для применения в микробиологии, медицине, ветеринарии.

Ключевые слова: *Escherichia coli; электрооптические характеристики клеточных суспензий, антибактериальные препараты.*

Development of rapid and sensitive procedures for determination of microbial resistance to antibiotics is one of the most urgent trends in microbiology. The problem is shown to be solved by using electrooptical assay based on change of the electrophysical properties of suspended bacterial cells exposed to antibiotics with different mechanisms of action. Possible determination of the microbial cell susceptibility to antibiotics and their antibacterial activity is demonstrated. The results showed the procedure of electrooptical assay to be prospective in solving the problem of the microbial cells antibiotic susceptibility in microbiology, medicine and veterinary.

Key words: *Escherichia coli, electrooptical characteristics of cell suspensions, antibacterial agents.*

Введение

Изучение адаптации микробов к действию антибиотиков является важной медико-биологической проблемой, поскольку появление резистентных форм микроорганизмов приводит к снижению их терапевтических свойств. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам является одним из диагностических методов, широко применяемым в терапии инфекционных заболеваний. Чувствительными к антибиотикам считаются те микроорганизмы, на которые испытуемый антибиотик оказывает бактериостатическое или бактерицидное действие. Мерой чувствительности микроорганизмов к антибиотикам является минимальная концентрация препарата,

подавляющая рост микроорганизма при стандартных условиях опыта.

В настоящее время для определения чувствительности микробов к антибиотикам используют стандартные методы диффузии в агар с применением дисков, методы серийных разведений, а также модификации этих стандартных методик [1]. Кроме того, созданы автоматизированные системы для определения антибиотикочувствительности бактерий. В одних системах автоматизированы только операции разведения и инкубации, тогда как рост бактерий определяется традиционными методами. В других системах все начальные операции выполняются вручную и автоматизированы лишь этапы считывания и регистрации результатов. Некоторые системы автоматизации предусматривают создание программ для всех операций, используемых в определении (приготовление образца и бактериального посевого

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: E-mail: gulyi_olga@mail.ru

материала, инкубация, считывание результатов и их регистрация) [2, 3].

Анализ технологий, используемых для определения антибиоточувствительности бактерий, например с помощью микробных биосенсорных систем [4–7], при помощи ВАСТЕС радиометрического метода [8], показывает, что основные проблемы данных методов состоят в сборе и подготовке образца, длительности получения результата, устранении ложноположительных результатов. Поэтому проблема разработки и развития новых технологий и методов определения чувствительности бактерий к действию антимикробных препаратов весьма актуальна для микробиологии, медицины и ветеринарии.

Действие антибиотиков может быть обусловлено различными факторами, которыми могут являться угнетение синтеза клеточной стенки,

ингибирование процессов синтеза белка и/или РНК, репликации ДНК, нарушение функционирования мембран. Некоторые антибиотики, представляющие собой отдельный класс данных соединений, являются антиметаболитами, действующими по типу конкурентных ингибиторов [3]. В результате воздействия антибиотиков на микробные клетки могут происходить изменения морфологии клеток, деструкция клеточной мембраны, изменения цитоплазматической мембраны и последующие нарушения биохимических процессов в этих клеточных структурах.

Общие теории действия лекарственных веществ основываются на представлении о связывании веществ со специфическим рецептором (часто мембранным белком), вызывающим биохимический отклик [9]. В результате происходит ускорение или замедление определённой реакции обмена

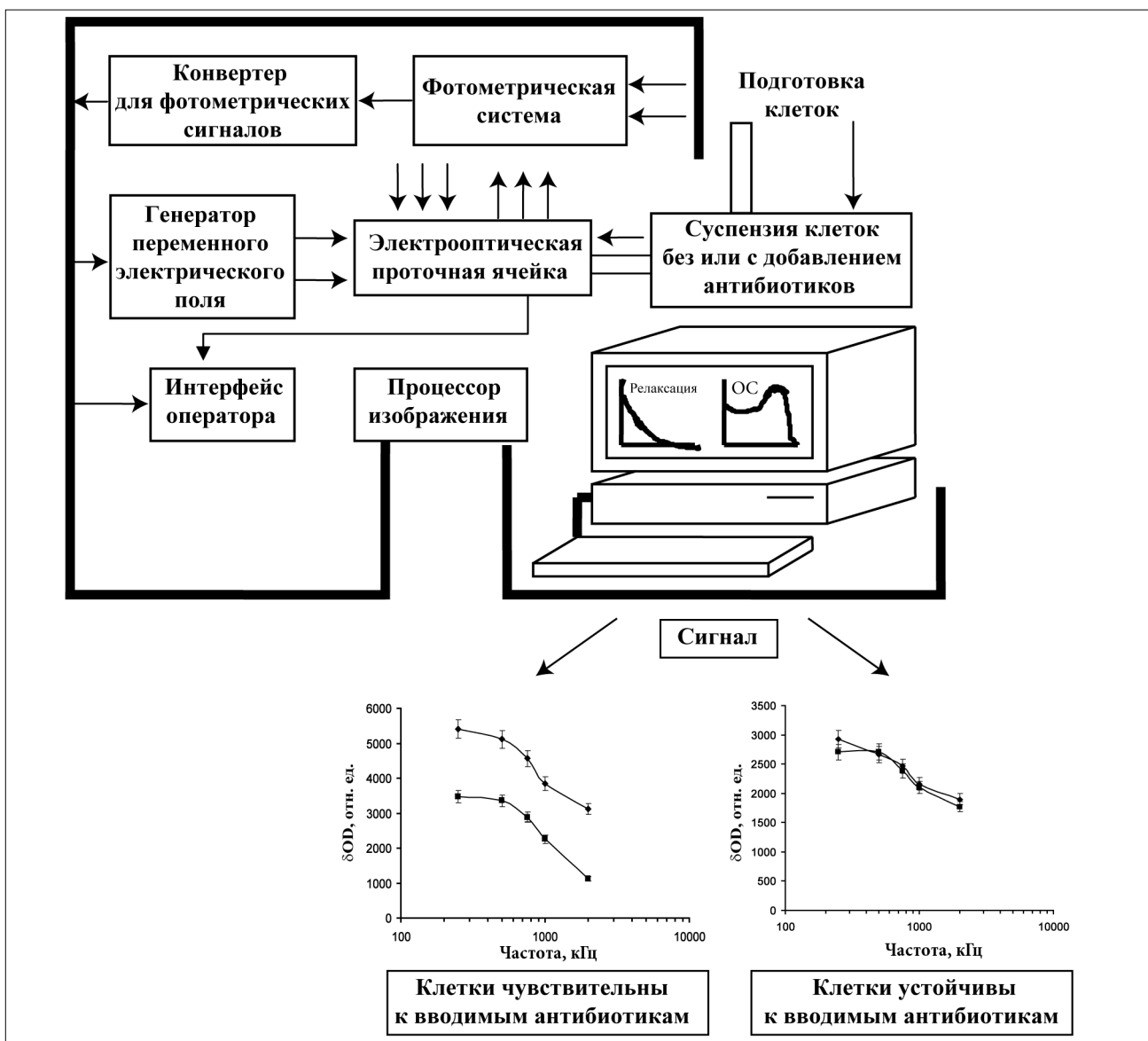


Рис. 1. Общая схема ЭО анализатора и проведения анализа.

