

Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий

А.Г.Волошин¹, В.Д.Бунин², В.В.Веревкин¹, С.Г.Игнатов¹

¹ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²EloSystems GbR, Henningsdorf, Germany

С помощью электрооптического анализа изучали воздействия на бактериальные клетки факторов, влияющих на жизнеспособность микроорганизмов, целостность их оболочек и внутриклеточный метаболизм. Показано, что повреждающие факторы (тепло, спирт, бактериофаг и грамицидин С) драматически меняют характерную для живых бактерий частотную дисперсию анизотропии поляризуемости, регистрируемую с помощью электрооптического метода. В то же время разобщитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол и наличие/отсутствие аэрации влияли на этот параметр не столь сильно. Полученные результаты позволяют рекомендовать электрооптический анализ для мониторинга состояния бактериальной культуры в биотехнологии.

Ключевые слова: электрооптический анализ, повреждающие факторы, *E. coli*

Для цитирования: Волошин А.Г., Бунин В.Д., Веревкин В.В., Игнатов С.Г. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий. Бактериология. 2017; 2(4): 46–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-46-49

Electro-optical analysis as a means to control external impacts on bacterial cells

A.G.Voloshin¹, V.D.Bunin², V.V.Verevkin¹, S.G.Ignatov¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

²EloSystems GbR, Henningsdorf, Germany

Factors influencing bacterial cells, the viability of microorganisms, their membrane integrity and intracellular metabolism were studied by using an electro-optical analysis. It is shown that adverse effects (heat, alcohol, bacteriophage and gramicidin C) dramatically change the frequency dispersion of polarizability anisotropy specific for living bacteria, which is registered by the electro-optical method. At the same time 2,4-dinitrophenol, uncoupling oxidative phosphorylation, as well as the presence/absence of aeration, do not affect the parameter so much. The obtained results allow us to recommend the electro-optical analysis for monitoring bacterial culture conditions in biotechnology.

Keywords: electro-optical analysis, damaging factors, *E. coli*

For citation: Voloshin A.G., Bunin V.D., Verevkin V.V., Ignatov S.G. Electro-optical analysis as a means to control external impacts on bacterial cells. Bacteriology. 2017; 2(4): 46–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-46-49

При выполнении биотехнологических процедур возникает потребность оценки физиологического состояния биологического материала, которое естественным образом меняется как в процессе культивирования, так и при дальнейших возможных операциях – концентрировании, сушке, хранении. Классические методы не всегда информативны (световая микроскопия) или требуют больших затрат времени (высевы с последующим анализом выросших культур).

Для корреспонденции:

Волошин Александр Григорьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0773
E-mail: voloshinag@mail.ru

Статья поступила 24.10.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

Современные приборные методы (масс-спектрометрия, ЯМР, атомная силовая микроскопия) очень дороги и не всегда адекватны поставленным задачам. В качестве одного из возможных подходов мы предлагаем использовать электрооптический анализ как метод контроля физиологического состояния клеток микроорганизмов.

В основе электрооптического метода лежит поляризация частиц, суспендированных в низкопроводящей жидкости

For correspondence:

Alexander G. Voloshin, PhD (Biol.), Senior Researcher of the Bionanotechnology Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0773
E-mail: voloshinag@mail.ru

The article was received 24.10.2017, accepted for publication 22.12.2017

под воздействием переменного электромагнитного поля. Это происходит вследствие появления индуцированных зарядов на поверхности частиц. Их распределение и величина определяются действующим механизмом поляризуемости [1, 2]. Объемный механизм поляризуемости характеризуется появлением индуцированных зарядов на границах раздела сред с различными комплексными диэлектрическими проницаемостями. Величина индуцированных на границах раздела зарядов пропорциональна напряженности электрического поля и зависит от соотношения комплексных диэлектрических проницаемостей структур. Для живой клетки, в том числе бактериальной, такими границами раздела являются поверхности соприкосновения цитоплазматической мембраны с внешней средой, а также мембраны с цитоплазмой. Роль клеточной стенки здесь минимальна, поскольку величина ее диэлектрической проницаемости практически совпадает с величиной диэлектрической проницаемости внешней среды.

