

В.А.Говорунова, И.Г.Говорунов, В.В.Фирстова, Е.В.Зырина

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ РОДА *YERSINIA* В ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ/РЕГИДРАТИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ**

*ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск*

Исследовано взаимодействие бромистого этидия с клетками авирулентных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* в лиофилизированных/регидратированных препаратах. Методом проточной цитофлуориметрии и при регистрации тотальной флуоресценции выявлена гетерогенность популяции по размерам частиц и содержанию в них нуклеиновых кислот. Показана корреляция между концентрацией колониеобразующих единиц в суспензии и приростом флуоресценции после добавки цетилтриметиламмонийбромида. Предложено использовать этот подход в качестве экспресс-метода оценки концентрации жизнеспособных клеток в лиофилизированных/регидратированных препаратах в процессе приготовления и хранения музейных штаммов, сухих живых вакцин и пробиотических препаратов грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, бромистый этидий, флуоресценция, жизнеспособность, цитометрия

V.A.Govorunova, I.G.Govorunov, V.V.Firstova, E.V.Zyrina

**Investigation of Ethidium Bromide Interaction with Yersinia Bacterial Cells in Lyophilized/Rehydrated Preparations**

*State Research Centre for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk*

Investigated was ethidium bromide interaction with the cells of avirulent *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* strains in lyophilized/rehydrated preparations. The population heterogeneity regarding particle size and concentration of nucleic acid was identified by flow cytometry and registration of total fluorescence intensity. Shown was the correlation between concentration of colony-forming units (CFU) and fluorescence increase after supplementing suspension with cetyltrimethylammoniumbromide. This approach was suggested as the express method to estimate viable cell count in lyophilized/rehydrated preparations and to control the process of preparing and storage of collection strains, dry live vaccine and probiotic preparations of gramnegative bacteria.

Key words: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, ethidium bromide, fluorescence, viability, cytometry.

В процессе приготовления и хранения лиофильно высушенных препаратов бактерий (вакцины, пробиотические препараты и др.) существует проблема контроля их качества, в частности, содержания (концентрации) жизнеспособных клеток. Аналогичная проблема имеет место при поддержании музейных коллекций бактериальных штаммов.

Для определения концентрации жизнеспособных бактерий в препаратах используют прямые и косвенные методы анализа. Прямые методы основаны на количественной оценке способности микроорганизмов расти и размножаться на питательных средах. Они трудоемки и продолжительны по времени (от суток до нескольких недель). Определенные сложности в анализ вносит наличие агрегатов клеток в суспензии и ее гетерогенность по физиологическому состоянию (субпопуляции неповрежденных, поврежденных и мертвых клеток). Косвенные методы анализа (биохимические, биофизические) основаны на тесной корреляции жизнеспособности бактериальной клетки с определенными ее свойствами: ферментативной активностью, целостностью оболочечного комплекса, морфологической структурой. Приборная регистрация нарушения нативности этих свойств позволяет достаточно быстро (минуты), точ-

но и воспроизводимо определять этот параметр [4].

Ряд экспресс-методов определения концентрации жизнеспособных клеток бактерий в суспензии основан на регистрации изменения флуоресценции бромистого этидия. В частности, известны способы определения общей концентрации бактерий в суспензии [3, 7] и метод оценки концентрации жизнеспособных клеток бактерий после замораживания-оттаивания [11]. В основе метода лежит свойство бромистого этидия связываться с нуклеиновыми кислотами, что сопровождается значительным приростом интенсивности флуоресценции [9]. В растворе нуклеиновых кислот эта реакция происходит за доли секунды. Интактные клетки грамотрицательных бактерий непроницаемы для молекул красителя вследствие барьерных свойств оболочечного комплекса. Разрушение этого барьера детергентами (третон X-100, цетилтриметиламмоний бромид) или комплексами двухвалентных катионов (этилендиаминтетраацетат), криовоздействием обеспечивает доступ молекул красителя к внутриклеточным нуклеиновым кислотам, что сопровождается дополнительным возрастанием флуоресценции [1, 2, 5].

Целью работы было изучение взаимодействия бромистого этидия с лиофильно высушенными/регидратированными бактериальными штаммами рода

*Yersinia* и оценка возможности разработки экспресс-метода определения концентрации жизнеспособных бактерий в этих препаратах.