или изменение проницаемости мембран по отношению к специфическим ионам или молекулам. Это, в свою очередь, может приводить к изменению электрофизических свойств микробных клеток, под которыми в данной работе подразумеваются удельная проводимость и диэлектрическая проницаемость клеточных структур.

Методы электрофизического анализа, основанные на исследовании клеток как электрофизических объектов со сложной структурой и измерении характеристик клеточных структур, представляют собой новый подход к оценке прижизненных физиологических параметров клеток и их гетерогенности [10—11]. Основными направлениями развития новых методов определения антибиотикочувствительности микробных клеток является использование метода электрооптического (ЭО) анализа. С помощью регистрации изменений ЭО характеристик клеточных суспензий можно сделать предварительные заключения о наличии (или отсутствии) устойчивости к данному антибиотику у исследуемых клеток.

Интегральным параметром, который охватывает все эти характеристики клеточных структур, является частотная дисперсия поляризуемости клетки (зависимость величины индуцированных зарядов от частоты электрического поля). В электрооптических измерениях этот параметр определяется прямым методом по изменению оптической плотности суспензии при воздействии на неё электрического поля и называется «ЭО сигнала или ЭО характеристики клеток».

Возможность применения метода ЭО анализа микробных клеток для определения их чувствительности к антибактериальным препаратам является актуальной и будет рассмотрена в данной работе. На основе собственных экспериментальных данных будут обобщены ранее полученные результаты и показаны области применения метода, в которых он является конкурентоспособным по сравнению с другими методами аналогичного назначения.

Идея экспериментов с использованием ЭО анализатора основана на том, что электрофизические свойства клеток после их взаимодействия с антибактериальными препаратами будут меняться, вызывая соответствующие изменения физических параметров клеточной суспензии, что позволит сделать заключение о чувствительности клеток к антибиотику.

В работе использованы представители разных классов антибиотиков с различными механизмами воздействия на микробные клетки: ампициллин, канамицин, хлорамфеникол, тетрациклин.

Поскольку перечисленные группы антибиотиков активны в отношении ряда грамотрицательных палочек, в качестве объекта исследования использовались микробные клетки *Escherichia coli*.

Материал и методы

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* штаммов К-12, К-12 (pUC18), pMMB33, pBR325, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, (Саратов).

Микробные клетки *E.coli* всех используемых штаммов 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.

Перед проведением анализа клетки отмывали трёхкратным центрифугированием при 2800×g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве дистиллированной воды (электропроводность 1,8 μS/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 D_{670} для каждого вида использованных микроорганизмов до 0,4—0,42.

Измерения проводились на электрооптическом анализаторе ELUS, разработанном в Государственном научном центре при-

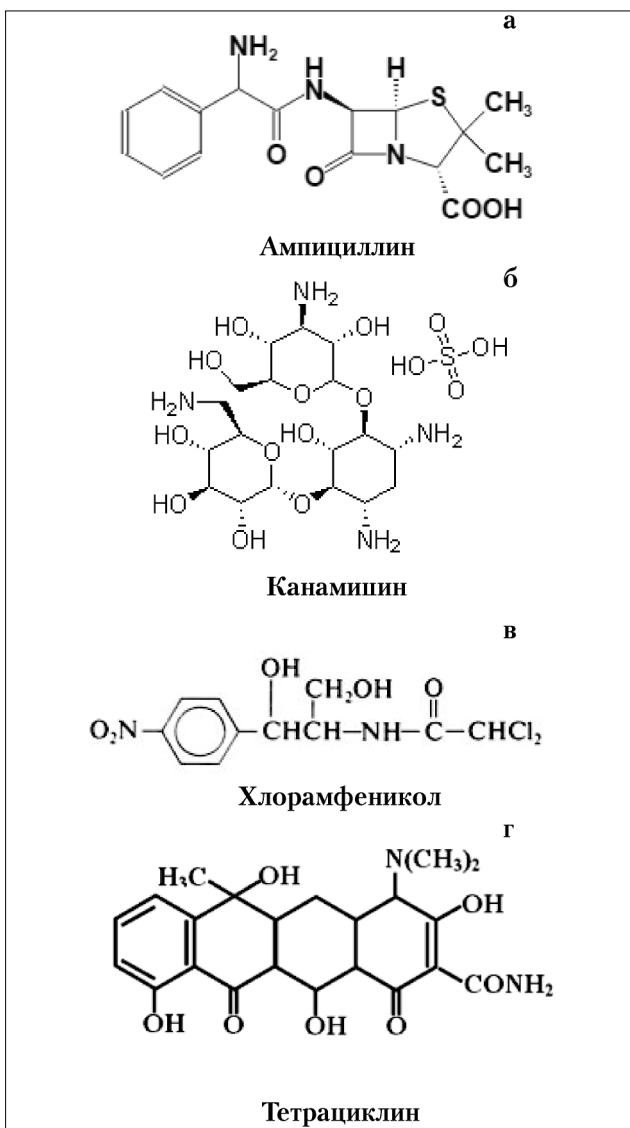


Рис. 2. Структурные формулы антибиотиков. а — ампициллин; б — канамицин; в — хлорамфеникол; г — тетрациклин.

кладной микробиологии (Оболенск, Моск. обл.) при длине волны света 670 нм (относительно вакуума) по методике [10]. Общая схема анализатора и проведения экспериментов представлены на рис. 1. Использовали дискретный набор частот ориентирующего электрического поля: 10, 52, 104, 502, 1000, 5020, и 10 000 кГц. Ориентационный спектр (ОС) представлялся в виде зависимости разности значений оптической плотности суспензий (δOD) на длине волны 670 нм от частоты действующего электрического поля при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля. Эта разность была нормирована по значению оптической плотности при 670 нм для хаотически ориентированных клеток. Для измерений использовались относительные единицы, которые с точностью до константы, равной примерно $1-5 \times 10^{-32}$, соответствовали анизотропии поляризуемости частиц с размерностью Φ/m^2 .

Все анализы проводились, по крайней мере, в пяти повторностях, и результаты представлены в виде средних значений, полученных с указанием стандартного отклонения. Относительная погрешность результатов измерений стандартных образцов составляла $\pm 3\%$.

В работе использовали следующие антибактериальные препараты: ампициллин (Sigma, США); канамицин (Sigma, США); хлорамфеникол (AppliChem, Германия); тетрациклин (AppliChem, Германия).

Структурные формулы использованных антибиотиков представлены на рис. 2.

Результаты исследования

1. Влияние β -лактамовых антибиотиков на электрооптические свойства микробных суспензий *E.coli*. Ампициллин ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$) относится к группе β -лактамовых антибиотиков и получается ацелированием 6-аминопенициллановой кислоты аминифенилуксусной кислотой. Активность β -лактамовых антибиотиков в значительной степени определяется их способностью взаимодействовать с клеточной поверхностью и изменять барьерные свойства цитоплазматической мембраны [2, 12].