Распределяясь по объему клетки, индуцированные заряды разных знаков образуют диполь. Диполь взаимодействует с электрическим полем и вызывает появление вращающего момента, который также пропорционален напряженности электрического поля. Появляется преобладающее направление ориентации клеток, причем степень их ориентации пропорциональна квадрату напряженности электрического поля.

Воздействие поля изменяет функцию распределения клеток по углам ориентации относительно исходной равновероятной. При этом происходит изменение всех оптических характеристик суспензии и, в частности, характера светорассеяния. Регистрация изменений оптической плотности оказывается технически наиболее простым методом количественной оценки этого процесса. Причиной изменения оптической плотности является изменение усредненного сечения рассеяния ориентированных клеток относительно усредненного сечения неориентированных клеток.

Использование электрооптического анализа в микробиологии началось в 80-х годах прошлого века [3, 4]. Тогда этот метод применялся для оценки выживаемости бактерий после экстремальных воздействий. Позднее с помощью электрооптики контролировали процесс культивирования [5]

и проводили идентификацию микроорганизмов [6, 7]. В настоящей работе электрооптический анализ используется для оценки состояния бактериальных клеток после некоторых внешних воздействий.

Внешние воздействия на бактериальные клетки – от условий культивирования до различных повреждающих факторов – приводят к изменению физико-химических параметров клеточных структур, что вызывает изменение поляризационных свойств клеток. Эти изменения регистрируются с помощью электрооптического метода.

Регистрируемым параметром является изменение оптических свойств суспензии бактериальных клеток под воздействием переменного электромагнитного поля в широком диапазоне частот. А оптические свойства суспензии напрямую связаны с поляризационными свойствами клеток. Поэтому анализируемым результатом электрооптических измерений является частотная дисперсия анизотропии поляризуемости (ЧДАП).

Объектом изучения были бактерии *Escherichia coli* K12 С600, которые подвергались разрушающим воздействиям (спирт, тепло), повреждающим воздействиям (антибиотик грамицидин С, бактериофаг) и воздействиям, влияющим на жизнедеятельность микроорганизмов (наличие/отсутствие аэрации, разобщение окислительного фосфорилирования посредством 2,4-динитрофенола (ДНФ)).

Материалы и методы

В работе использовались бактерии *Escherichia coli* K12 С600 и бактериофаг EcV18 из музея ГНЦ ПМБ.

Культуру бактерий выращивали в жидкой среде – L-бульон (10 г триптона; 5 г дрожжевого экстракта; 5 г хлористого натрия; дистиллированная вода – до 1 л) или на поверхности твердой среды – L-агар (L-бульон с добавлением 15 г сухого агара на 1 л среды).

При культивировании в жидкой среде бактерии для исследований отбирали в середине логарифмической фазы роста. Воздействие теплом заключалось в помещении бактерий в кипящую водяную баню на 5 мин.

Воздействие спиртом заключалось в суспендировании отмытых от среды роста клеток в 70% спирте с последую-

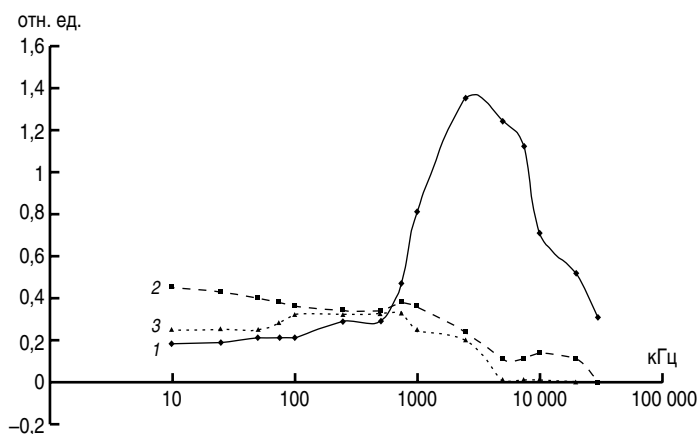


Рис. 1. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E.coli* K12 С600 под воздействием тепла и спирта: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие спирта; 3 – воздействие тепла.