### Материалы и методы

В работе использовали лиофилизированные препараты различных сроков хранения: 10 природных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и 7 авирулентных штаммов *Yersinia pestis*. В качестве защитной среды использовали сахарозо-желатиновую среду.

Анализ препаратов проводили следующим образом. Лиофильно высушенный препарат бактерий регидратировали 1–6 мл физраствора. В регидратированном образце определяли концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ) высевом на соответствующие плотные питательные среды (агар Хоттингера для *Y. pseudotuberculosis*, питательная среда для культивирования чумного микроба сухая (ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) – для *Y. pestis*). Параллельно измеряли флуоресценцию на спектрофлуориметре Perkin-Elmer 1000 при следующих условиях:  $\lambda_{\text{возб.}} = 322 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{рег.}} = 620 \text{ нм}$ , кварцевая кювета объемом  $4 \text{ см}^3$  и длиной оптического пути 1 см.

Цитометрический анализ образцов проводили на цитофлуориметре BD FACSCalibur. Аликвоту для анализа отбирали после завершения измерения флуоресценции в точке 4 (рис. 1) и разводили физраствором в 2–3 раза. Для обработки данных и построения графиков использовали программный комплекс CellQuest. В анализ брали 30000 частиц, которые гейтировали по боковому и прямому светорассеянию. События анализировали из установленного гейта в каналах флуоресценции F12 (585/42) и F13 (670/LP). Для построения трехмерных графиков использовали флуоресценцию, отражающую количество нуклеиновых кислот в частице и прямое светорассеяние, отражающее ее размер [8].

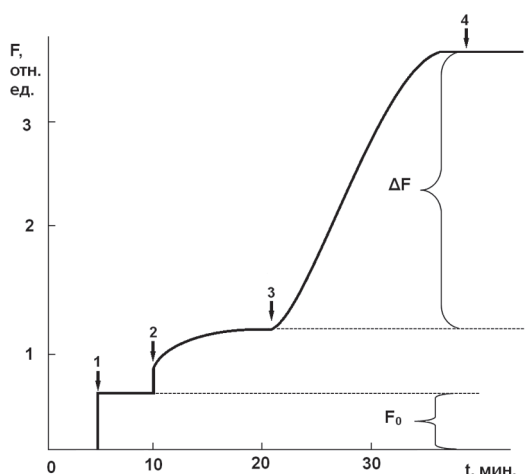


Рис. 1. Взаимодействие лиофилизированных/регидратированных клеток *Y. pestis* с бромистым этидием:

$\lambda_{\text{возб.}} = 322 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{рег.}} = 620 \text{ нм}$ . Кварцевая кювета с длиной оптического пути 1 см. Стрелками показаны моменты внесения в измерительную кювету: 1 – 3 мл раствора бромистого этидия ( $2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ ) на физрастворе, забуференном трис-НСl (рН 7,05); 2 – 100 мкл исследуемой суспензии клеток; 3 – 30 мкл 10 % раствора цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ)

В случае работы с микроорганизмами I–II групп патогенности необходимо выполнять требования режима биологической безопасности [6]

Статистический обсчет результатов и построение графиков проводили с помощью компьютерных программ OpenOffice.org Calc 3.2.1. и MS Excel 7.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены данные флуориметрических измерений суспензии клеток *Y. pestis* в растворе бромистого этидия.

Из представленных данных следует, что после внесения клеток в раствор бромистого этидия наблюдается скачкообразный подъем интенсивности флуоресценции. Далее следует фаза экспоненциального нарастания флуоресценции до постоянного уровня. Внесение детергента приводит к добавочному приросту флуоресценции. Первоначальный скачок флуоресценции (2), по-видимому, обусловлен связыванием красителя с нуклеиновыми кислотами клеток с поврежденным барьером проницаемости. Участок кривой 2–3 отражает процесс проникновения молекул красителя через цитоплазматическую мембрану с последующим связыванием с внутриклеточными нуклеиновыми кислотами [11]. Возрастание флуоресценции в ответ на внесение ЦТАБ (3) объясняется разрушением мембран клеток детергентом и взаимодействием красителя с нуклеиновыми кислотами. Можно предположить, что последняя фаза изменения флуоресценции выявляет субпопуляцию неповрежденных клеток.