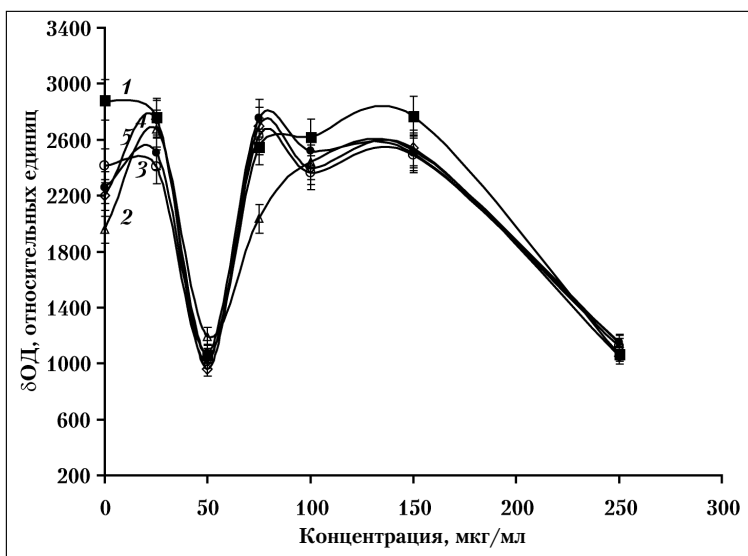


Рис. 3. Динамика изменения величины $\delta OD_{\text{контроль}} - \delta OD_{\text{эксперимент}}$ при частоте ориентирующего поля 52 кГц клеток *E.coli* K-12, инкубированных в дистиллированной воде с разными концентрациями ампициллина.

1 – 5 мин; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 5 – 150 мин.

Нами изучались электрофизические свойства микробных клеток *E.coli* чувствительного (K-12) и резистентного K-12 (pUC18) штаммов к ампициллину. Для этого в суспензию клеток *E.coli* штамма K-12, подготовленных для ЭО измерений, добавляли ампициллин до конечной концентрации 25, 50, 75, 100, 150 и 250 мкг/мл и инкубировали при 30°C в течение 5, 15, 30, 60 и 150 мин. Из представленных на рис. 3 данных видно, что изменения в ОС суспензий клеток K-12, инкубированных с различными концентрациями антибиотика, имели место на первых пяти частотах ориентирующего электрического поля (10–1000 кГц). На более высоких частотах существенных изменений не отмечено. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина $\delta OD_{\text{контроль}} - \delta OD_{\text{эксперимент}}$ при частоте ориентирующего поля 52 кГц. Максимальное уменьшение величины ЭО сигнала происходит при концентрации ампициллина 50 мкг/мл, при этом с увеличением концентрации антибиотика изменения в ОС суспензий не зависели от времени воздействия. Считаем, что такая зависимость изменений величины ЭО сигнала связана с тем, что в зависимости от молекулярного механизма, антибиотики характеризуются бактерицидным и бактериостатическим действием. Ампициллин обладает бактерицидным действием, которое проявляется в концентрациях, в 2–10 раз превышающих бактериостатическое [12].

Бактериостатическое действие проявляется при действии низких концентраций β -лактамов, в результате чего клетки утрачивают способность к образованию перегородок в процессе деления, что препятствует процессу деления клеток и вызывает образование волокнистых бактерий. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток при использовании ампициллина в концентрации 25 мкг/мл, вероятно, обусловлено бактериостатическим действием антибиотика.

Бактерицидное действие ампициллина проявляется при увеличении концентрации антибиотика. При этом лизис клеток наступает за счёт того, что в момент деления клетки происходит деформация клеточной оболочки. В наших экспериментах бактериостатическая концентрация ампициллина (25 мкг/мл) была увеличена в 2 раза, в результате чего было показано значительное снижение величины ЭО сигнала при концентрации ампициллина 50 мкг/мл, что вероятно, связано с деформацией клеточной оболочки в момент деления клеток. При использовании высоких концентраций ампициллина

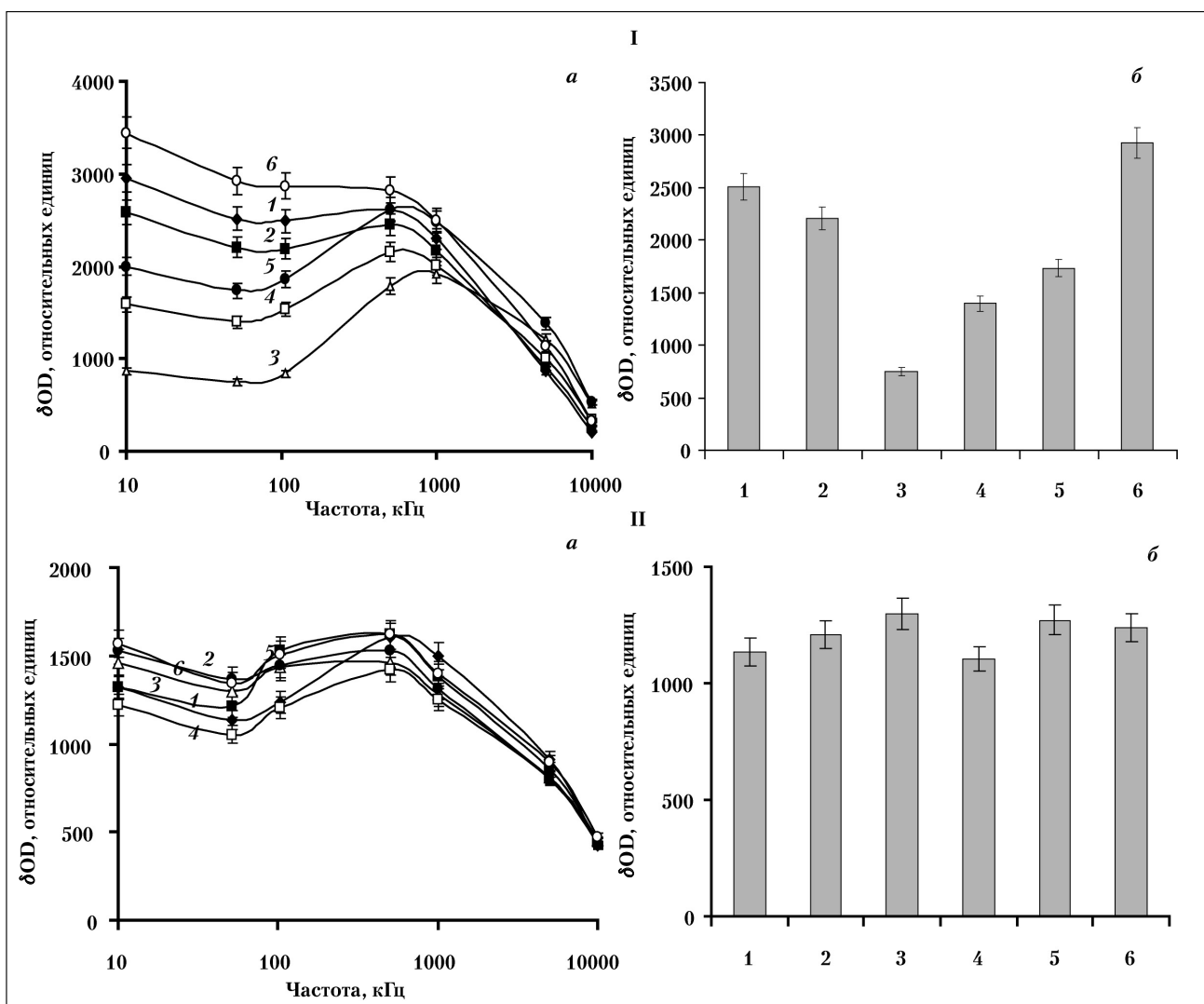


Рис. 4. Динамика изменения ОС (а) и изменение значений величины ЭО сигнала (б) при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензии клеток *E. coli* K-12 (I) и *E. coli* K-12 (pUC18) (II) при действии ампициллина (50 мкг/мл).