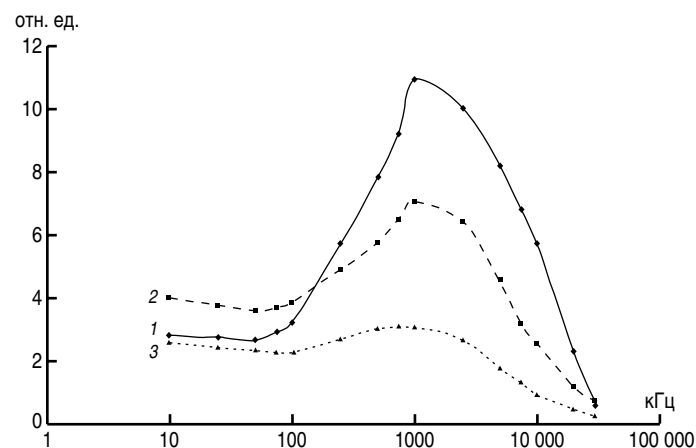


Рис. 2. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E. coli* K12 С600 под воздействием грамицидина С: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие грамицидина (5 мкг/мл); 3 – воздействие грамицидина (10 мкг/мл).

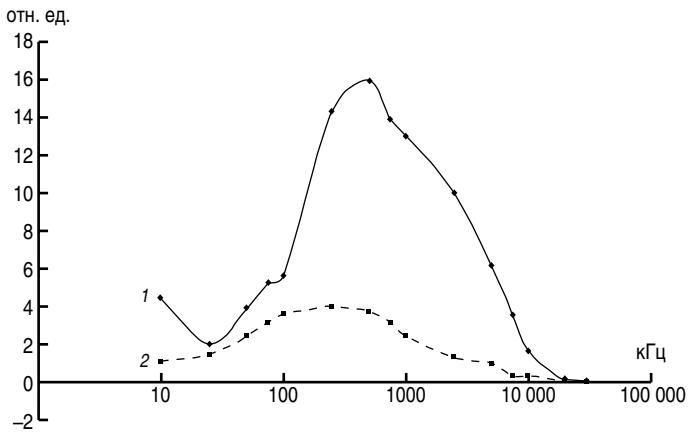


Рис. 3. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E. coli* K12 S600 под воздействием бактериофага EсV18: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие бактериофага.

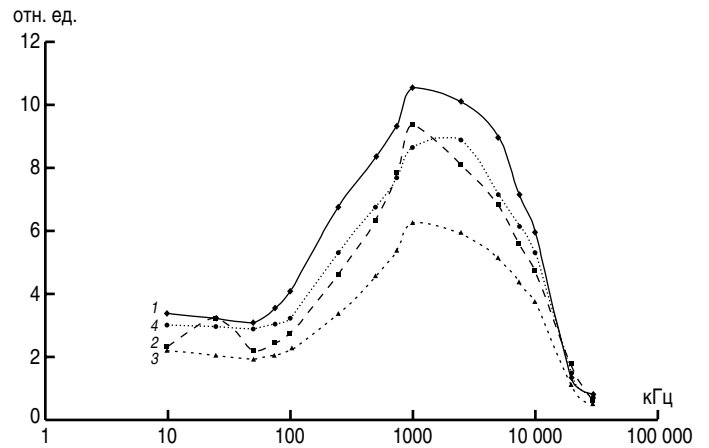


Рис. 4. Влияние аэрации на ЧДАП суспензии клеток *E. coli* K12 S600: 1 – исходная аэрация; 2 – через 20 мин после отключения аэрации; 3 – 50 мин после отключения аэрации; 4 – 35 мин после возобновления аэрации.

щей отмывкой и ресуспендированием в дистиллированной воде.

Антибиотик грамицидин С добавляли в среду культивирования за 15 мин до отбора пробы. Предварительно оттитрованный бактериофаг V18 добавляли в процессе культивирования за 30 мин до отбора пробы (соотношение фаг/клетка составляло ~20/1).

Наличие/отсутствие аэрации определялось нахождением колбы с культурой микроорганизмов на качалке при 37°C либо в термостате при той же температуре без встряхивания.

Воздействие 2,4-динитрофенола осуществлялось путем инкубации отмывших от среды роста клеток с этим веществом в течение 30 мин.

Контрольные и экспериментальные пробы отмывались от среды роста или инкубации на фильтре Millipor (диаметр пор – 0,45 мкм) в дистиллированной воде и в виде суспензии в этой воде с оптической плотностью 0,1 ($\lambda = 660$, $L = 10$ мм) использовались для электрооптических измерений.