Гетерогенность популяции бактериальных клеток, обнаруженная в этом опыте, нашла свое подтверждение при сравнении цитометрических данных нативных клеток и клеток, регидратированных после лиофилизации (рис. 2).

Ранее мы наблюдали гетерогенность лиофильно высушенных/регидратированных препаратов *Y. pestis* EV при помощи флуоресцентной (светимость бромистого этидия) и фазово-контрастной (морфология клеток) микроскопии. Она проявлялась в различной светимости клеток в препарате, регистрируемой визуально или при помощи фотометрии. Современное ци-

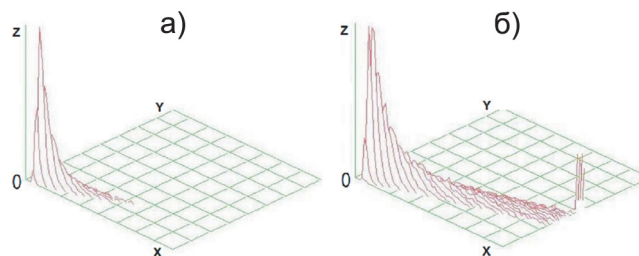


Рис. 2. Цитометрический анализ клеток авирулентного штамма *Y. pestis*:

а) суточная культура, выращенная на среде ЧПС и суспендированная в физрастворе; б) лиофильно высушенная/регидратированная в физрастворе культура того же штамма. Ось X – интенсивность флуоресценции частицы, ось Y – интенсивность светорассеяния частицы, ось Z – количество частиц с данными характеристиками по светорассеянию и флуоресценции

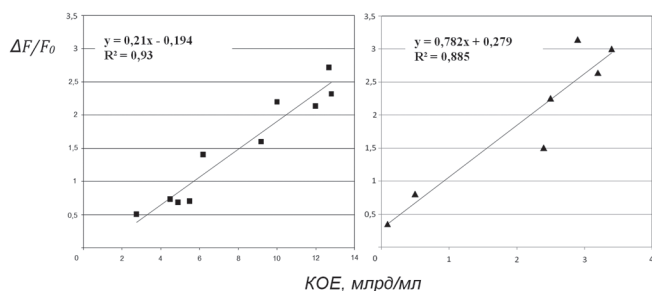


Рис. 3. Взаимосвязь флуоресцентных параметров с концентрацией жизнеспособных клеток в суспензии лиофилизированных/регидратированных клеток *Y. pseudotuberculosis* (слева) и *Y. pestis* (справа)

тометрическое оборудование позволило выявить, что в популяции клеток после лиофилизации присутствует группа клеток, близкая по морфологии и содержанию ДНК к нативным клеткам (положение основного пика). В то же время лиофилизация приводит к заметному возрастанию гетерогенности популяции по этим параметрам, о чем свидетельствует появление заметного «хвоста» на трехмерной диаграмме (рис. 2, б).

В дальнейших экспериментах мы провели корреляционный анализ между концентрацией КОЕ и величиной относительного прироста флуоресценции суспензии после добавки ЦТАБ ( $\Delta F/F_0$ ). Результаты этого анализа для препаратов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* представлены на рис. 3.

Из представленных данных следует, что относительный прирост флуоресценции бромистого этидия в суспензии клеток после добавления ЦТАБ тесно коррелирует с концентрацией в ней жизнеспособных клеток. Полученную зависимость между флуоресценцией бромистого этидия в суспензии лиофилизированных/регидратированных бактериальных препаратов и концентрацией в ней жизнеспособных клеток можно использовать для экспресс-анализа концентрации КОЕ в препаратах. При этом следует принимать во внимание, что предложенный принцип носит, по-видимому, универсальный характер. Однако ввиду того, что концентрация нуклеиновых кислот в клетке варьирует в зависимости от многих факторов (вид микроорганизма, его физиологическое состояние и т.д.), калибровочную кривую в каждом случае необходимо строить заново. Вместе с тем, в случае отработки режима лиофилизации, либо состава защитной среды, при условии использования одного вида микроорганизмов в одном и том же физиологическом состоянии, данный метод вполне приемлем. Метод также применим для качественной оценки хранящегося материала по принципу «много – мало» жизнеспособных клеток. В качестве практических рекомендаций можно отметить, что линейность выявленной зависимости находится в диапазоне  $\Delta F/F_0$  не выше 3 ед. При изменении температуры суспензии с 20 до 30 °С величина параметра  $\Delta F/F_0$  падает на 10 % от исходной. Активный выброс молекул бромистого этидия из клеток, отмеченный ранее в литературе [10, 12], не наблюдался в наших опытах, что, по-видимому, обусловлено низким энергетическим

статусом клеток после воздействия повреждающих факторов лиофилизации и регидратации.