1 – клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 – экспозиция 5 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 150 мин.

гибель клеток наступает раньше, чем проявляется изменение их морфологических характеристик. При действии на клетки ампициллина в концентрации 75 мкг/мл, 100 мкг/мл и 150 мкг/мл наблюдалось постепенное увеличение величины ЭО сигнала в сравнении с используемой концентрацией антибиотика 50 мкг/мл. Полученные данные могут быть объяснены различным соотношением морфологически измененных и погибших клеток.

При воздействии на клетки ампициллина в концентрации 250 мкг/мл значительных изменений величины ЭО сигнала не зафиксировано, что, вероятно, связано с быстрой гибелью клеток при действии достаточно высоких концентраций антибиотика.

При изучении динамики воздействия ампициллина (50 мкг/мл) на изменения ОС клеточной

суспензии показано (рис. 4 (I)), что изменения в ОС наступают уже через 5 минут после обработки клеток антибиотиком. Это может быть объяснено поглощением антибиотика клеточной стенкой, поскольку известно, что антибиотик поглощается клеткой в течение 2 мин [13]. Максимальное снижение величины ЭО сигнала наблюдается через 15 мин воздействия антибиотика, что, возможно связано с деформацией клеточной стенки. Через 30 мин воздействия антибиотика происходит увеличение ЭО сигнала. Это согласуется с литературными данными о том, что максимальная активность данного антибиотика наблюдается после 30 мин его воздействия [13].

При исследовании изменений ЭО параметров суспензии клеток антибиотикоустойчивого штамма *E. coli* K-12 (pUC18), обладающего плазмидой pUC18, несущей устойчивость к ампициллину,

было отмечено (рис. 4, II) незначительное увеличение величины ЭО сигнала после 5 мин инкубации с ампициллином. Однако, при дальнейшем воздействии ампициллина, существенных изменений ОС клеточной суспензии не происходит, что можно считать проявлением устойчивости данного штамма к действию ампициллина.

Увеличение величины ЭО сигнала через 5 мин инкубации обусловлено, вероятно, сорбцией антибиотика на клеточной поверхности, поскольку известно, что первый этап взаимодействия микроорганизмов с антибиотиком — адсорбция его клетками. Причем, ампициллин адсорбируется как чувствительными, так и устойчивыми к нему бактериями. Адсорбция происходит сразу же после внесения антибиотика в суспензию клеток, а процесс адсорбции ампициллина не зависит от концентрации антибиотика в среде [13].

Таким образом, при инкубации клеток ампициллиночувствительного штамма К-12 с ампициллином происходит значительное изменение величины ЭО сигнала. У микробных клеток ампициллиноустойчивого штамма К-12 (pUC18) существенных изменений ЭО параметров после инкубации с ампициллином не зафиксировано. Следовательно, зависимость ЭО сигнал клеток при действии ампициллина значительно отличается для чувствительных и резистентных штаммов *E.coli* [14].

2. Влияние аминогликозидных антибиотиков на электрооптические параметры микробных суспензий *E.coli*. Канамицин относится к аминогликозидным антибиотикам группы олигосахаридов. Основным механизмом его действия связан с нарушением белкового синтеза на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК на рибосомы. Канамицин способствует удержанию на рибосоме аминоацил-тРНК, не соответствующих кодону, установленному в А-участке рибосомы. В результате такого ложного кодирования синтезируются неправильные полипептиды с большим количеством ошибок, что и приводит к цитотоксическому (бактерицидному) эффекту на клетки [15].

При исследовании изменений ЭО параметров клеточной суспензии *E.coli* штамма К-12 при действии разных концентраций канамицина (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10, 15 и 20 мкг/мл) показано, что изменения в ОС суспензий клеток имели место на частотах ориентирующего электрического поля в интервале 10—1000 кГц. На более высоких частотах существенных изменений не отмечено. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала при

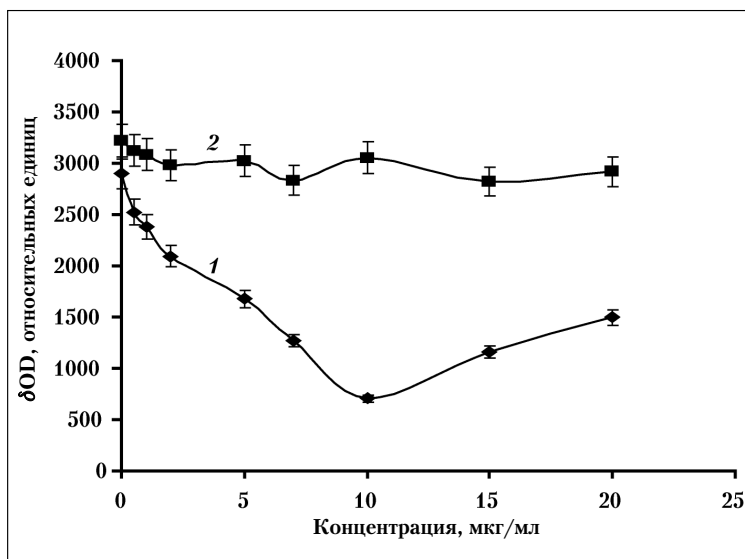


Рис. 5. Динамика изменения величины ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 52 кГц клеток *E.coli* К-12 (1) и *E.coli* К-12 (рММВ33) (2), инкубированных с разными концентрациями канамицина (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10, 15 и 20 мкг/мл).

частоте ориентирующего поля 52 кГц. Как видно из представленных данных (рис. 5, кривая 1), при добавлении к суспензии клеток указанных концентраций антибиотика происходит постепенное снижение величины ЭО сигнала, который достигает минимума при концентрации канамицина 10 мкг/мл. Механизм антимикробного действия канамицина связывают с подавлением белкового синтеза с последующим угнетением синтеза нуклеиновых кислот и нарушением образования клеточной стенки. Проникновение аминогликозидов через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий происходит через пориновые каналы, при этом вызывая частичную деструкцию мембраны и усиление проникновения аминогликозидов через этот барьер [16]. Таким образом, уменьшение величины ЭО сигнала клеток при концентрации канамицина 10 мкг/мл, обусловлено деструкцией мембраны клеток и бактерицидным действием антибиотика в отношении клеток *E.coli* штамма К-12.