Электрооптические измерения проводили с использованием установки ELBIC, разработанной в ГНЦ ПМБ. Это устройство позволяет регистрировать ЧДАП в диапазоне частот электрического поля от 10 кГц до 30 МГц, при напря-

женностях от 2 В/см до 15В/см и временах импульса от 1 сек до 120 сек. Источником света ($\lambda = 660$) является светодиод. В наших экспериментах использовался весь диапазон частот при напряженности поля 10 в/см и длительности импульса 2 с.

Результаты и обсуждение

Для определения возможных границ использования электрооптического анализа в микробиологии были получены ЧДАП нативных клеток *Escherichia coli* K12 S600 и клеток, подвергнутых разрушительному воздействию тепла и спирта. Разрушающее воздействие тепла и спирта (высевы показали снижение числа жизнеспособных клеток в обоих случаях на три порядка) приводит к исчезновению высокочастотного максимума на ЧДАП (рис. 1). Это указывает на то, что в основе бактерицидного действия и тепла, и спирта лежит нарушение целостности бактериальной мембраны.

Также нарушает целостность бактериальной мембраны и грамицидин С, являющийся протонофором [8]. Его воздействие приводит к заметному уменьшению высокочастотного максимума (рис. 2).

Воздействие большого количества бактериофагов на микробную клетку (соотношение фаг/клетка >10) вызывает так называемый «лизис извне» [9]. Естественно, при этом происходит нарушение целостности мембран, что закономерно отражается на ЧДАП бактериальной суспензии (рис. 3).

Бактерии *Escherichia coli* являются факультативными анаэробами. Поэтому кислород не является необходимым компонентом окружающей среды для их выживания. Однако его наличие или отсутствие радикально влияют на клеточный метаболизм и его энергетику (рис. 4).

Несколько неожиданным оказалось влияние разобщителя окислительного фосфорилирования 2,4-ДНФ на ЧДАП суспензии клеток *Escherichia coli* S600. Воздействие 2,4-ДНФ приводит не к снижению, как при всех прочих воздействиях, а к увеличению высокочастотного максимума (рис. 5). Объяснение этому следует искать в различных механизмах действия 2,4-ДНФ и грамицидина С: в отличие от последнего, создающего реальный канал в липидной мембране,

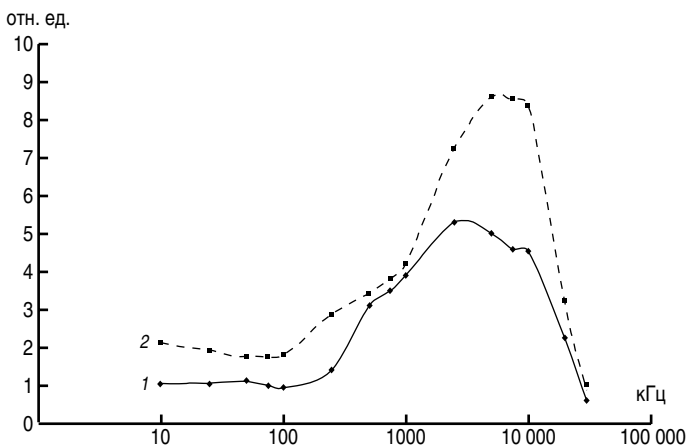


Рис. 5. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E. coli* R12 S600 под воздействием 2,4-ДНФ: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие 2,4-ДНФ.

2,4-ДФН является переносчиком протонов, встроенным в эту мембрану [10].

Таким образом, электрооптический анализ успешно регистрирует различные внешние воздействия на клетки микроорганизмов. При этом фиксируются как разрушительные и экстремально повреждающие воздействия, так и воздействия, лежащие в пределах физиологической нормы для данных микроорганизмов. Аналогичные или подобные воздействия испытывают клетки микроорганизмов в ходе биотехнологических процессов – культивирования, концентрирования, сушки и хранения. Ключевой структурой клеток, позволяющей электрооптике контролировать их состояние, является, по-видимому, бактериальная мембрана. Ее целостность и энергетический статус (трансмембранный потенциал, работа мембранных насосов и т.п.) очень чувствительны к внешним воздействиям. Одновременно эти параметры определяют наличие и величину высокочастотного максимума на ЧДАП, которая регистрируется с помощью электрооптического метода.