Этот метод рекомендуется применять и для контроля процесса приготовления и хранения музейных штаммов, вакцинных и пробиотических препаратов грамотрицательных бактерий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Говорунов И.Г., Косарев Н.В., Евтодиенко Ю.В., Пучков Е.О. Исследование проницаемости мембран оболочки *Escherichia coli* для бромистого этидия. Микробиол. 1982; 51(5):731–4.
2. Ирхин А.И., Кондрашенко Т.Н., Пучков Е.О. Чувствительность мембран клеток *Escherichia coli* к детергентам разных классов. Микробиол. 1989; 58(2):217–21.
3. Косарев Н.В., Пучков Е.О. Способ определения концентрации бактерий в суспензии. А.с. СССР 1231077., опубл. 15.05.1986. Бюл. 18.
4. Пучков Е.О. Методы определения содержания и жизнеспособности микроорганизмов. Биотехнол. 1988; 4(1):132–42.
5. Пучков Е.О., Говорунов И.Г., Евтодиенко Ю.В., Косарев Н.В. Действие шока, вызванного низкой температурой, и внеклеточного образования льда на внешнюю и цитоплазматическую мембраны *E. coli* K-12. Микробиол. 1983; 52(1):136–9.
6. Санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):61–144.
7. Тихонравов В.В., Агеев В.А., Ковтун В.П., Ковтун А.Л., Шведов В.В. Способ определения количества бактерий в биопрепарате. Патент России 2117291, опубл. 10.08.1998. Бюл. 22.
8. Davey H.M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. Microbiol. Rev. 1996; 60:641–96.
9. Greenstock C.L., Ruddock G.W. Interaction of ethidium bromide with DNA as studied by kinetic spectrophotometry. Chemo-Biological Interactions. 1975; 11(5):441–7.
10. Martins M., Viveiros M., Couto I., Costa S.S., Pacheco T., Fanning S. et al. Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. In Vivo. 2011; 25:171–8.
11. Puchkov E., Melkozernov A. Fluorimetric assessment of *Pseudomonas fluorescens* viability after freeze-thawing using ethidium bromide. Lett. Appl. Microbiol. 1995; 21:368–72.
12. Viveiros M., Martins A., Paixão L., Rodrigues L., Martins M., Couto I. et al. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008; 31:458–62.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Govorunov I.G., Kosarev N.B., Evtodienko Yu.V., Puchkov E.O. [Permeability of the membranes of the *Escherichia coli* envelope for ethidium bromide]. Mikrobiologia. 1982; 51(5):731–4.
2. Irkhin A.I., Kondrashenko T.N., Puchkov E.O. [Sensitivity of *Escherichia coli* cell membranes to various classes of detergents]. Mikrobiologia. 1989; 58(2):217–21.
3. Kosarev N.V., Puchkov E.O. [Methods for the Measurement of Bacterial Concentration in Suspension]. SU Inventor Certificate 1231077.
4. Puchkov E.O. [Methods for the assessment of the presence and viability of microorganisms]. Biotechnologia. 1988; 4(1):132–42.
5. Puchkov E.O., Govorunov I.G., Evtodienko Yu.V., Kosarev N.B. [Effect of low temperature shock and extracellular ice formation on the external and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli* cells]. Mikrobiologia. 1983; 52(1):136–9.
6. Sanitary Regulations “Safety work with microorganisms of pathogenicity (risk) groups I–II” SR 1.3.1285-03. Bull. Norm. Metod. Doc. Gossanepidnadzora. 2003; 3(13):61–144.
7. Tikhonravov V.V., Ageev V.A., Kovtun V.P., Kovtun A.L., Shvedov V.V. [The method for assessment of the number of bacteria in biological preparation]. RF Patent 02117291.

#### Authors:

Govorunova V.A., Govorunov I.G., Firsova V.V., Zyrina E.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Говорунова В.А., Говорунов И.Г., Фирстова В.В., Зырина Е.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 11.05.11.