Механизм устойчивости к канамицину обусловлен ферментативной инактивацией антибиотика в результате ацетилирования аминогруппы или фосфорилирования гидроксильной группы молекулы канамицина и определяется трансмиссивным R-фактором. В результате модификации канамицина ферментами бактерий происходит потеря активности антибиотика [3, 17]. При изучении изменений ЭО параметров клеточной суспензии канамициноустойчивого штамма *E.coli* рММВ33, обладающего плазмидой рММВ33, несущей устойчивость к канамицину, при действии

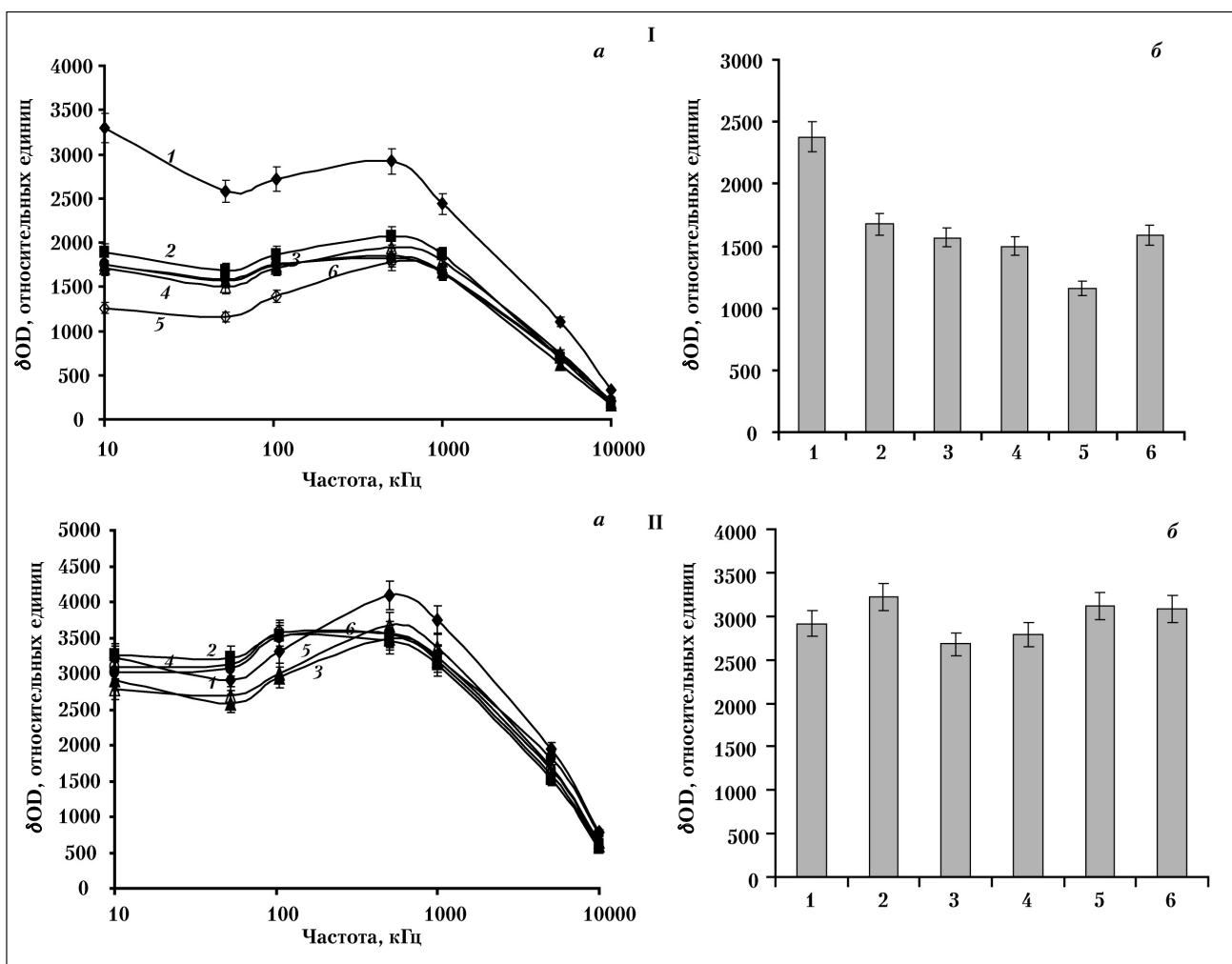


Рис. 6. Динамика изменений ОС (а) и величины ЭО сигнала (б) при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензий клеток *E. coli* К-12 (I) и *E. coli* К-12 (pMMB33) (II), инкубированных с канамицином (10 мкг/мл).

1 – клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 – экспозиция 5 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 150 мин.

разных концентраций канамицина (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10, 15 и 20 мкг/мл), продемонстрировано, что существенных изменений ОС клеточной суспензии при действии антибиотика не происходит (рис. 5, кривая 2). Полученные данные могут быть объяснены возможной инактивацией канамицина вследствие действия R-ферментов, фосфорилирующих канамицин, в результате чего происходит потеря активности антибиотика. Предположение согласуется с литературными данными, согласно которым, генетическая информация о синтезе R-ферментов контролируется генами, локализованными на хромосоме, плазидах или эписомах [2, 17]. В наших экспериментах использовался канамициноустойчивый штамм *E. coli* pMMB33, обладающих плазмидой pMMB33, несущей устойчивость к канамицину. Вероятно, генетическая информация о синтезе R-ферментов у микробных клеток данного штамма контролируется плазмидой pMMB33.

При изучении динамики изменений ОС клеток изучаемых штаммов при действии канамицина (10 мкг/мл) показано (рис. 6, I), что у микробных клеток канамициночувствительного штамма *E. coli* К-12 наблюдается уменьшение величины ЭО сигнала клеточной суспензии уже через 5 минут после обработки клеток антибиотиком. Это может быть объяснено частичной деструкцией клеточной мембраны и проникновением антибиотика в клетку. После 15 мин инкубации клеток с канамицином наблюдается дальнейшее постепенное уменьшение величины ЭО сигнала. Эти изменения величины ЭО сигнала клеточной суспензии естественно связать с отмеченными выше биохимическими процессами, происходящими в микробной клетке при действии канамицина и усилением проникновения антибиотика в клетку. Следовательно, регистрация изменений ЭО параметров клеточной суспензии К-12, происходящих при инкубации с канамици-

ном, может служить одним из показателей проникновения антибиотиков внутрь клетки штамма К-12 и его чувствительности по отношению к канамицину. У суспензии клеток канамициноустойчивого штамма *E.coli* рММВ33 при действии канамицина было отмечено незначительное увеличение величины ЭО сигнала после 5 мин инкубации с канамицином (рис. 6, II), при дальнейшей инкубации клеток с канамицином, существенных изменений ОС клеточной суспензии не происходит, что можно считать проявлением устойчивости данного штамма к действию канамицина.

Таким образом, показано, что зависимость ЭО эффекта микробных клеток при действии канамицина значительно отличается для чувствительных и резистентных штаммов *E.coli*. Изменения ОС суспензий при действии канамицина можно использовать в качестве теста устойчивости к данному антибиотику у исследуемых клеток [18].