Литература

1. Игнатов СГ, Волошин АГ, Бунин ВД, Дятлов ИА. Электрооптический анализ в микробиологии. Серпухов: ФГУН ГНЦ ПМБ, 2007, 159 с.
2. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008 Oct 15;66(2):201-5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007
3. Швец НВ, Волошин АГ, Брезгунов ВН. Электрооптический метод оценки жизнеспособности микроорганизмов после сублимационной сушки. *Биотехнология*. 1987;3(4):528-31.
4. Лапыш МЕ, Игнатов СГ, Бунин ВД, Волошин АГ. Использование электрооптического метода для оперативного определения жизнеспособности бактериальных клеток. *Микробиология*. 1989;58(3):515-7.
5. Bunin VD, Voloshin AG, Bunina ZF, Shmelev VA. Electrophysical monitoring of cultivation process of recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996;51:720-724.
6. Bunin VD, Ignatov OV, Gulyi OI, Voloshin AG, Dykman LA, O'Neil D, Ivnitski D. Studies of *Listeria monocytogenes*-antibody binding using electro-orientation. *Biosens Bioelectron*. 2004 Jul 15;19(12):1759-61. DOI: 10.1016/j.bios.2003.12.027
7. Волошин АГ, Бунин ВД, Акимова ЛА, Игнатов СГ. Способ выделения и идентификации бактерий. Патент № 2431843.- 2011.
8. Овчинников ЮА. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987, 815 с.
9. Адамс М. Бактериофаги. М.: Иностранная литература, 1961, 527 с.
10. Jain A, Nishad KK, Bhowe NB. Effects of DNP on the cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces. *Biofouling*. 2007; 23(3-4):171-7. DOI: 10.1080/08927010701269641

References

1. Ignatov SG, Voloshin AG, Bunin VD, Dyatlov IA. Elektroopticheskiy analiz v mikrobiologii [Electro-optical analysis in Microbiology]. Serpukhov: SRCAMB, 2007, 159 p. (In Russian).

2. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008 Oct 15;66(2):201-5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007
3. Shvets NV, Voloshin AG, Brezgunov VN. Elektroopticheskiy metod otsenki zhiznesposobnosti mikroorganizmov posle sublimatsionnoi sushki. *Biotehnologiya (Biotechnology)*. 1987;3(4):528-31. (In Russian).
4. Ignatov SG, Voloshin AG, Bunin VD. An electro-optic technique used for the prompt determination of viable bacterial cells. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 1989;58(3):515-7. (In Russian).
5. Bunin VD, Voloshin AG, Bunina ZF, Shmelev VA. Electrophysical monitoring of cultivation process of recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996;51:720-724.
6. Bunin VD, Ignatov OV, Gulyi OI, Voloshin AG, Dykman LA, O'Neil D, Ivnitski D. Studies of *Listeria monocytogenes*-antibody binding using electro-orientation. *Biosens Bioelectron*. 2004 Jul 15;19(12):1759-61. DOI: 10.1016/j.bios.2003.12.027
7. Voloshin AG, Bunin VD, Akimova LA, Ignatov SG. Method of isolation and identification of bacteria. Patent №2431843, 2011. (In Russian).
8. Ovchinnikov YuA. Bioorganicheskaya khimiya [Bioorganic chemistry]. Moscow: "Prosveshchenie" Publ., 1987, 815 p. (In Russian).
9. Adams M. Bakteriofagi [Bacteriophages]. Moscow: "Inostrannaya literatura" Publ., 1961, 527 p. (In Russian).
10. Jain A, Nishad KK, Bhowe NB. Effects of DNP on the cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces. *Biofouling*. 2007; 23(3-4):171-7. DOI: 10.1080/08927010701269641

Информация об авторах:

Бунин Виктор Дмитриевич, доктор технических наук, Elosystems GbR
 Адрес: Henningsdorf, Germany
 E-mail: vikbun@inbox.ru

Веревкин Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и гено-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0773

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0773
 E-mail: ignatov@obolensk.org

Information about authors:

Viktor D. Bunin, Dr. Sci. (Tekh.), Elosystems GbR
 Address: Henningsdorf, Germany
 E-mail: vikbun@inbox.ru

Vladimir V. Verevkin, PhD (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0773

Sergey G. Ignatov, Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher of the Bionanotechnology Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0773
 E-mail: ignatov@obolensk.org