3. Влияние хлорамфеникола на электрооптические свойства микробных суспензий *E.coli*. Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет использование метода ЭО анализа клеточных суспензий при воздействии на них хлорамфеникола, являющегося ингибитором белкового синтеза и обладающего бактериостатическим эффектом воздействия на микробные клетки. Хлорамфеникол (левомицетин) специфический ингибитор пептидилтрансферазной реакции, протекающей в рибосомах [12, 15]. Основным механизмом его действия связан с нарушением синтеза на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК на рибосомы. Считается, что хлорамфеникол, связываясь с 50S-субъединицей рибосом, инактивирует пептидилтрансферазную реакцию, катализирующую образование пептидной связи в рибосомной системе белкового синтеза [3, 15]. Хлорамфеникол является антибиотиком широкого спектра действия и активен в отношении большого числа грамотрицательных палочек, что позволяет в качестве объекта исследования использовать микробные клетки *E.coli*.

При воздействии разных концентраций хлорамфеникола (0,5, 1,5, 2,5, 3, 6, 12, 24, 35, 50, 70 и 140 мкг/мл) на микробные клетки штамма К-12 отмечено, что изменения в ОС суспензий клеток при действии различных концентраций антибиотика, имели место на первых пяти частотах ориентирующего электрического поля 10-1000 кГц. На более высоких частотах существенных изменений не отмечено. При использовании малых концентраций антибиотика (0,5, 1,5, 2,5 мкг/мл), значительных изменений ОС клеток не зафикси-

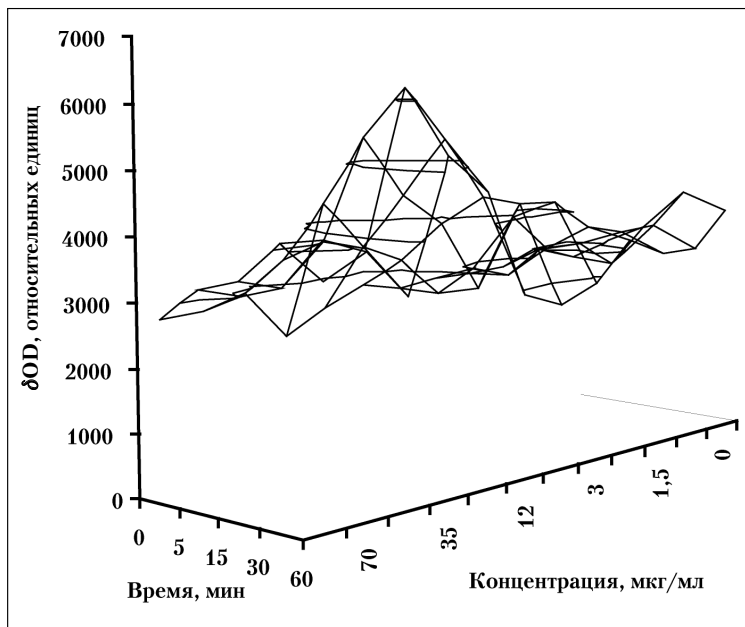


Рис. 7. Динамика изменения величины ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензии клеток *E.coli* К-12, при воздействии разных концентраций хлорамфеникола (0,5; 1,5; 2,5; 3,0; 6,0; 12; 24; 35; 50; 70 и 140 мкг/мл).

ровано. При увеличении концентрации хлорамфеникола (3, 6, 12, 24, 35 мкг/мл) регистрируются изменения величины ЭО сигнала (рис. 7). Для удобства представления экспериментальных данных использовали результаты исследования динамики изменений величины ЭО сигнала суспензий клеток *E.coli* К-12, при воздействии разных концентраций хлорамфеникола при частоте ориентирующего поля 52 кГц (рис. 7).

При изучении динамики изменений ОС клеток *E.coli* К-12 при действии хлорамфеникола в концентрации 35 мкг/мл показано (рис. 8, I), что после 5 мин воздействия антибиотика на микробные клетки происходит незначительное увеличение величины ЭО сигнала. После 15 и 30 мин инкубации клеток с хлорамфениколом происходит значительное увеличение величины ЭО сигнала. Дальнейшие изменения ЭО параметров клеточной суспензии незначительно зависят от времени воздействия антибиотика. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 52 кГц (рис. 8, б). Увеличение величины ЭО сигнала после 15 и 30 мин воздействия антибиотика на клетки может быть объяснено длительностью его воздействия, биохимическими процессами, отмеченными выше, происходящими в микробной клетке при действии хлорамфеникола, и выходом из клетки макромолекул.

При изучении динамики изменений ЭО параметров клеточной суспензии хлорамфениколоустойчивого штамма *E.coli* рBR325 при действии

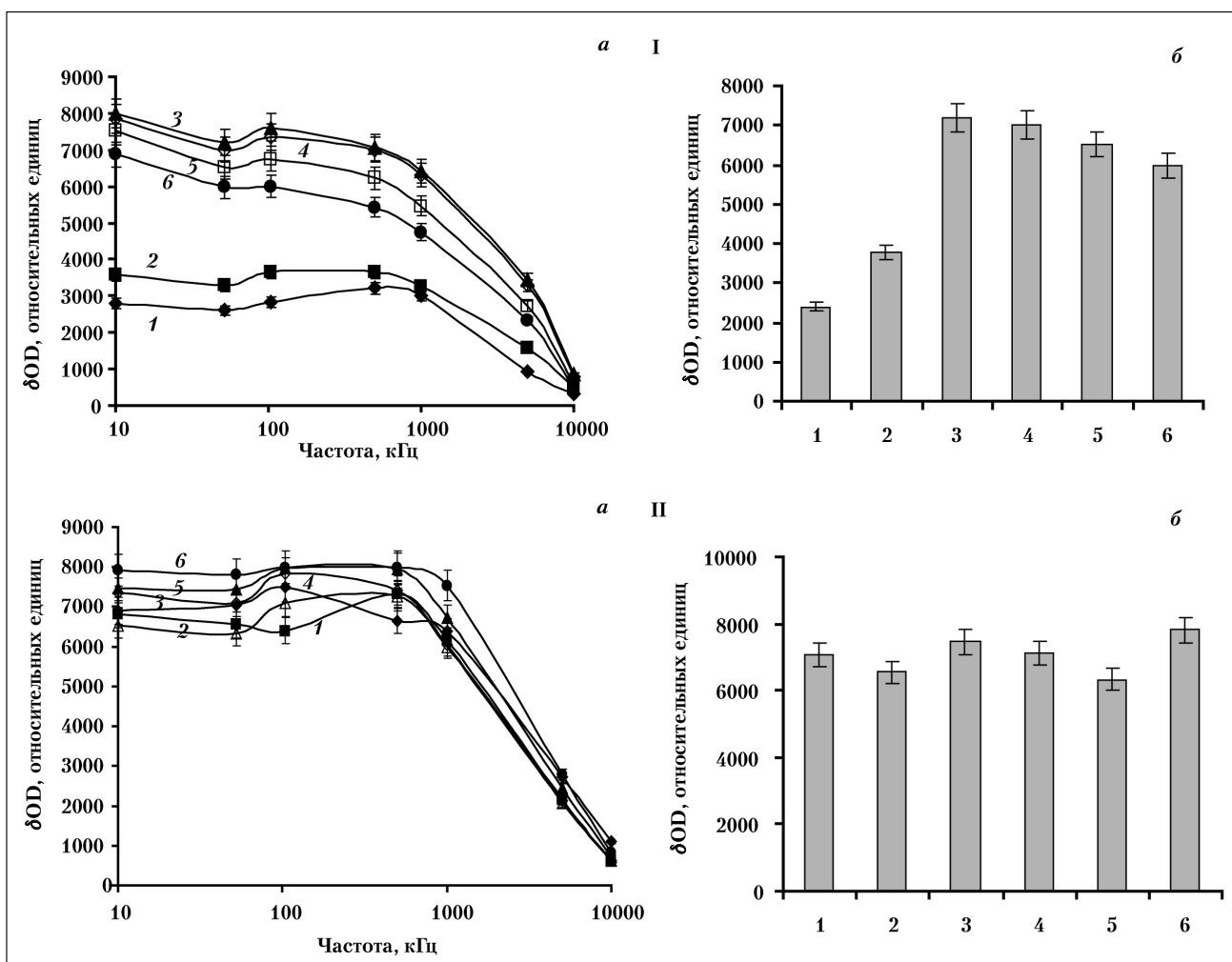


Рис. 8. Динамика изменений ОС (а) и величины ЭО сигнала (б) при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензии клеток *E. coli* К-12 (I) и *E. coli* К-12 (pBR325) (II) при воздействии хлорамфеникола (35 мкг/мл).

1 – клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 – экспозиция 5 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 150 мин.

хлорамфеникола (35 мкг/мл) показано, что изменения величины ЭО сигнала после воздействия антибиотика незначительны независимо от времени воздействия антибиотика (рис. 8, II).

Таким образом, исследовано влияние хлорамфеникола на электрофизические свойства клеток *E. coli* чувствительного К-12 и устойчивого pBR325 штаммов к действию данного антибиотика [19].

4. Влияние тетрациклина на электрооптические свойства микробных суспензий *E. coli*. Тетрациклин – антибиотик широкого спектра действия. Механизм его воздействия обусловлен ингибированием связывания аминоацил-тРНК с А местом рибосомы на 30S рибосомной субъединице [13, 16]. Тетрациклин обладает близкой активностью в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных палочек. В низких концентрациях он характеризуется бактериостатическим действием. Предварительно нами проводились эксперименты по оценке из-

менений ЭО характеристик микробных клеток *E. coli* К-12 при действии разных концентраций 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 *E. coli* К-12 при действии тетрациклина в концентрациях (1,7 и 5,0 мкг/мл) в течении 5, 15, 30, 60 и 150 мин. Показано (рис. 9), что при действии используемых концентраций тетрациклина во всем исследуемом временном диапазоне значительных изменений ЭО параметров клеточной суспензии *E. coli* К-12 не происходит. Полученные результаты могут быть объяснены ограничением проникновения антибиотика внутрь клетки. Поскольку известно, что внешняя мембрана грамотрицательных бактерий может до известной степени ограничивать проникновение тетрациклина в клетку [16].

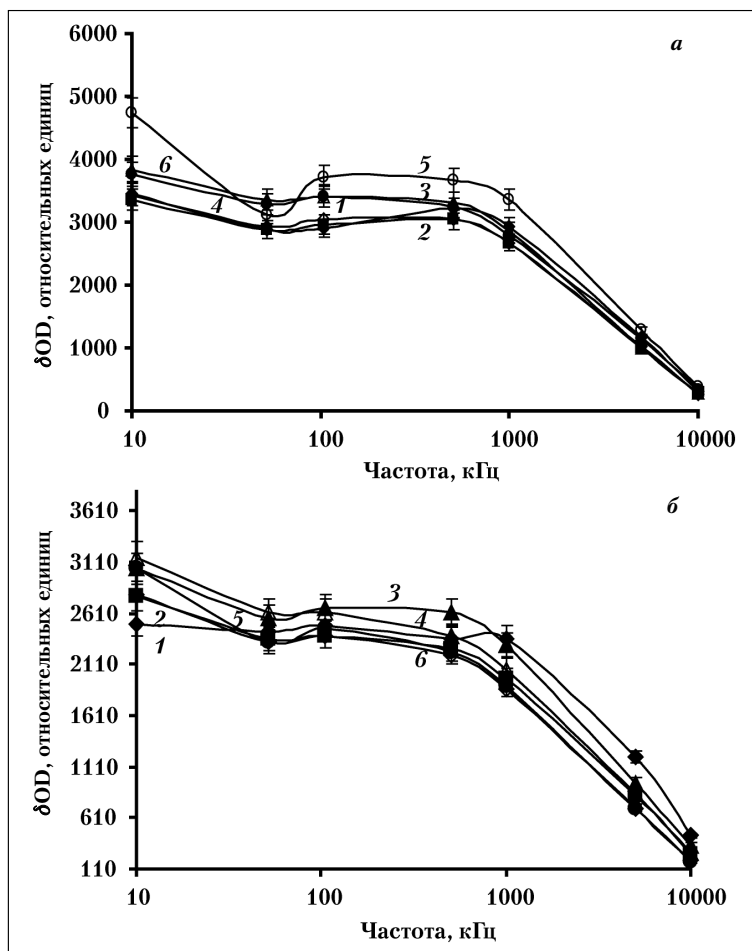


Рис. 9. Динамика изменения ОС суспензии клеток *E.coli* К-12 при действии разных концентраций тетрациклина (а) (1,7 мкг/мл), (б) 5,0 мкг/мл.

1 – клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 – экспозиция 5 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 150 мин.

Таким образом, тетрациклин в концентрациях 1,7 и 5,0 мкг/мл не действует на микробные клетки штамма К-12 и соответственно не фиксируются изменения ЭО параметров клеточных суспензий, т. е., микробные клетки *E.coli* К-12 являются устойчивыми к действию тетрациклина в используемых концентрациях [20].

Заключение

Таким образом, продемонстрированы возможности метода ЭО анализа микробных суспензий при воздействии антибиотиков с разным механизмом воздействия на микробные клетки. Показано, что зависимость ЭО сигнал суспензии клеток при действии антибиотиков ампицилли-

на, канамицина, хлорамфеникола и тетрациклина значительно отличается для клеток чувствительных и резистентных штаммов *E.coli*. Полученные данные могут быть использованы для создания нового метода определения чувствительности бактерий к действию антибиотиков с помощью электрооптического анализа клеточных суспензий. Для этого необходимо провести измерения ЭО параметров клеточных суспензий изучаемых штаммов после предварительно определенного времени воздействия антибиотиков в диапазоне активных концентраций антибиотика. На основании сравнения данных величины ЭО сигнала клеточных суспензий при действии антибиотика и контроля (суспензия клеток без антибиотика), можно сделать заключения о наличии устойчивости или чувствительности клеток изучаемого штамма.

В отличие от стандартных методов определения чувствительности бактерий к действию антибиотиков, использование метода ЭО анализа имеет ряд преимуществ, к которым относятся быстрота получения результата и относительная простота анализа, проведение анализа в минимальных объемах. Разрабатываемый подход может найти широкое применение в микробиологической, фармацевтической и биотехнологической промышленности, медицине и ветеринарии. Кроме того, описанный метод является прижизненным, не требует использования дополнительных меток или

химических компонентов, при этом воздействие на бактериальные клетки измерительной процедуры также незначительно. Метод является достаточно оперативным, т.к. время анализа составляет около ~10 мин, при этом процесс измерений может быть полностью автоматизирован. Описанный метод может дать полезную информацию и относительно биофизически аспектов воздействия антибактериальных препаратов на популяции микроорганизмов.

Таким образом, метод ЭО анализа является весьма перспективным для использования в микробиологии, медицине, ветеринарии для решения вопроса определения чувствительности микробных клеток к антибиотикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы общей бактериологии: Пер. с англ./ Под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир, 1984. / Metody obshhej bakteriologii: Per. s angl./ Pod red. F. Gerharda. M.: Mir, 1984. [in Russian]
2. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Gillespie SH, McHugh TD (eds.), Methods in Molecular Biology, vol. 642, Springer Science+Business Media, LLC 2010.

3. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. М.: Мир, 1985; 272. / Lanchini D., Parenti F. Antibiotiki. M.: Mir, 1985; 272. [in Russian]
4. Galindo E., Bautista D., Garcia J.L., Quintero R. Microbial sensor for penicillins using a recombinant strain of *Escherichia coli* // Enzyme Microbial Technology. 1990; 12: 9: 642–646.
5. Fleschin S., Bala C., Bunaciu A.A., Panait A., AboulEnein H.Y. Enalapril microbial biosensor. Preparat Biochem Biotechnol 1998; 28: 3: 261–269.

6. Galindo E., Lagunas F., Osuna J., Soberon X., Garcia J.L. A microbial biosensor for 6-aminopenicillanic acid. *Enzym Microb Technol* 1998; 23: 5: 331—334.
7. Antibiotic Resistance. Stephen H. Gillespie (ed.). *Method Mol Med* 2001; 48.
8. Cavalieri S. J., Biehle J. R., Sanders W. E. JR. Synergistic activities of clarithromycin and antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 7: 1542—1545.
9. Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981; 1: 347—358. / Marshall Je. *Biofizicheskaja himija*. М.: Mir, 1981; 1: 347—358. [in Russian]
10. Гулий О.И., Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Дыкман Л.А., Игнатов В.В., Игнатов О.В. Электрооптические свойства микробных суспензий при взаимодействии клеток с антителами различной специфичности. *Приклад биохим микробиол* 2010; 46: 1: 69—72. / Gulij O.I., Matora L.Ju., Burygin G.L., Dykman L.A., Ignatov V.V., Ignatov O.V. *Jelektroopticheskie svojstva mikrobnih suspenzij pri vzaimodejstvii kletok s antitelami razlichnoj specifichnosti. Priklad biохim mикrобиол* 2010; 46: 1: 69—72. [in Russian]
11. Gulij O.I., Bunin V.D., O'Neil D., Ivniiski D., Ignatov O.V. A new electro-optical approach to rapid assay of cell viability. *Biosensor Bioelectron* 2007; 23: 583—587.
12. Бриан Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам. М.: Медицина, 1984; 272. / Brian L.E. *Bakterial'naja rezistentnost' i chuvstvitel'nost' k himiopreparatam*. М.: Medicina, 1984; 272. [in Russian]
13. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Высшая школа, 2004; 528. / Egorov N.S. *Osnovy uchenija ob antibiotikah*. М.: Vysshaja shkola, 2004; 528. [in Russian]
14. Гулий О.И., Маркина Л. Н., Игнатов О.В., ШегOLEV С. Ю., Зайцева И. С., Бунин В.Д., Игнатов В.В. Влияние ампициллина на электрофизические свойства клеток *Escherichia coli*. *Микробиология* 2005; 74: 1: 126—131. / Gulij O.I., Markina L. N., Ignatov O.V., Shhegolev S. Ju., Zajceva I. S., Bunin V.D., Ignatov V.V. *Vlijanie ampicillina na jelektrofizicheskie svojstva kletok Escherichia coli*. *Микробиология* 2005; 74: 1: 126—131. [in Russian]
15. Спири́н А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высшая школа, 1986; 303. / Spirin A.S. *Molekuljarnaja biologija. Struktura ribosomy i biosintez belka*. М.: Vysshaja shkola, 1986; 303. [in Russian]
16. Сазыкин Ю.О., Навашин П.С. Антибиотики и оболочка бактериальной клетки. *Итоги науки и техники. ВИНТИ. Серия Биотехнология*. М.: 1991; 31: 187. / Sazykin Ju.O., Navashin P.S. *Antibiotiki i obolochka bakterial'noj kletki. Itogi nauki i tehniki. VINITI. Serija Biotehnologija*. М.: 1991; 31: 187. [in Russian]
17. Кудлай Д.Г., Чубуков В., Оганесян М. Генетика лекарственной устойчивости бактерий. М.: Медицина, 1972; 255. / Kudlaj D.G., Chubukov V., Oganessian M. *Genetika lekarstvennoj ustojchivosti bakterij*. М.: Medicina, 1972; 255. [in Russian]
18. Гулий О. И., Маркина Л. Н., Бунин В. Д., Игнатов В.В., Игнатов О. В. Исследование электрооптических параметров суспензий клеток *Escherichia coli* при действии канамицина. *Микробиология* 2008; 77: 3: 380—385. / Gulij O. I., Markina L. N., Bunin V. D., Ignatov V.V., Ignatov O. V. *Issledovanie jelektroopticheskikh parametrov suspenzij kletok Escherichia coli pri dejstvii kanamicina*. *Микробиология* 2008; 77: 3: 380—385. [in Russian]
19. Гулий О. И., Игнатов О. В., Маркина Л. Н., Бунин В. Д., ШегOLEV С. Ю., Игнатов В. В. Использование электрооптического анализа клеточной суспензии *Escherichia coli* для определения антибактериальной активности левомицетина. *Журн микробиол эпидемиол иммунол* 2006; 7: 12—16. / Gulij O. I., Ignatov O. V., Markina L. N., Bunin V. D., Shhegolev S.Ju., Ignatov V. V. *Ispol'zovanie jelektroopticheskogo analiza kletochnoj suspenzii Escherichia coli dlja opredelenija antibakterial'noj aktivnosti levomicetina*. *Zhurn mикrобиол jepidemiol immunol* 2006; 7: 12—16. [in Russian]
20. Гулий О.И., Бунин В.Д., Ларионова О.С., Потемкина Е.Г., Балко А.Б., Игнатов О.В. Изменение электрофизических свойств клеток *Escherichia coli* при действии левомицетина и тетрациклина. *Антибиотики и химиотер* 2016; 61: 1—2: 3—8. / Gulij O.I., Bunin V.D., Larionova O.S., Potemkina E.G., Balko A.B., Ignatov O.V. *Izmenenie jelektrofizicheskikh svojstv kletok Escherichia coli pri dejstvii levomicetina i tetraciklina*. *Antibiotiki i himioter* 2016; 61: 1—2: 3—8. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

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

Игнатов Олег Владимирович — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов